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

Aislamiento y determinación estructural de metabolitos bioactivos con potencial aplicación en apicultura y agricultura obtenidos a partir de cultivos de hongos

Gallardo, Gabriela Laura

2009

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:
Gallardo, Gabriela Laura. (2009). Aislamiento y determinación estructural de metabolitos bioactivos con potencial aplicación en apicultura y agricultura obtenidos a partir de cultivos de hongos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Gallardo, Gabriela Laura. "Aislamiento y determinación estructural de metabolitos bioactivos con potencial aplicación en apicultura y agricultura obtenidos a partir de cultivos de hongos". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2009.

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

AISLAMIENTO Y DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL DE METABOLITOS BIOACTIVOS CON POTENCIAL APLICACIÓN EN APICULTURA Y AGRICULTURA OBTENIDOS A PARTIR DE CULTIVOS DE HONGOS

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires (área Química Orgánica)

Gabriela Laura Gallardo

Directora de Tesis: Dra. Gabriela M. Cabrera

Buenos Aires, 2009

AISLAMIENTO Y DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL DE METABOLITOS BIOACTIVOS CON POTENCIAL APLICACIÓN EN APICULTURA Y AGRICULTURA OBTENIDOS A PARTIR DE CULTIVOS DE HONGOS.

Resumen

En esta tesis se describe el aislamiento, bioguiado a través de ensayos de actividad antifúngica y/o antibacteriana, y la elucidación estructural de los metabolitos presentes en los cultivos de hongos provenientes de diversas fuentes naturales.

Las especies analizadas *Alternaria brassicicola, A. raphani, Aspergillus restrictus, Trichoderma koniigii y Ascosphaera apis* fueron aisladas de polen de colmenas ubicadas en el apiario del INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria) de la ciudad de Balcarce, Buenos Aires, Argentina.

De *Alternaria brassicicola* y *A. raphani* se aislaron los compuestos **1-4**, siendo el ácido tenuazónico, compuesto **2**, el responsable de la actividad antibacteriana frente a la bacteria *P. larvae*, patógena de las larvas de las abejas melíferas. El compuesto **1**, ácido D-*allo*-tenuazónico, es aislado por primera vez como producto natural. De *Aspergillus restrictus* se aisló el compuesto **3**, conocido como pseurotina A_3. Del hongo entomopatógeno de las larvas de las abejas melíferas, *Ascosphaera apis,* se aislaron los compuestos **6-8**, siendo **6** y **8** monoterpenos de estructura química no informada previamente. Los compuestos **6** y **8** mostraron actividades antibióticas, antifúngicas y antioxidantes moderadas, mientras que el compuesto **7** posee buena actividad frente al hongo fitopatógeno *F. virguliforme*. Del cultivo de *Trichoderma koningii* se aislaron los compuestos **9**, ácido hidroxiaspergílico, y **10**, ácido terréstrico, ambos con actividad antifúngica importante frente a *F. virguliforme.*

El estudio del cultivo de una cepa endófita septada oscura (DSE1) aislada de raíces de plantas de soja, brindó los compuestos **11-13**. Dichos metabolitos son activos frente a los hongos *F. virguliforme* y *F. lateritium.*

Se sintetizaron nuevos agentes antimicrobianos previamente aislados del cultivo del hongo intermareal *Acremonium furcatum*, compuestos **14** y **15**. Los intermediarios sintéticos **21** y **22** resultaron poseer muy buena actividad antifúngica frente a *F. virguliforme, Aspergillus fumigatus, Botrytis cynerea, Colletotrichum trucatum* y *Macrophomina phaseolina.*

Todos los extractos de las especies estudiadas fueron fraccionados mediante distintas técnicas cromatográficas hasta la obtención de los metabolitos de interés puros. La elucidación estructural se llevó a cabo utilizando principalmente experimentos de RMN-1D y 2D, junto con espectrometría de masa.

Palabras clave: metabolitos fúngicos, *Alternaria brassicicola, Alternaria raphani, Aspergillus restrictus, Trichoderma koningii, Ascosphaera apis, Acremonium furcatum,* hongos endófitos septados oscuros.

ISOLATION AND STRUCTURAL DETERMINATION OF BIOACTIVE METABOLITES WITH POTENTIAL USE IN APICULTURE AND AGRICULTURE FROM FUNGAL CULTURES.

Abstract

The bioguided isolation against phytopathogenic fungi and/or bacteria and the structural elucidation of the metabolites produced from fungal cultures from different natural sources are described.

Alternaria brassicicola, A. raphani, Aspergillus restrictus, Trichoderma koniigii and *Ascosphaera apis* were isolated and studied from pollen of beehives from the apiary of INTA, Balcarce, Buenos Aires, Argentina.

Compounds **1-4** were isolated from *Alternaria brassicicola* and *A. raphani*. Compound **2**, tenuazonic acid, was the responsible for the antibacterial activity against *P. larvae*, pathogenic bacteria of the honey bee larvae. This is the first time report on the isolation of Compound **1**, D-*allo*-tenuazonic acid, from a natural source. Compound **3**, pseurotin A_3, was isolated from *Aspergillus restrictus*. Compounds **6-8** were isolated from *Ascosphaera apis,* an entomopathogenic fungi of the honey bee larvae. Two novel monoterpenes, **6** and **8,** showed moderate antibiotic, antifungal and antioxidant activity while compound **7** exhibited good activity against *F. virguliforme.* From the culture of *Trichoderma koningii,* compound **9**, hydroxy aspergillic acid, and compound **10**, terrestric acid, were isolated. Both compounds showed antifungal activity against *F. virguliforme.*

Compounds **11-13** were isolated from a dark septate root endophyte fungus strain from soybean, which possess antifungal activity against *F. virguliforme* and *F. lateritium.*

The synthesis of new antimicrobial agents isolated previously from *Acremonium furcatum,* compounds **14** and **15** was performed. The synthetic intermediaries **21** and **22**, showed a very good antifungal activity against, *F. virguliforme, Aspergillus fumigatus, Botrytis cynerea, Colletotrichum trucatum* and *Macrophomina phaseolina.*

All the extracts from the abovementioned species were fractionated using different chromatographic techniques, to obtain the pure metabolites. The structural elucidation was achieved mainly through 1D and 2D NMR experiments and mass spectrometry.

Key words: fungal metabolites, *Alternaria brassicicola, Alternaria raphani, Aspergillus restrictus, Trichoderma koningii, Ascosphaera apis, Acremonium furcatum,* dark septate endophytic fungi.

A July, Guido y César,

porque los amo.

Agradezco a la Dra. Gabriela Cabrera, directora de esta tesis, por brindarme su amistad, apoyo y conocimientos en todos estos años.

Agradezco a las siguientes personas e Instituciones, cuya ayuda fue fundamental para la realización de este trabajo:

A la Dra. Alicia M. Seldes† por su trato cordial y por haberme permitido ingresar en su grupo de trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Técnica, a la Universidad de Buenos Aires y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica por el financiamiento de este trabajo.

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

Al Dr. Jorge Palermo por su amistad, su desinteresada colaboración, innumerables consejos, permanente apoyo y por la realización de los espectros de RMN.

A Stephen Ausmus del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, Servicio de investigación en Agricultura, USDA/ARS, por las fotos cedidas.

A todo el personal de UMYMFOR, en especial a la Lic. María de las Mercedes Rivera por su ayuda con el CGL, al Sr. Jorge A. Aznárez, al Sr. Gabriel Cases, por los espectros de masa y al Lic. Gernot Eskuche y al Sr. 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 de las cepas DSE.

Al Dr. Horacio Terzolo y al Dr. Pablo Chacana del INTA, Balcarce por su ayuda para la obtención de cepas de *P. larvae* y sus estudios in vivo.

Al Dr. Marcos Eberlin por la colaboración en la realización de los espectros de masa de alta precisión de los compuestos sintéticos del capítulo 6.

Al Dr. José M. Delfino y a la Lic. Gabriela González (IQUIFIB- CONICET y Dpto de Química Biológica, FFyB, UBA) por las mediciones de las curvas de dicroísmo circular.

A mi amiga Flo por su invalorable amistad, compañerismo, apoyo y consejos, ya que aunque esté lejos siempre va a estar a mi lado.

A mis amigos, Adri K., Ale, Bren, Dani, Gaby Naranjo, Marian, Mati y Vale, porque los quiero y porque me hacen disfrutar las horas que compartimos juntos.

A mis compañeros de laboratorio, Dra. Adriana Cirigliano, Lic Brenda Bertinetti, Lic. Matías Butler, Sr. Pablo Sánchez y Sr. Marcos Ávila por su compañerismo, por los valiosos intercambios de ideas y por los momentos de diversión compartidos.

A la Dra. Marta Maier y a todo su grupo de trabajo, Bioq. Valeria Careaga, Lic. Alejandra Fazio, Lic. Blanca Gómez, Lic. Victoria Richmond, Srta. Daniela Parera y Lic. Gustavo Garrido por su amistad, ayuda permanente y cálida compañía.

A los "Palermicus", Dr. Jorge Palermo, Dra. María Florencia Rodríguez Brasco, Dra. Marianela Sánchez, Dra. Tereza Rojo de Almeida, Lic. Gastón Siless, Lic. Lucía Fernandez, Msc. Laura Patiño.

Al Dr. Alberto Ghini, Dra. Adriana Veleiro, Dr. Fernando Durán, Dra. Rosana Misico, Dr. Pablo Di Chenna, y a sus respectivos grupos, por estar cada vez que los necesité y por su grata compañía y por ser una fuente siempre dispuesta de consultas.

A todo el departamento de Química Orgánica por esas charlas de pasillo.

A mis compañeros de docencia, Dra. Laura Malec, Dra. Gabriela Naranjo, Dra. Carmen Campos, Dra. Pilar Buera, Dra. Susana Vigo, Dr. Nicolás Amiano, Dra. Virginia Fernandez Pinto, Dra. Andera Patriarca, Dra. Graciela Vamonde, Lic. Gabriela Larumbe, Msc. Nora Gutierrez, Msc. Stella Romero, Lic. Graciela Leiva, Lic. Jimena Jiudicce, Lic. Jonhatan Fauerbach, Srta. Leticia Leiva, Sr. Pablo Sánchez, por los gratos momentos compartidos.

A la Sra. María del Carmen Ares, por su paciencia y sus consejos sobre los tediosos "papeles".

Al Sr. Sergio E. Jacobo y Sra. Olga Fernández y demás personal no docente del departamento por su diaria y amable colaboración.

A todo el departamento de Química Orgánica por el apoyo y el cariño brindado a lo largo de estos años.

A mi mamá y a mi papá, por apoyarme siempre en mis decisiones, por la confianza que me dieron y por enseñarme el valor del esfuerzo y de la educación.

A toda mi familia política, especialmente a mis suegros y a Fina, Core, Pablo, Leo y Pitu por su gran ayuda y por hacerme sentir desde siempre parte de su familia.

Al resto de mis amigos Dani N., Gaby M, Ceci, Lau y Ali, por su amistad.

A mi familia porque es lo más valioso que tengo y porque sin ellos nada de esto sería posible.

A mi esposo, César por su amor, su paciencia para aguantar mis locuras y por la fuerza que me da en el día a día.

A Guido y a July, por hacer que la vida sea más linda cada día y simplemente porque los amo.

"Todos somos muy ignorantes.

Lo que ocurre es que no todos ignoramos las mismas cosas."

Albert Einstein

ÍNDICE

Lista de abreviaturas utilizadas -1-

Capítulo 1: Introducción -4-

Capítulo 2: Aislamiento y elucidación estructural de metabolitos secundarios producidos por *Alternaria brassicicola* (MP 03) y *A. raphani* (MP 05) -16-

Introducción -18-

Aislamiento de los metabolitos secundarios -23-

Elucidación estructural de los compuestos aislados -25-

Actividad biológica -37-

Biosíntesis -39-

Antecedentes de compuestos acil tetrámicos -40-

Antecedentes de compuestos aislados de otras cepas del mismo género -42-

Conclusión -44-

Detalles experimentales -44-

Bibliografía -49-

Capítulo 3: Aislamiento y elucidación estructural de metabolitos secundarios producidos por *Aspergillus restrictus* (MP 09) -52-

Introducción -54-

Aislamiento de los metabolitos secundarios -54-

Elucidación estructural del compuesto aislado -55-

Actividad biológica -62-

Biosíntesis -62-

Antecedentes de compuestos con estructura similar a la pseurotina A -64-

Antecedentes de compuestos aislados de cultivos de la misma especie -66-

Conclusión -66-

Detalles experimentales -67-

Bibliografía -70-

Capítulo 4: Aislamiento y elucidación estructural de metabolitos secundarios producidos por *Ascosphaera apis* (MP 07) -72-

Introducción -74-

Aislamiento de los metabolitos secundarios -76-

Elucidación estructural de los compuestos aislados -77-

Actividad biológica - 88-

Biosíntesis -89-

Antecedentes de compuestos con estructura similar -91-

Antecedentes de compuestos aislados de cultivos de la misma especie -92-

Conclusión -92-

Detalles experimentales -93-

Bibliografía -97-

Capítulo 5: Aislamiento y elucidación estructural de metabolitos secundarios producidos por *Trichoderma koningii* (MP 18) -100-

Introducción -102-

Aislamiento de los metabolitos secundarios -105-

Elucidación estructural de los compuestos aislados -107-

Actividad biológica -114-

Biosíntesis -115-

Antecedentes de compuestos con estructura similar -118-

Antecedentes de compuestos aislados de cultivos de la misma especie -120-

Conclusión -121-

Detalles experimentales -121-

Bibliografía -124-

Capítulo 6: Aislamiento y elucidación estructural de metabolitos secundarios producidos por una cepa fúngica endófita septada oscura (DSE 01) -128-

Introducción -130-

Aislamiento de los metabolitos secundarios -135-

Elucidación estructural de los compuestos aislados -137-

Actividad biológica -149-

Biosíntesis -150-

Antecedentes de compuestos con estructura similar -151-

Antecedentes de compuestos aislados de cultivos de hongos endofitos septados oscuros -152-

Conclusión -153-

Detalles experimentales -153-

Bibliografía -157-

Capítulo 7: Síntesis de metabolitos antimicrobianos producidos por el hongo intermareal *Acremonium furcatum* -160-

Introducción -162-

Síntesis de los compuestos **14** y **15** -163-

Actividad biológica -167-

Conclusión -170-

Detalles experimentales -170-

Bibliografía -178-

Capítulo 8: Detalles experimentales generales -180-

Instrumentos utilizados -182-

Métodos cromatográficos -183-

Aislamiento de hongos provenientes de polen de colmenas -185-

Lista de abreviaturas utilizadas

- $[\alpha]_D^{25}$ poder rotatorio específico medido a 25°c
- AcOEt acetato de etilo
- Boc radical *tert*-butoxicarbonilo
- c cuarteto
- c.c.d. cromatografía en capa delgada
- c.c.p. cromatografía en capa delgada preparativa
- C.G.L. cromatografía gas líquido
- C.G.L.-EM cromatografía gas líquido acoplada a espectrometría de masa
- cy ciclohexano
- d doblete
- da doblete ancho
- dd doble doblete
- ddd doble doble doblete
- d.i. diámetro interno
- DCC diciclohexilcarbodiimida
- DCI desorción por ionización química
- DMF dimetilformamida
- E.M. 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
- Et etilo

- EtOH — etanol
- eV — electrón volt
- FAB — Bombardeo con átomos rápidos
- g — gramo
- Glc — glucosa
- Gly — glicerol
- HPLC — cromatografía líquida de alta resolución
- IR — infrarrojo
- *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
- Me — metilo
- MeOH — metanol
- mg — miligramo
- μg — microgramo
- MHz — mega hertz
- MIC — concentración de mínima inhibición
- Min — minuto
- ml — mililitro
- μl — microlitro
- OMe — metoxilo

- ppm — parte por millón
- Py — piridina
- q — cuarteto
- qa — cuarteto ancho
- 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
- TEA — trietilamina
- THF — tetrahidrofurano
- UV — ultravioleta
- MTPA — cloruro de ácido α-metoxi-α-trifluorometil-fenilacético

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

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

Los hongos son organismos celulares heterotróficos y eucarióticos que realizan una digestión externa de sus alimentos secretando enzimas, y luego reabsorbiendo las moléculas disueltas resultantes de la digestión, es decir se alimentan osmotróficamente. Carecen de clorofila y la mayoría son saprófitos, esto significa que viven sobre materia orgánica muerta de la que se alimentan[1].

Pueden ser simbióticos de plantas, acompañar a las raíces en forma de micorrizas arbusculares, ectomicorrizas o endófitos septados oscuros y ayudándolas entre otras cosas a absorber nutrientes del suelo. Se piensa que esa simbiosis fue esencial para la conquista de las plantas del medio terrestre y para la existencia de los ecosistemas continentales[2].

Solo algunos son patógenos o parásitos estrictos que se alimentan a expensas de un organismo vivo y pueden producir enfermedades que se conocen como micosis. Poseen un enorme talento para biosintetizar y producir un amplio y diverso rango de moléculas orgánicas de relativo bajo peso molecular, con interesantes actividades biológicas[3]. Actualmente la mayoría de los grupos de investigación que trabajan con productos naturales producidos por hongos se centran en sus aplicaciones farmacéuticas, en sus roles como micotoxinas y sus multifacéticas funciones ecológicas.

Desde el descubrimiento de la penicilina en el año 1928, a partir del cultivo del hongo *Penicillum notatum*[4], hasta la actualidad existen numerosos antecedentes de metabolitos secundarios aislados de cultivos de hongos que fueron de enorme relevancia para la industria farmacéutica.

Algunos pocos ejemplos de compuestos bioactivos descubiertos a partir de esta fuente natural son los siguientes:

Ciclosporina A (figura 1), compuesto inmunosupresor aislado a partir del hongo filamentoso *Tolypocladium inflatum*[5], utilizado en tratamientos post trasplante de órganos.

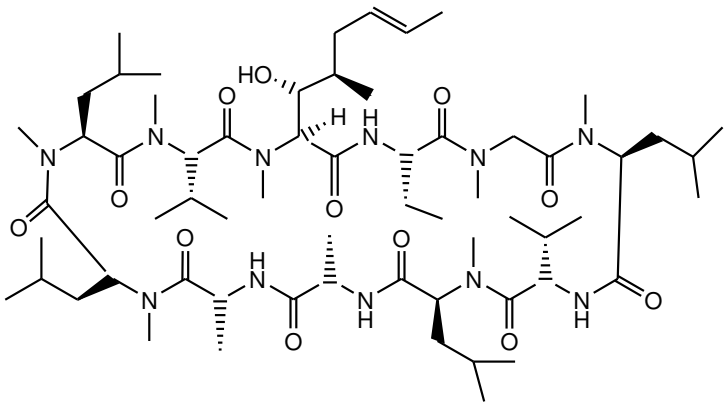


Figura 1: Estructura de ciclosporina A

Mevinolina (figura 2), agente reductor de colesterol, una de las drogas conocidas como estatinas, producida por el hongo *Aspergillus terreus*[6].

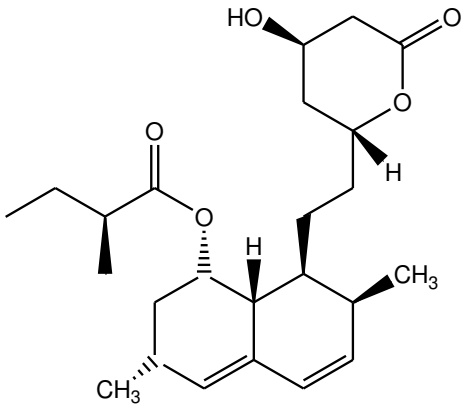


Figura 2: Estructura de mevinolina

Asperlicina(figura 3), antagonista de la hormona peptídica reguladora colecistoquinina, aislada de *Aspergillus alliaceus*[7], utilizada en terapias antiulcerosas.

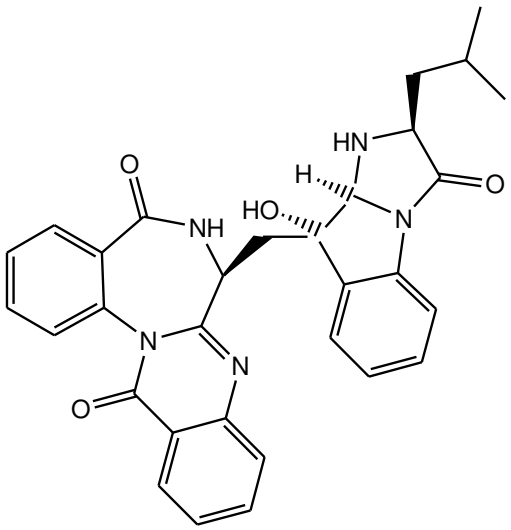


Figura 3: Estructura de asperlicina

Su modificación sintética derivó en el descubrimiento de las benzodiazepinas (figura 4), drogas utilizadas para tratamientos severos de insomnio y ansiedad[8].

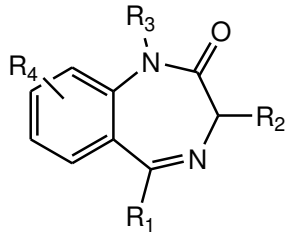


Figura 4: Estructura base de benzodiazepinas

Metabolitos secundarios aislados de hongos con bioactividades de interés en el agro.

Se denominan agroquímicos a los plaguicidas utilizados específicamente en las actividades relacionadas con el agro, clasificándose según sea su origen de procedencia en naturales, a aquellos que son productos naturales; o sintéticos, a los que provienen de síntesis químicas industriales. Se pueden enumerar diferentes ventajas y desventajas entre estos dos grupos. Los agroquímicos que provienen de productos de síntesis presentan como problema fundamental que generalmente son poco específicos en su modo de acción y su biodegradabilidad es baja, por lo cual la contaminación ambiental que provocan

puede llegar a ser considerablemente alta; en cambio los que se obtienen a partir de productos naturales son siempre biodegradables y pueden poseer una mayor especificidad ya que suelen ser moléculas complejas estructuralmente que operan por mecanismos de acción más específicos. Sin embargo, a la hora de hablar de rentabilidad los papeles se invierten ya que los plaguicidas sintéticos 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 poder utilizar la ventaja de la biodegradabilidad y especificidad de los productos naturales y que su producción no sea un grave inconveniente, se emprendió la búsqueda de agroquímicos a partir de otras fuentes de productos naturales como los microorganismos, ya que se los puede cultivar en fermentadores industriales haciendo así su producción a gran escala mucho más sencilla. Los países con mayores recursos económicos están incluso fomentando el desarrollo de agentes de biocontrol (ABC)[9], 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 de uso 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[4, 10].

Actualmente existen más de mil productos agroquímicos comerciales en uso siendo en su gran mayoría sintéticos, y se estima que toda la población está expuesta en alguna medida a ellos, ya sea mediante exposición directa por trabajar con ellos, por consumo de alimentos que estuvieron en contacto con los mismos o por efectos ecológicos a largo plazo[11].

Se pueden citar numerosos ejemplos de enfermedades de plantas o animales producidas por bacterias y hongos, particularmente en los cultivos agrícolas, los cuales se ven afectados por diversos hongos fitopatógenos. Cultivos como vid pueden sufrir la enfermedad conocida como oidio, causada por el hongo fitopatógeno *Oidium tuckeri*[12], los de soja en cambio, pueden verse infectados por más de 50 especies, entre ellas *Cercospora kikuchii*[13], *Macrophomina phaseolina*[14] y *Rhizoctonia solani*[15], mientras que la marchitez que sufren los cultivos de batatas es causada por *Fusarium oxysporum*[16].

Estos son sólo unos pocos ejemplos entre los cientos de enfermedades descriptas para cultivos agrícolas.

Existen numerosos metabolitos provenientes de microorganismos que son capaces de controlar las enfermedades provocadas tanto por bacterias como por hongos fitopatógenos, citando como ejemplo los siguientes compuestos[17]:

-Blasticidina S (figura 5): Metabolito aislado de *Streptomyces griseochromogenes*, activo *in vitro* frente a hongos y bacterias fitopatógenos[18].

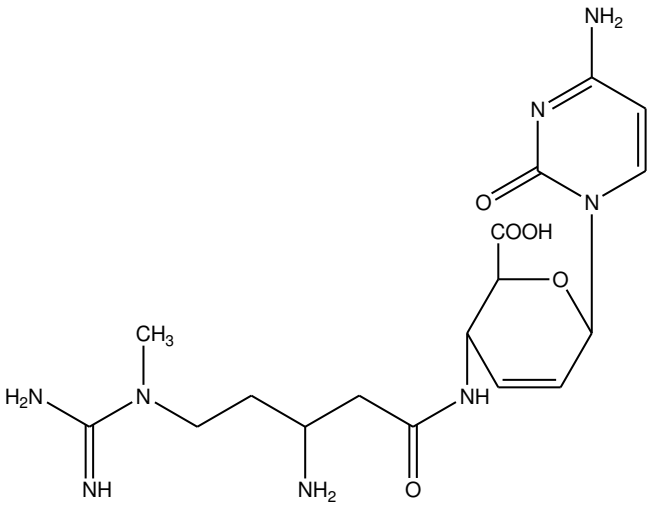


Figura 5: Estructura de Blasticidina S

-Kasugamicina (figura 6): 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*[19].

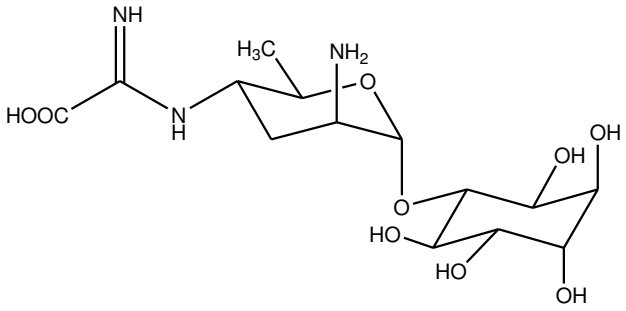


Figura 6: Estructura de Kasugamicina

-Polioxinas (figura 7): Metabolitos aislados de *Streptomyces cacaoi* var*. asoensis ,* activos frente a diversos hongos que afectan a variadas clases de cultivos como cultivos de arroz, que se ven afectados por *Rhizoctonia solani,* cultivos de vid y vegetales afectados por *Botrytis cinerea*[20, 21].

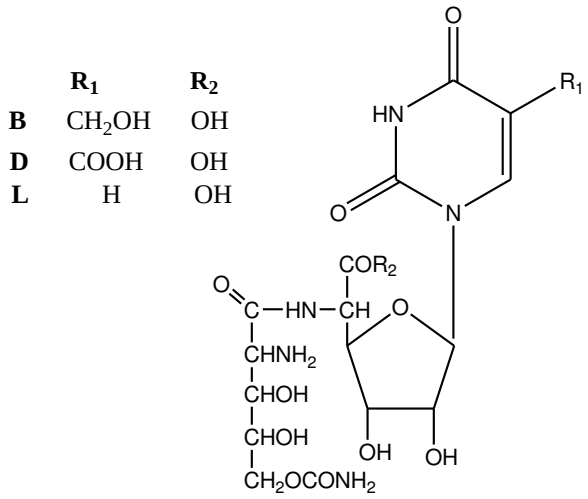


Figura 7: Estructura de las polioxinas

-Mildiomicina (figura 8): Metabolito aislado de *Streptoverticillium rimofaciens*, activo frente a hongos resistentes al compuesto antifúngico comercial benomyl, como por ejemplo *Sphaerotheca fuliginea*, el cual es patógeno de cultivos de zapallo[22].

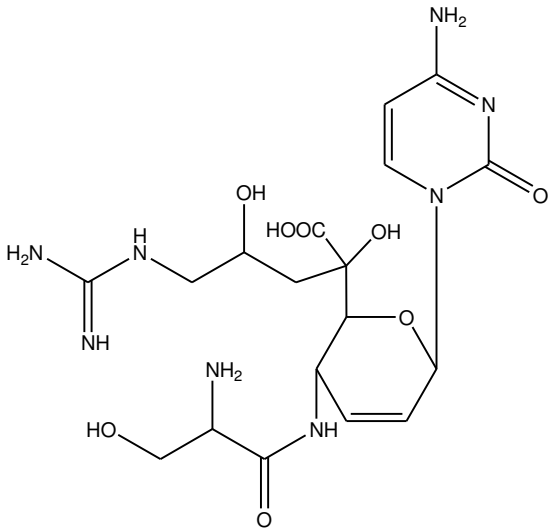


Figura 8: Estructura de mildiomicina

En el área de apicultura las principales afecciones que sufren las larvas de las abejas melíferas (*Apis mellifera*) son causadas por la bacteria *Paenibacillus larvae,* cuya enfermedad infectocontagiosa es conocida como Loque americana, y el hongo *Ascosphaera apis,* el cual es el agente responsable de la enfermedad conocida como cría yesificada, ascosfaerosis o chalkbrood[23].

Debido a que Argentina es el 2º productor de miel a nivel mundial, alternando este puesto con Estados Unidos, y un importante agro exportador, cualquier enfermedad que produzca una disminución en la producción de estos alimentos genera grandes pérdidas a nivel económico[24].

A raíz de estos inconvenientes se considera que es indispensable desarrollar nuevas investigaciones en este tema para tratar de solucionar el problema de las enfermedades infecciosas en plantas y animales a través del uso de agroquímicos naturales y en particular de microorganismos por las razones que se expusieron anteriormente.

Teniendo en cuenta que solamente se expusieron unos pocos ejemplos, se puede concluir que tiene sentido emprender la búsqueda de nuevos productos naturales que posean diversas actividades biológicas a partir de cultivos de hongos y considerando que se presume que se han descripto al día de hoy solamente el 5⁄ de los microorganismos existentes en el universo, hay un enorme y prometedor segmento de productos naturales bioactivos por descubrir.

En este sentido, 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 sostenibles para su aplicación en el agro para el control de enfermedades infecciosas, tanto en agricultura como en apicultura.

❖ Bibliografía

1. Jennings, D. H., Lysek, G., Fungal Biology: Understanding the fungal lifestyle. *Guildford, UK: Bios Scientific Publishers Ltd.* **1996**.
2. Maheshwari, R., What is an endophytic fungi? *Current Science* **2006,** 90, 1309.
3. Cole, R. J., Jarvis, B. B., Schweikert, M. A., Secondary fungal metabolites. *Academic press* **2003,** I - III.
4. Omura, S., The search for bioactive compounds from microorganisms.Part I "Antimicrobial substances. Antifungal agents". Tanaka, Y. *Brock/ Springer Series in Contemporary Bioscience* **1992**, 1-78.
5. Traber, R., Hofmann, H., Kobel, H., Cyclosporins - New analogues by precursor directed biosynthesis. *Journal of Antibiotics* **1989,** 42, 591-597.
6. Alberts, A. W., Chen, J., Kuron, G., Mevinolin: A highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1980,** 77, 3957-3961.
7. Liesch, J. M., Hensens, O. D., Springer, J. P., Asperlicin, a novel non-peptidal cholecystokinin antagonist from *Aspergillus alliaceus*. Structure elucidation. *Journal of Antibiotics* **1985,** 38, 1638-1641.
8. Herranz, R., Cholecystokinin antagonists: Pharmacological and therapeutic potential. *Med. Res. Rev.* **2003,** 23, 559-605.
9. Laveda, D. P., Isolation of biotechnological organisms from nature. *McGraw-Hill Publishing Company* **1990**.
10. Butt, T. M., Jackson, C., Magan, N., Fungi as a biocontrol agents. *CAB international* **2001**.
11. Cutler, H. G., Cutler, S. J., Biologically active natural products: Agrochemicals. "Agrochemicals pharmaceuticals: The connection". Cutler, H. G., Cutler, S. J. *CRC Press* **1999**, 1-14.
12. Pugliese, H. F., Hongos que afectan la vid: oidio. *Producción Agropecuaria. www.inta.gov.ar/sanjuan/info/documentos/Viticultura/oidio.pdf* **2002,** 8.
13. Almeida, A. M. R., Piuga, F. F., Marin, S. R. R., Binneck, E., Sartori, F., Costamilan, L. M., Teixeria, M. R. O., López, M., Pathogenicity, molecular characterization, and cercosporin content of brazilian isolates of *Cercospora kikuchii*. *Fitopatologia Brasileira* **2005,** 30, 594-602.
14. Pineda, J. B., Avila, J. M., Alternativas para el control de *Macrophomina phaseolina* y *Fusarium oxysporum* patógenos del ajonjoli (*Sesamum indicum* L.). *Agronomía Tropical* **1988,** 38, 79-84.
15. Wiese, M. V., Compendium of wheat diseases. *American Phytopathological Society* **1987.**
16. Nielsen, L. W., Control of sweetpotatoe *Fusarium* wilt with benomyl and thiabendazole *Plant Disease Reporter* **1977,** 61, 1-4.
17. Omura, S., The search for bioactive compounds from microorganisms."Fungicides and antibacterial agents". Okuda, S., Tanaka, Y. *Brock/ Springer Series in Contemporary Bioscience* **1992**, 213-236.
18. Takeuchi, S., Hirayama, K., Ueda, K., Sakai, H., Yonehara, H., Blasticidin S, a new antibiotic. *Journal of Antibiotics (Tokyo) Series A* **1958,** 11, 1-5.
19. Umezawa, H., Ozami, Y., Hashimoto, T., Suhara, Y., Hamada, M., Takeuchi, T., A new antibiotic, Kasugamycin. *Journal of Antibiotics (Tokyo) Series A* **1965,** 18, 101-103.
20. Isono, K., New aspect in research and development of agricultural antibiotics. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* **1989,** 63, 1351-1358.

21. Isono, K., Suzuki, S., The polyoxins: Pyrimidine nucleoside peptide antibiotics inhibiting fungal cell wall biosynthesis. *Heterocycles* **1979,** 14, 333-351.
22. Iwasa, T., Mildiomycin, an effective eradicant for powdery mildew. *Pesticide Chemistry, Human Welfare and the Environment* **1983,** 2, Natural Products, 57-62.
23. Puerta, F., Padilla, F., Bustos, M., Flores, J. M., Development of chalkbrood in a honeybee colony: a review. *Bee World* **1982,** 63, 119-130.
24. Mogni, F., Sistemas agroalimentarios: Miel en la Argentina. *Newsletter PAA. https://agro.uba.ar/newsletter-paa/news-2/miel-argentina* **2008**.

Capítulo 2

Aislamiento y elucidación estructural de metabolitos secundarios producidos por *Alternaria brassicicola* (MP03) y *A. raphani* (MP05)

❖ Introducción

Las colmenas de las abejas productoras de miel (*Apis melífera*) presentan un hábitat muy favorable para que muchas clases de macro y microorganismos se puedan desarrollar en su interior. Poseen alimento (miel, cera, polen, etc.), 30 °C de temperatura promedio y entre un 60 y 70 ⁄ de humedad relativa.

Muchos organismos pueden crecer sin provocar graves infecciones que afecten la producción de miel y derivados, pero otros en cambio pueden generar enfermedades que afectan a las larvas de las abejas generando como consecuencia importantes pérdidas económicas. A estas afecciones se las puede dividir según la clase de organismo patógeno responsable en enfermedades producidas por:

- **Bacterias:** La bacteria *Paenibacillus larvae* provoca la enfermedad infectocontagiosa Loque americana, conocida desde 1906 como una de las enfermedades más graves que afectan a la apicultura. La bacteria no supone amenaza alguna para la salud humana. Son muy pocos los países conocidos como libres de esta enfermedad.

  Las larvas, principalmente en el estado de prepupa, son infectadas al consumir esporas de la bacteria patógena presentes en su alimento. Luego, las esporas germinan y crecen en el estómago infectado. Una vez desarrolladas, las bacterias se van adhiriendo a los tejidos provocando la muerte de la larva, hecho que ocurre a los 3 días de comenzada la infección. Varios millones de esporas se generan al morir la larva enferma, infectando al resto del panal, figura 9[1]. Si bien existen abejas sanitarias, que se ocupan de la limpieza de la colmena, no es posible la limpieza completa del panal ya que las esporas se unen fuertemente a las celdas. Como consecuencia, la enfermedad es trasladada por las abejas adultas de un panal a otro, ya que éstas son portadoras asintomáticas. Las esporas son muy resistentes a desinfectantes, al calor y al frío y pueden retener el poder de germinación por varios años tanto en el panal como en la miel. Las pérdidas económicas surgen a raíz de la disminución de la población adulta en los panales contaminados[2], lo cual desencadena una baja considerable de la producción apícola.

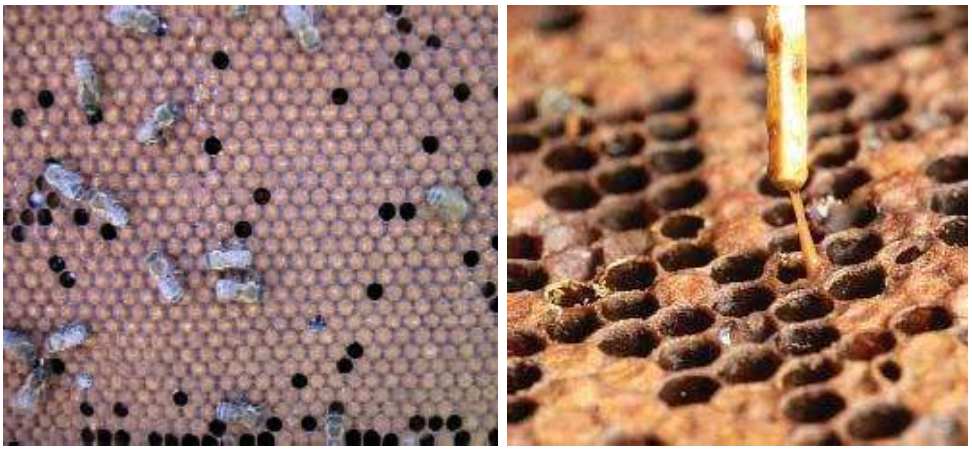


Figura 9: Colonia sana vs colonia infectada con *P. larvae* © Crown copyright 2007
Website: www.defra.gov.uk

Un grave problema de esta enfermedad es que es divisada en las colonias cuando la infección está avanzada, por tal motivo muchos apicultores introducen, a modo preventivo, antibióticos de amplio espectro en las colmenas. Algunos ejemplos de antibióticos empleados actualmente son clorhidrato de oxitetraciclina (Terramicina)[3], fluoroquinolonas y tartrato de tilosina (Tylan), el cual fue aprobado por la Administración de Alimentos y Drogas (FDA) de los Estados Unidos en el año 2005 y su uso también está permitido en nuestro país. Si bien la utilización de estos productos está permitida, no se debe detectar su presencia en la miel al momento de ser exportada. Es decir que el producto debe aplicarse en tiempo y concentración adecuada para que al momento del análisis en el laboratorio no sea detectable en la miel o sus subproductos. Tanto la utilización de nitrofuranos como de cloranfenicol está terminantemente prohibida[4].

Sin embargo, se ha demostrado con anterioridad que estos antibióticos permitidos dejan residuos apreciables en la miel o subproductos apícolas, hecho que puede causar daños importantes en la salud. Ejemplos de estos daños son alergias, intoxicaciones y la generación de mecanismos generales de resistencia, ya que son drogas antibióticas que se utilizan también en humanos (oxitetraciclina se utiliza como antibiótico de amplio espectro). Debido a esto se legislaron a nivel mundial límites máximos para las concentraciones de los diferentes antibióticos[5].

Al momento no existen compuestos bioactivos específicos informados frente a la bacteria entomopatógena *P. larvae*.

Se conoce también la enfermedad conocida como Loque europea, causada por la bacteria *Melissococcus plutonius*, la cual no forma esporas. Los efectos que causa son más leves que los mencionados para *P. larvae*. Es una enfermedad causada por "estrés", es decir que es solamente peligrosa si la colonia se encuentra por alguna razón bajo estrés, ya que en condiciones normales no es afectada. Esta enfermedad es controlada químicamente mediante el uso de los mismos antibióticos que se utilizan para Loque Americana.

- **Hongos**: El hongo *Ascosphaera apis* es el agente responsable de la enfermedad conocida como cría yesificada, ascosfaerosis o chalkbrood, comenzando a observarse en Argentina a fines de 1978.

  Las esporas de este hongo, que están presentes en el alimento larval, germinan en el intestino de la larva de la abeja posteriormente a su digestión. La infección puede surgir también por la propagación del hongo a través de la cutícula. Tras ser operculadas (tapadas) las celdas, el micelio del hongo se desarrolla a partir de las esporas hasta llegar a afectar a toda la larva, apareciendo una pelusa blanca similar a la del algodón en rama. Luego de la muerte de la larva, el cadáver se contrae y se seca convirtiéndose en una momia de color blanco o gris negruzco con aspecto de yeso. Las momias blancas son el resultado de la infección con un tipo sexual de *A. apis*, mientras que las momias de color gris negruzco indican que la invasión ha sido de ambos tipos sexuales[6]. Las larvas presentan un máximo de susceptibilidad a la infección cuando tienen entre 3-4 días de edad y mueren en los 2 días siguientes a la operculación celular[7] (figuras 10 y 11).

  Debido a que el daño producido por esta enfermedad no se considera muy grave, no se han formulado compuestos antimicóticos específicos. Si el apicultor desea utilizar algún producto debe formularlo por sí mismo a partir de medicamentos para uso humano o animal. Por ser una afección generada por un hongo se encuentra ligada a la temperatura y humedad de la colmena. Durante los últimos años se ha probado con cierta eficacia el uso de numerosos antimicóticos. Como ejemplo se pueden citar:

nistatina (Micostatin), tiabendazol (Thibenzole) y Anfotericina B, teniendo esta última el inconveniente de ser inestable y muy cara[8]. También se han ensayado fumigaciones de los panales con óxido de etileno, timol al 0,7 ⁄ , formaldehído al 4 ⁄ , amoníaco, propionato de sodio y hasta incluso una simple solución jabonosa[1].

Figura 10: Colonias infectadas con *Ascosphaera apis*. Website: www.mdbka.com/Page326.htm

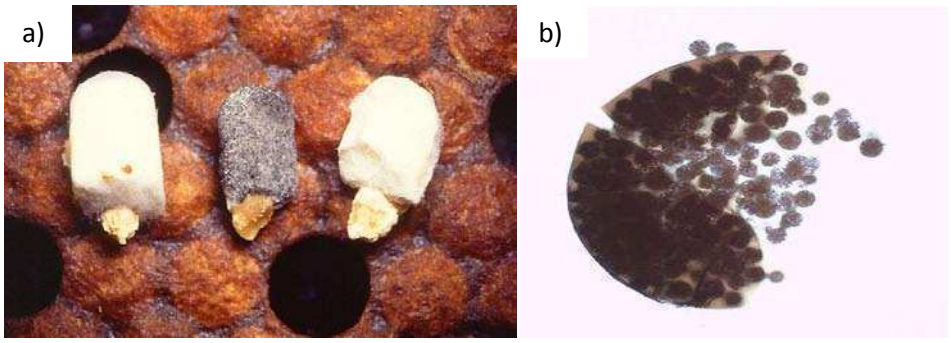


Figura 11: a) Momias blancas y negras (Imagen N° K8144-3, por Jeff Pettis); b) larva enferma desprendiendo esporas del hongo entomopatógeno.Website: www.ars.usda.gov/Research

- **Parásitos:** *Varroa jacobsoni* es un ácaro que provoca la enfermedad conocida como Varroasis. Este ácaro se alimenta de los fluidos físicos de las abejas adultas, pupas y larvas adhiriéndose a la piel. Provoca grandes daños produciendo la desaparición de numerosas colmenas. (Figura 12)

  Acarapis woodi, es otro ácaro que afecta las vías aéreas de las abejas melíferas causando Acarapisosis. Es una enfermedad grave que genera importantes pérdidas en las colonias de abejas.

Existen varios tipos de tratamientos para estas clases de enfermedades, como por ejemplo el agregado de cristales de mentol o salicilato de metilo en forma sólida en la parte superior de la colmena cuyos vapores son activos.

Figura 12: Cría de abejas sacadas de celdillas operculadas con Varroa. La flecha indica la ubicación de la hembra adulta de *Varroa jacobsoni*, por Ferrnando G. Fredes Martínez. Website: www.fapas.es/abejas_en_peligro.htm

Sabiendo que nuestro país es uno de los mayores exportadores mundiales de miel y otros productos apícolas y que las mayores pérdidas económicas en apicultura son causadas por la bacteria entomopatógena *P. larvae*, se decidió emprender la búsqueda de nuevos compuestos inhibidores del crecimiento de la misma. Para lograr dicho fin se inició la búsqueda de metabolitos bioactivos producidos por hongos presentes en polen aislado del interior de colmenas. Se eligieron estas cepas ya que son habitantes naturales de las colmenas y podrían eventualmente actuar como ABC. Estos hongos probablemente sean introducidos a través de material infectado como partículas del suelo, plantas y/o semillas transportadas por el viento, abejas u otros insectos.

No existe mucha información sobre cepas aisladas de esta fuente; al realizar la búsqueda bibliográfica se encontró una publicación acerca del aislamiento de diversas cepas de hongos de polen de colmenas en el municipio de Irapuato, estado de Guanajuato, México, con el objetivo de cuantificar la contaminación fúngica que posee, ya que el polen es utilizado para diversos usos. Fueron aisladas especies de los géneros *Penicillium, Mucor, Alternaria, Rhizopus, Fusarium, Aspergillus* y *Helminthosporium*[9].

Como primer paso para la realización de este trabajo, la Dra. Nora Peña de la Universidad Nacional de Mar del Plata realizó el aislamiento y clasificación de 18 especies de hongos a partir de polen de colmenas ubicadas en el apiario de INTA Balcarce. Luego, todas las cepas aisladas fueron cultivadas en pequeña escala con el objetivo de realizar una evaluación de actividad y contenido de los extractos de cada especie.

Se realizaron 3 cultivos de 75 ml cada uno para cada especie aislada, utilizando como medio de cultivo extracto de malta. Una vez crecido el hongo en cada recipiente, se lo filtró separando el micelio del medio de cultivo. El micelio fue extraído con EtOH y posteriormente con AcOEt y ambos extractos fueron combinados y evaporados a presión reducida, obteniéndose el extracto de micelio. Por otro lado el medio de cultivo fue extraído con AcOEt y luego evaporado obteniéndose el extracto de medio de cultivo.

Seguidamente se llevaron a cabo ensayos de bioactividad de los extractos de micelio y medio para cada una de las 18 cepas aisladas frente a *P. larvae*. Para evaluar la especificidad de la actividad de los extractos se ensayó también la actividad frente a otras cepas de bacterias como *Staphylococcus aureus* (Gram+) y *Escherichia coli* (Gram-) y frente a los hongos *Cladosporium cucumerinum* (hongo patógeno de cultivos de melón y papaya) y *Candida albicans*.

Para evaluar la riqueza química de los extractos obtenidos se realizaron también espectros de RMN^{1}H y se evaluó el comportamiento cromatográfico en capa delgada (ccd) sobre sílica.

Los únicos extractos que resultaron activos y específicos frente a *P. larvae* fueron los extractos de medio de cultivo de *Alternaria brassicicola* y *Alternaria raphani*.

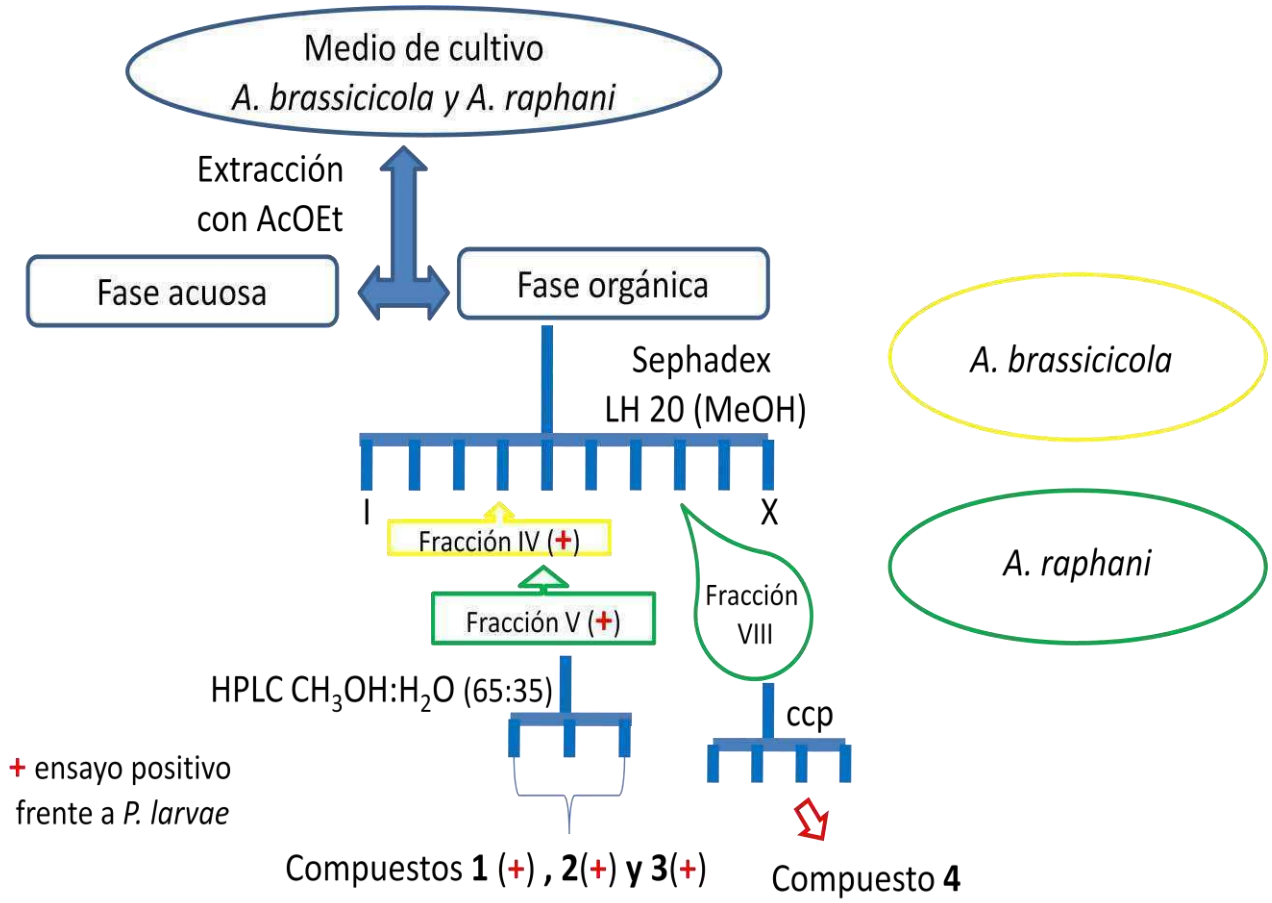
Con estos resultados se decidió entonces proceder a realizar cultivos en mayor escala de las especies *Alternaria brassicicola* y *A. raphani* para poder aislar e identificar los metabolitos secundarios responsables de esta actividad.

❖ Aislamiento de los metabolitos secundarios

Los cultivos a mayor escala obtenidos para ambas especies fueron tratados de la misma forma. Se filtraron y se trabajó únicamente con los medios de cultivo ya que como se mencionó anteriormente,

eran los únicos activos frente a *P. larvae.* Los medios de cultivo fueron extraídos exhaustivamente con AcoEt, evaporados y los extractos fueron cromatografiados en una columna semipreparativa de Sephadex LH-20. Todas las fracciones se ensayaron frente a *P. larvae* y solamente una para cada especie estudiada mostró actividad positiva. La fracción activa fue separada mediante el uso de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

La fracción activa de la cepa *A. brassicicola* (IV) rindió por HPLC los compuestos **1**, **2** y **3** mientras que la fracción activa (V) de la cepa *A. raphani* rindió solamente los compuestos **2** y **3**, idénticos espectroscópicamente a los aislados de *A. brassicicola* (esquema 1).



Esquema 1: Diagrama de extracción de *A. brassicicola* y *A. raphani*

Una de las fracciones inactivas, obtenida en la separación con la columna semipreparativa de Sephadex LH-20 de *A. raphani*, presentó varias manchas de buen aspecto al ser estudiada por ccd y su espectro de RMN-^{1}H mostró la presencia de un compuesto mayoritario que poseía una estructura química interesante. Esta fracción fue purificada mediante cromatografía en capa delgada preparativa aislándose el compuesto **4**.

❖ Elucidación estructural de los compuestos aislados

La elucidación estructural de todos los compuestos aislados se llevó a cabo mediante el uso de técnicas espectroscópicas como RMN 1D y 2D, además de espectrometría de masa.

El ión molecular obtenido para los compuestos **1** y **2** fue m/z 197 (ionización por electrones, 70 eV) y fue confirmado tanto por ionización química como por FAB, ($[M+H]^+$ m/z 198). El valor impar hallado para el ión molecular sugirió que ambas moléculas poseían un átomo o un número impar de átomos de N en su estructura.

Teniendo en cuenta este dato y el número de señales observadas en el espectro de RMN-^{13}C se propuso la siguiente fórmula mínima $C_{10}H_{15}NO_3$ para los compuestos **1** y **2**, lo que indicaba que la molécula poseía 4 insaturaciones.

El espectro RMN-^{1}H (CD_3OD) del compuesto **1** (figura 13) mostraba un doblete a 3.91 ppm (J=2.9 Hz) correspondiente a un hidrógeno, un singulete a 2.41 ppm que integraba para 3 H, dos multipletes a 1.92 y 1.28-1.57 ppm correspondientes a 1 y 2 H respectivamente y por último dos señales que integraban para 3 H cada una, un triplete a 0.96 ppm (J=7.3 Hz) y un doblete a 0.76 ppm (J=6.6 Hz).

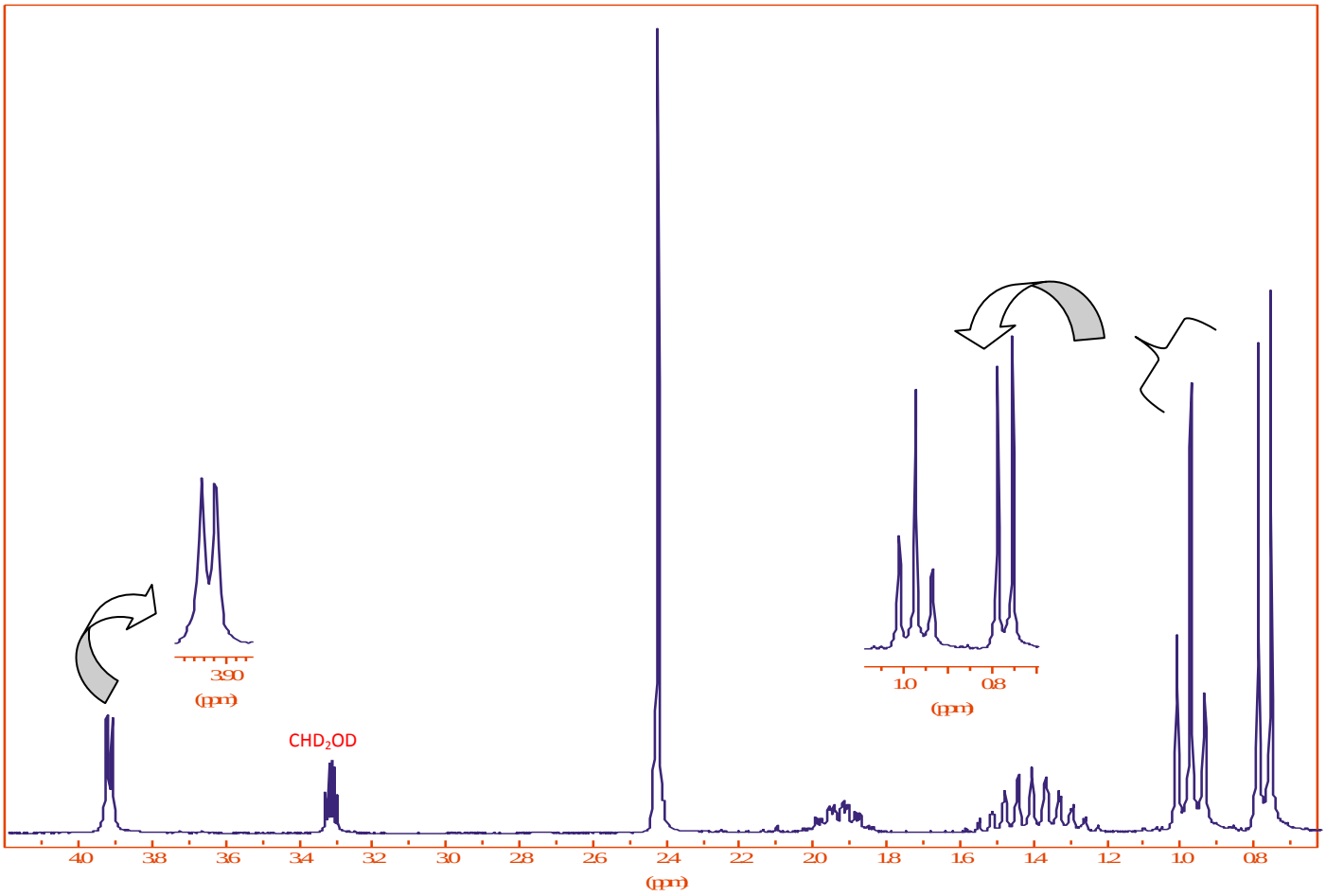


Figura 13: Espectro RMN-^{1}H del compuesto **1** (CD_3OD)

Todas las señales, exceptuando el singulete a 2.41 ppm, resultaban similares a las informadas en literatura para el aminoácido isoleucina, en el cual un grupo etilo y uno metilo se hallan unidos a un metino vecino al carbono α del aminoácido, tal como se muestra en la figura 14[10].

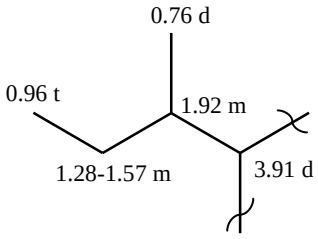


Figura 14: Estructura parcial del compuesto **1**

En el espectro de RMN-^{13}C del compuesto **1** se observaban diez señales, cuatro de las cuales pertenecían a carbonos cuaternarios (δ 199.9, 187.8, 176.1 y 104.0), dos a carbonos de grupos metinos (δ 66.3 y 38.0), una sola a un carbono de un grupo metileno (δ 27.6) y tres a carbonos de metilos (δ20.4, 13.3, 12.1) asignadas según el espectro DEPT 135. Los valores de desplazamiento químico de las señales a 199.9, 187.8, 176.1 ppm indicaban la presencia de distintos tipos de carbonilos α,β – insaturados.

Teniendo en cuenta estos datos, el peso molecular y con la ayuda de la base de datos Antibase 2000[11], pudo proponerse la estructura de la figura 15.

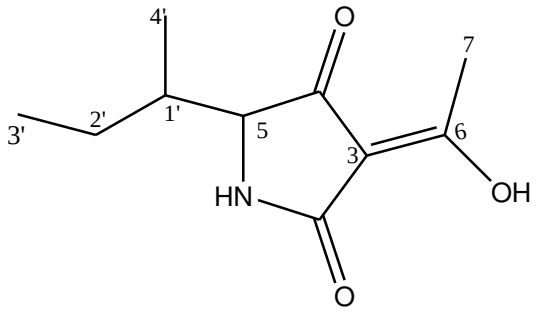


Figura 15: Estructura propuesta para el compuesto **1**

Consultando con los datos de literatura[11, 12] se pudo confirmar que el compuesto **1** era 5-*sec*-butil-3-(1-hidroxietiliden)-pirrolidin-2,4-diona, conocido como ácido tenuazónico. La elucidación de la estereoquímica absoluta se comenta más adelante.

La diferencia fundamental entre los espectros de RMN-^{1}H de los compuestos **1** y **2** (figura 16), se encontraba en las señales observadas a campos más altos, donde para el compuesto **1** se observaba un doblete a δ 0.76 y un triplete a δ 0.96 ppm, en cambio para el compuesto **2** se observaba un doblete a δ 0.99 ppm y un triplete a δ 0.90 ppm.

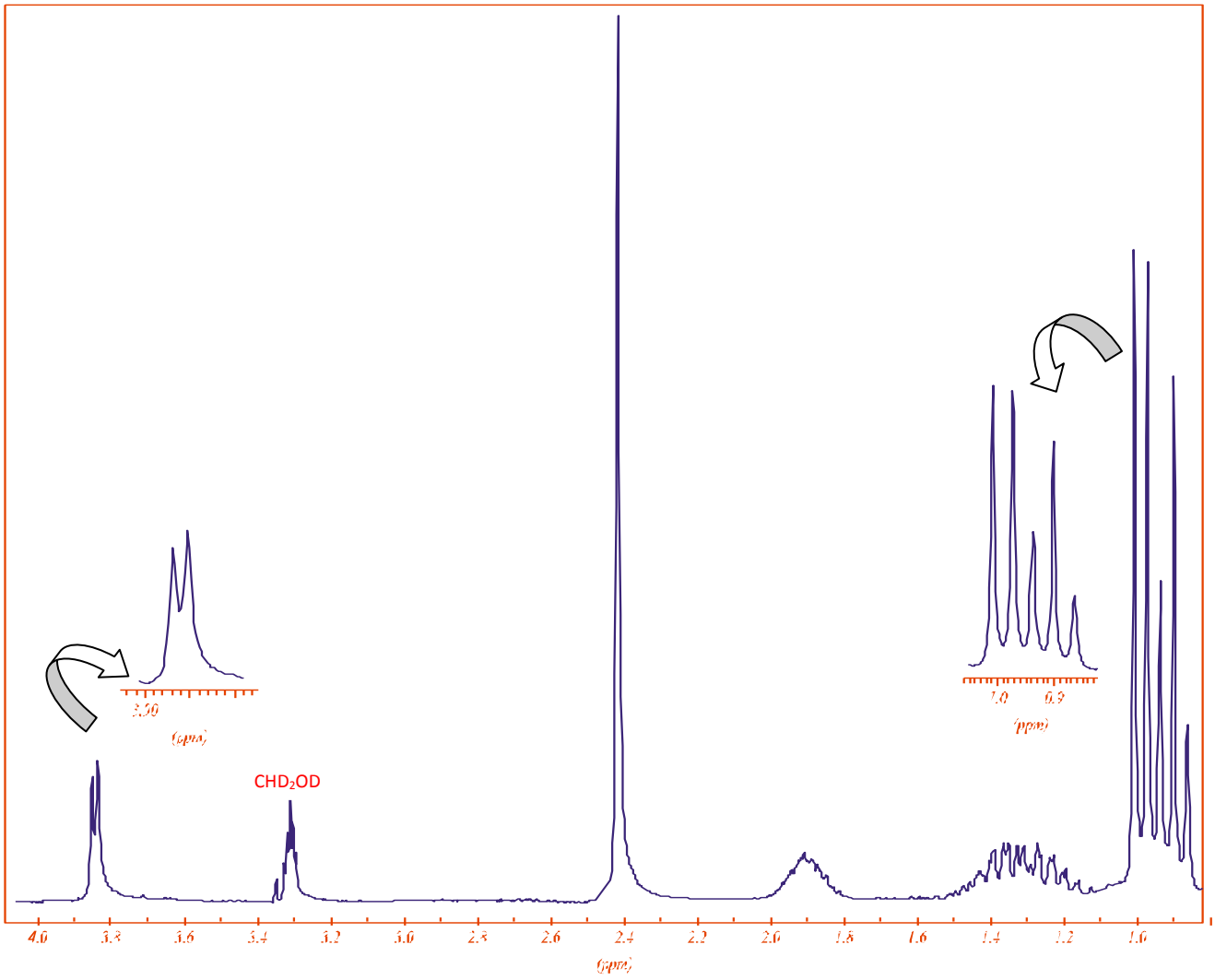


Figura 16: Espectro RMN-^{1}H del compuesto **2** (CD_3OD)

Con estos datos se supuso entonces que el compuesto **2** podría ser un compuesto diasterómero de **1.** La elucidación de la esteroquímica absoluta se comenta más adelante.

Para el compuesto **3** se procedió de la misma manera para realizar la elucidación estructural. El mismo presentó un ión molecular a m/z 183 (EM-EI, 70 eV) y 9 señales en el espectro de RMN-^{13}C, por lo cual se pudo deducir que su fórmula mínima era $C_9H_{13}NO_3$, conteniendo entonces igual número de insaturaciones que los compuestos **1** y **2**.

El espectro de RMN-^{1}H de **3** (figura 17) resultó muy similar a los observados para los compuestos **1** y **2**, presentando como diferencia principal un patrón diferente en la región de campos altos. Este espectro mostró dos dobletes a δ 1.02 y 0.82 que integraban para 3 H cada uno y un multiplete a δ 2.13. Este dato indicaba la presencia de dos grupos metilos unidos a un metino y por lo tanto el reemplazo de la isoleucina base de la estructura de los compuestos **1** y **2** por una valina en el compuesto **3**, como se muestra en la figura 18.

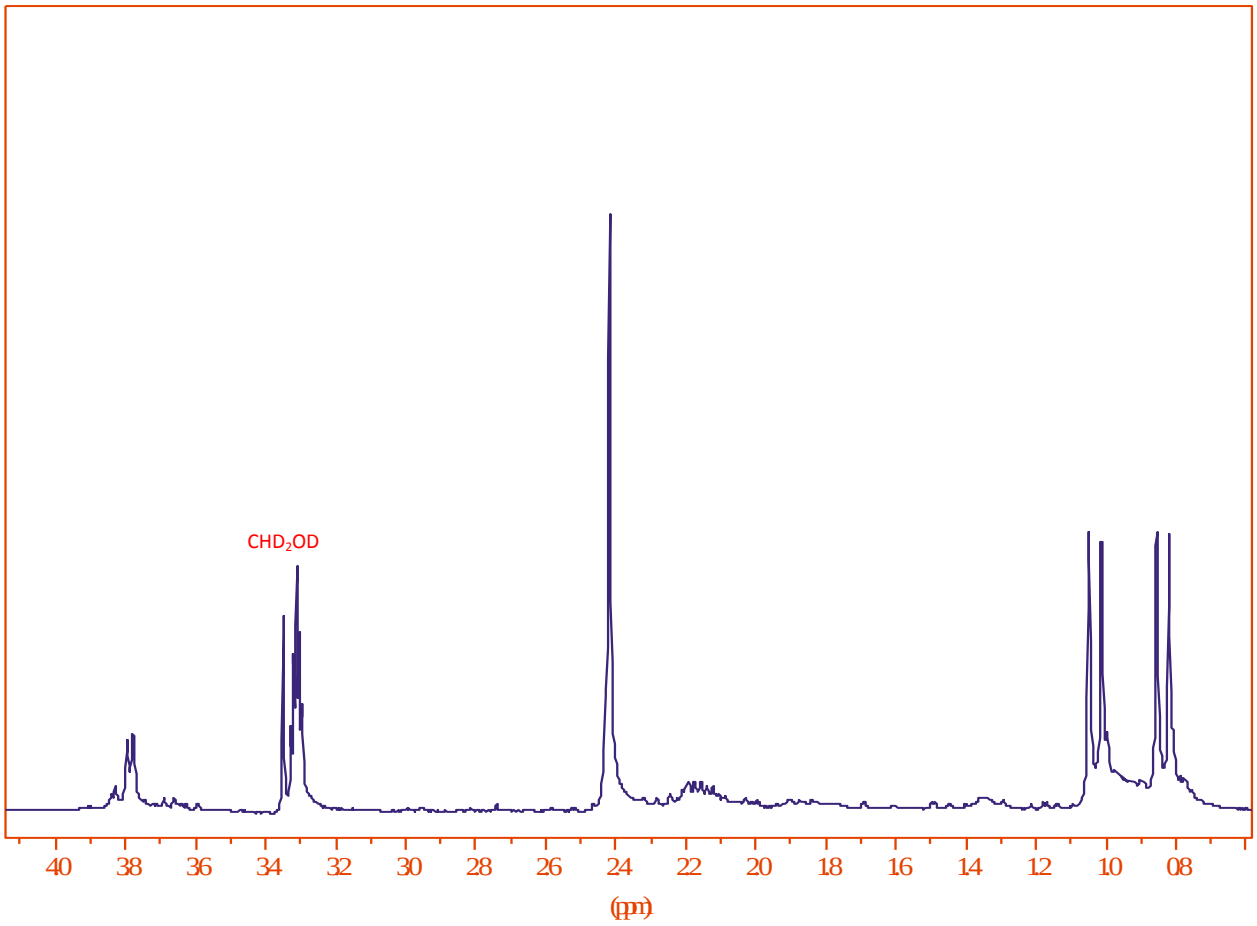


Figura 17: Espectro RMN-^{1}H del compuesto **3** (CD_3OD)

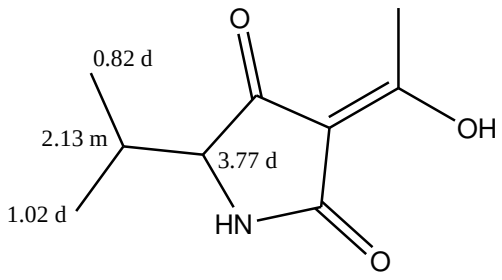


Figura 18: Estructura del compuesto **3**

Con toda esta información y con la ayuda de datos bibliográficos [12, 13] se pudo deducir la estructura perteneciente al compuesto **3** como 5- isopropil-3-(1-hidroxietiliden)-pirrolidin-2,4-diona (figura 18).

Las asignaciones de los diferentes fragmentos observados en los espectros de masa para los compuestos **1**, **2** y **3**, confirman las estructuras propuestas (figuras 19 y 20).

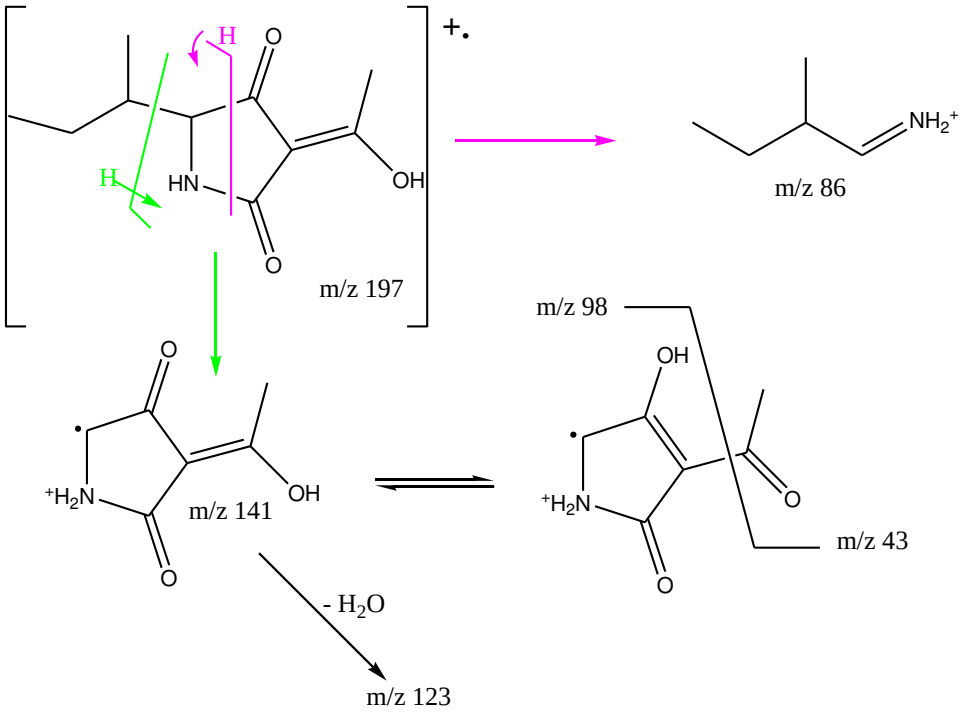


Figura 19: Fragmentaciones observadas para los compuestos **1** y **2** (EM EI, 70 eV)

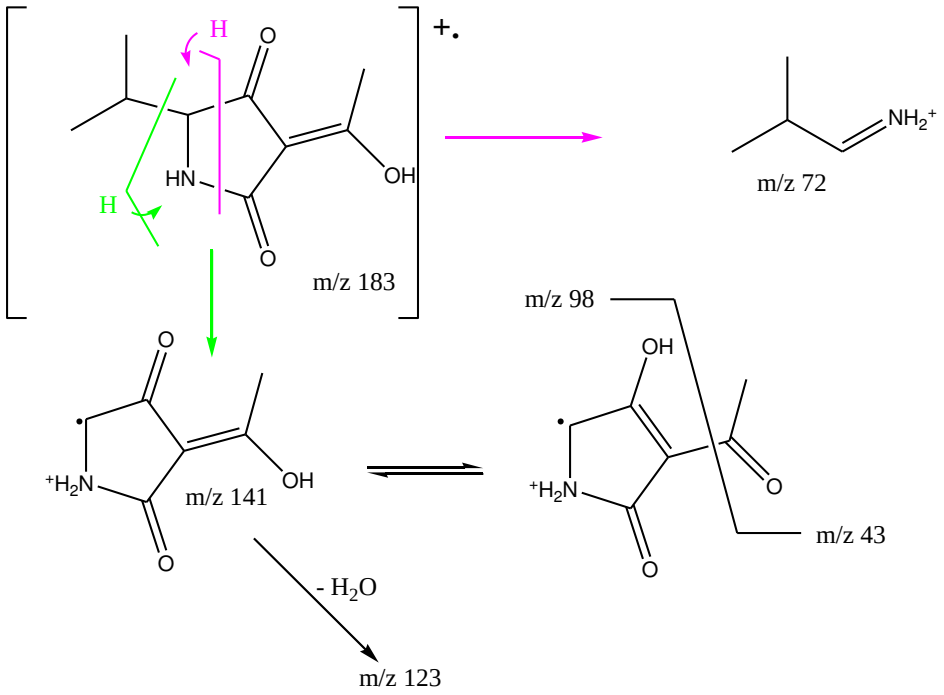


Figura 20: Fragmentaciones observadas para el compuesto **3** (EM EI, 70 eV)

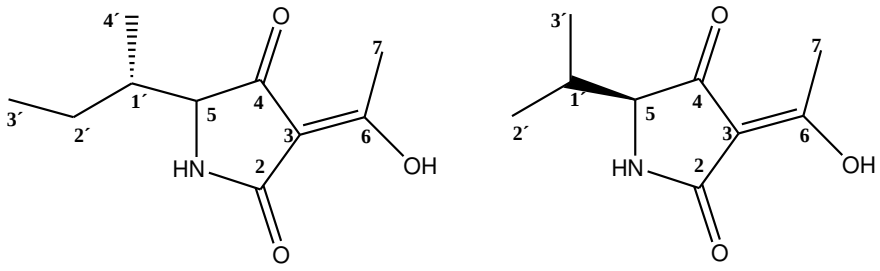
Nota: no se realizó un estudio de genética iónica para confirmar la identidad de los iones observados.

Para determinar la configuración absoluta de los compuestos aislados, éstos fueron oxidados utilizando el reactivo de Jones[14], purificados mediante un cartucho de extracción en fase sólida con CH_2Cl_2-MeOH (8:2) como fase móvil y finalmente hidrolizados por calentamiento a 120°C por 8 horas con HCl 6M. Los aminoácidos obtenidos fueron derivatizados[15] como los correspondientes *N*-pentafluoropropill ésteres de isopropilo e inyectados en un cromatógrafo gaseoso con una columna Chirasil-Val. Los patrones utilizados fueron preparados por el mismo método, derivatizando los correspondientes aminoácidos comerciales. Se compararon los tiempos de retención de los estándares con los obtenidos para los derivados de los compuestos **1**-**3** pudiéndose determinar su configuración absoluta (tabla 1). A modo de confirmación se realizaron co-inyecciones.

Derivado	t_R(min)
L-Val	5.55
D-Val	6.24
D-*allo*-Ile	7.75
D-Ile	8.11
L-*allo*-Ile	8.19
L-Ile	8.44
1	7.75
2	8.44
3	5.55

Tabla 1: Tiempos de retención de los derivados de aminoácidos

Se pudo así identificar al compuesto **1** como (5R, 1´S) 5-*sec*-butil-3-(1-hidroxietiliden)-pirrolidin-2,4-diona o ácido D-*allo*-tenuazónico, al compuesto **2** como (5S,1´S) 5-*sec*-butil-3-(1-hidroxietiliden)-pirrolidin-2,4-diona o ácido L-tenuazónico y al compuesto **3** como 5S-isopropil-3-(1-hidroxietiliden)-pirrolidin-2,4-diona (figura 21).



1: 5R
2: 5S

3

Figura 21: Estructuras de los compuestos **1-3**

Los compuestos **2** y **3** habían sido informados previamente[16], no así el compuesto **1**.

Cabe destacar que en el espectro RMN-^{1}H del compuesto **1** se observó la presencia de otro juego de señales (figura 22). Este hecho se debe al equilibrio tautomérico ceto-enólico que pueden presentar los ácidos tetrámicos.

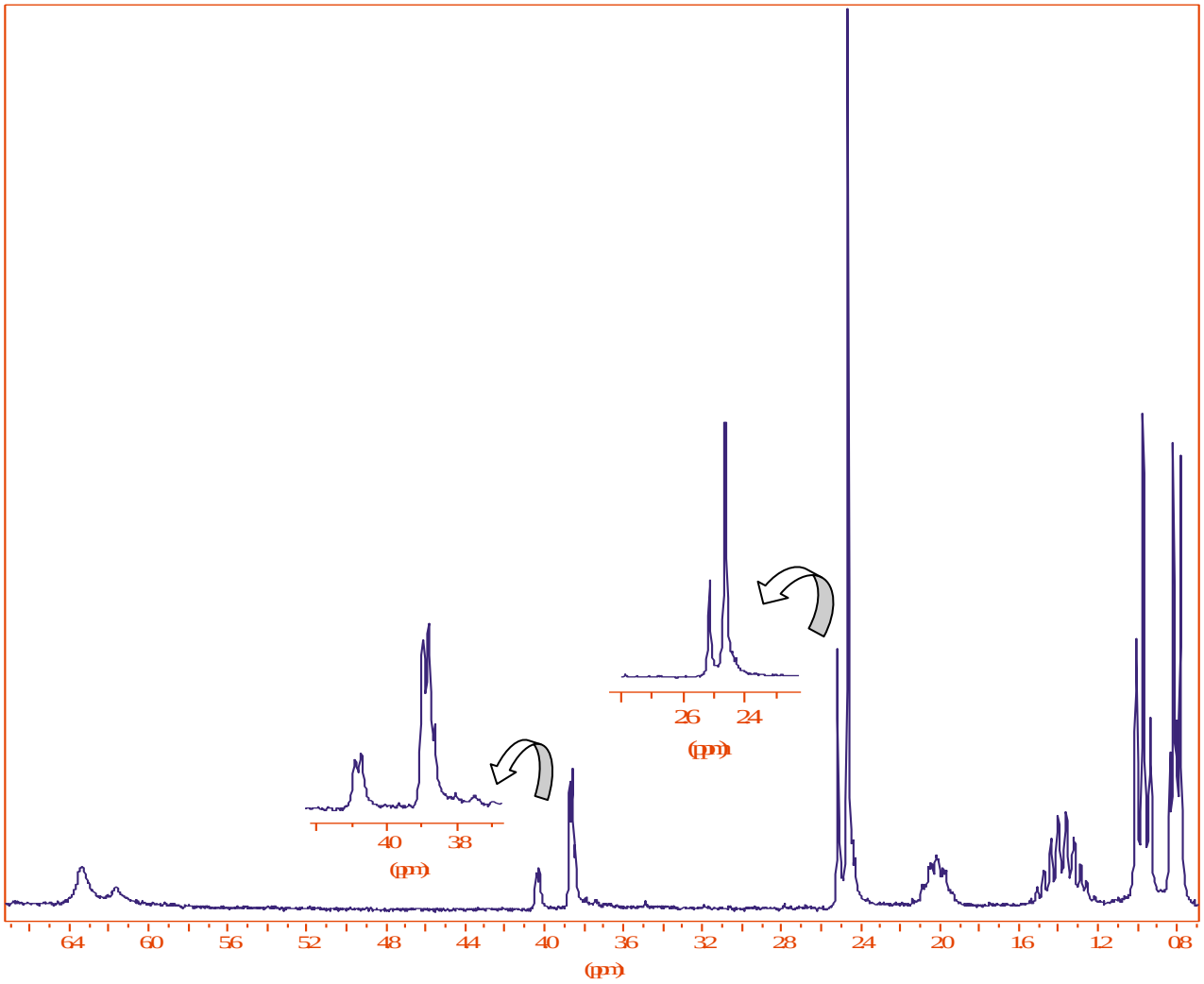


Figura 22: Espectro RMN^{1}H del compuesto **1** ($CDCl_3$)

Los ácidos 3-aciltetrámicos pueden en principio formar diferentes tautómeros de los cuales solamente 4 son detectables en solución. Dos pares de tautómeros se interconvierten internamente en forma muy rápida, **Ai/Aii** y **Aiii/Aiv** a través de la transferencia de un protón a lo largo de la unión

hidrógeno intramolecular[17, 18] (figura 23). Este hecho es demasiado veloz como para poder ser detectado en la escala de tiempo de los experimentos de RMN.

La interconversión externa de tautómeros, **Ai/Aii** ⇌ **Aiii/Aiv,** en cambio está dada por el efecto de rotación de la cadena lateral[19] y puede detectarse por RMN, observándose por este motivo dos juegos de señales en el espectro RMN-^{1}H en $CDCl_3$.

Como la relación entre los diferentes tautómeros puede verse afectada por el intercambio del hidrógeno unido al N en el anillo pirrolidínico con el solvente prótico deuterado utilizado, pueden obtenerse diferentes espectros de RMN utilizando diferentes solventes[19].

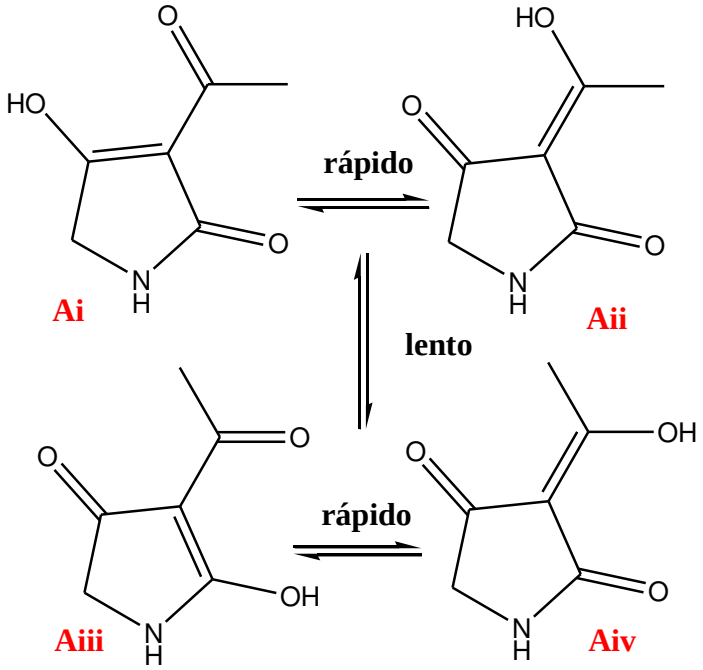


Figura 23: Equilibrio tautomérico de los ácidos 3-aciltetrámicos.

Como se mencionó anteriormente, se aisló de *A. raphani* una fracción inactiva que rindió por ccd preparativa el compuesto **4** químicamente interesante (esquema 1).

El ión molecular obtenido para el compuesto **4** fue m/z 352 (EM/EI, 70 eV).El espectro de RMN-^{13}C del compuesto **4** presentaba veinte señales, dos de las cuales podían corresponder a carbonilos de cetona α, β insaturados (205.3 y 203.0 ppm), dos a carbonos aromáticos sustituidos probablemente por hidroxilo (161.9 y 161.6 ppm), diez carbonos aromáticos con desplazamientos químicos muy similares y

una a un carbono cuaternario unido a oxígeno (69.1 ppm). El resto de las señales correspondían a carbonos alifáticos hidrogenados.

En el espectro de RMN ^{1}H de este compuesto (figura 24), se observaban cuatro dobletes (d 7.85, 7.82, 7.08 y 7.02) pertenecientes a 1 H cada uno, con un acoplamiento de 8.8 Hz correspondiente a sustitución orto, en la zona de protones aromáticos. Este hecho estaría indicando la presencia en la molécula de dos anillos aromáticos, los cuales poseerían dos hidrógenos en posición orto cada uno. En el espectro COSY se observaron correlaciones entre las señales a δ 7.08 y δ 7.85 y entre las señales a δ 7.02 y δ 7.82.

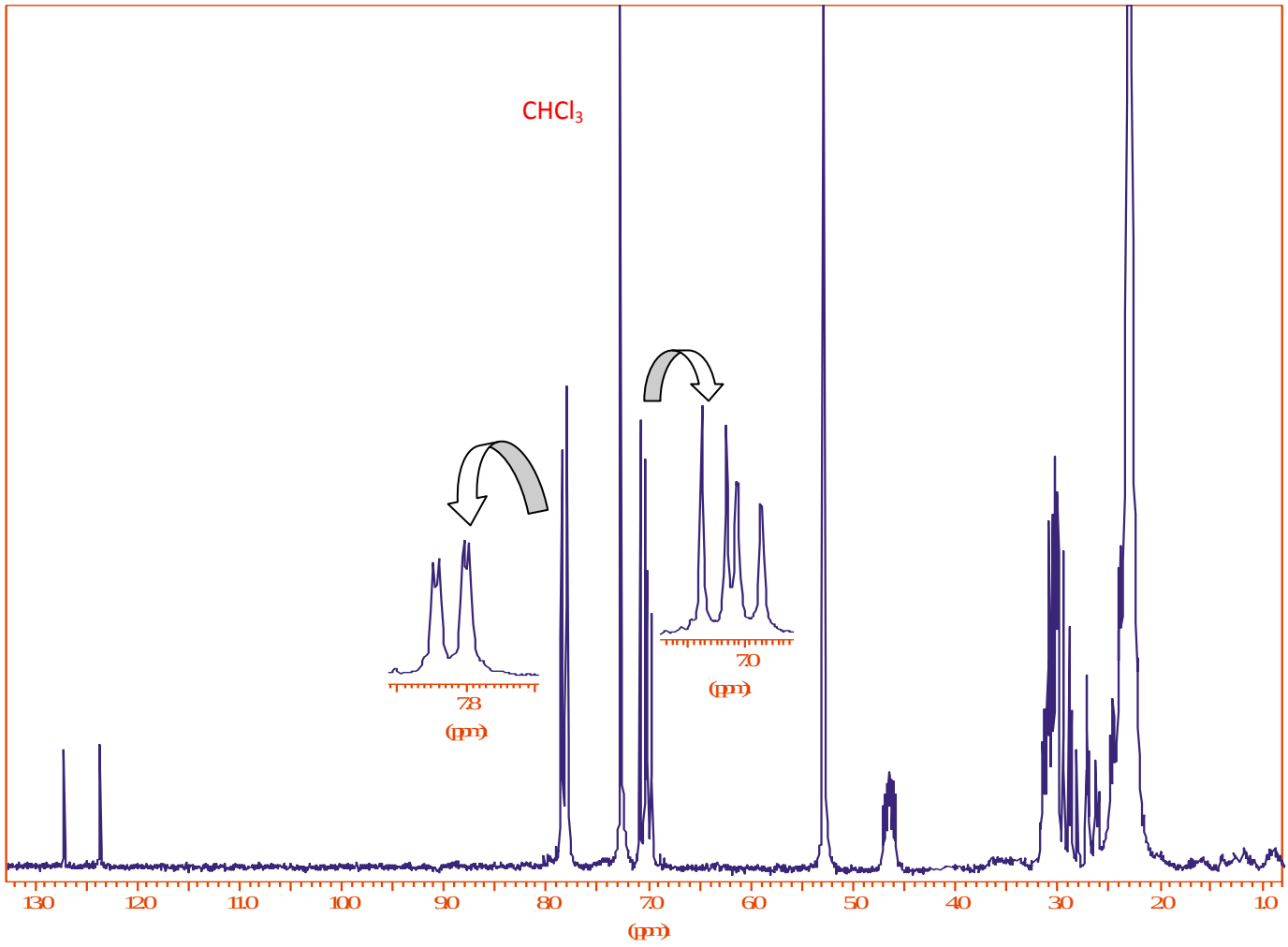


Figura 24: Espectro RMN ^{1}H del compuesto **4** ($CDCl_3$)

En el mismo espectro de correlación pudo observarse que el multiplete a δ 4.67, correspondiente a un metino probablemente unido a un hidroxilo, correlacionaba con la señal a δ 3.07 y con el multiplete a δ 2.90-3.08. También se observó correlación entre dos señales correspondientes a metilenos, δ 2.68 y 3.17 con δ 2.44 y 3.05.

Estos resultados indicaron las siguientes estructuras parciales:

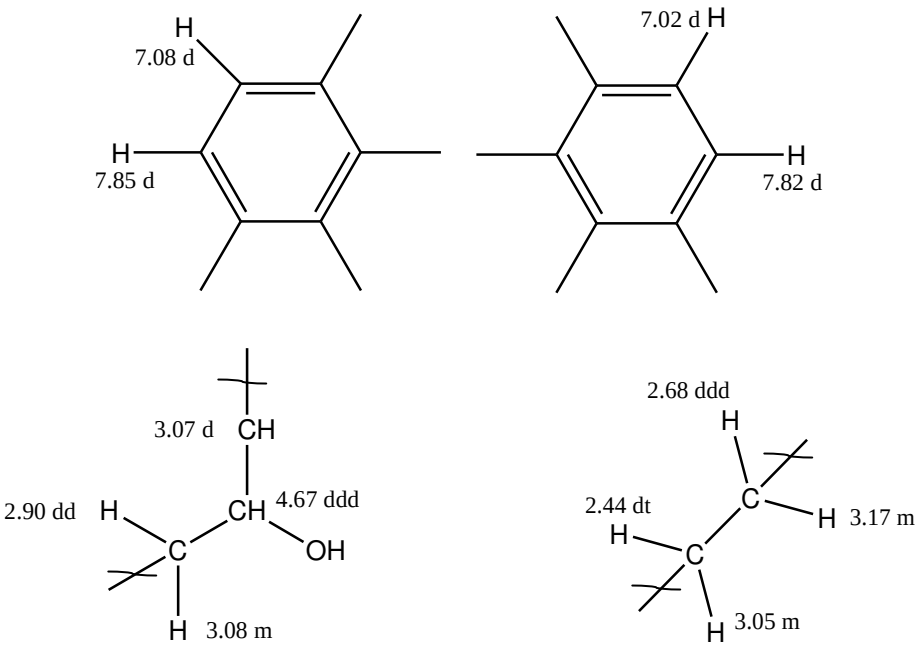


Figura 25: Estructuras parciales correspondientes al del compuesto **4**

Como siguiente paso se realizó una búsqueda de estructuras en la base de datos Antibase 2000[11], ingresando las subestructuras deducidas, obteniendo como resultado la molécula conocida como **Altertoxina I** (figura 26).

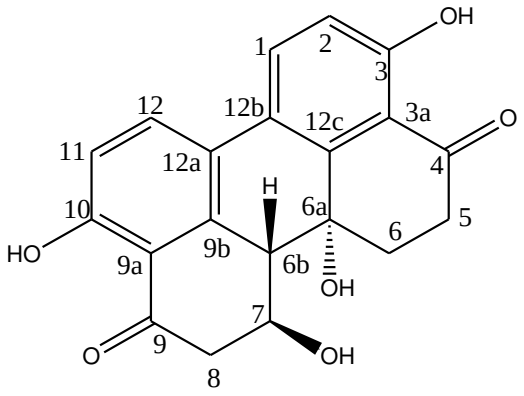


Figura 26: Estructura del compuesto **4**: Altertoxina I

Este compuesto fue previamente aislado y caracterizado a partir de un cultivo de *A. alternata*, en el año 1986[20]. Los datos espectroscópicos obtenidos para el compuesto **4** son coincidentes con los informados en literatura[20].

❖ Actividad biológica

Los compuestos aislados puros se sometieron a ensayos de actividad antibiótica.

Los resultados observados para los compuestos **1** y **3** en el ensayo de actividad frente a *P. larvae* fueron levemente positivos, con halos de inhibición de 4 y 5 mm respectivamente, mientras que el compuesto **2** resultó ser el más activo en estos ensayos con 12 mm de halo.

Por este motivo se determinó frente a diferentes cepas de *P. larvae*, el valor de concentración mínima de inhibición (MIC) para el compuesto **2** mediante los métodos de difusión sobre agar[21] y dilución.

En los ensayos de actividad frente a *P. larvae* se utilizaron como testigos oxitetraciclina, una droga sintética comercial, que como se indicó en la introducción tiene un uso regulado; y gentamicina, un antibiótico comercial de amplio espectro. Puede observarse en la tabla 2 que los valores de MIC del compuesto **2** son comparables tanto con oxitetraciclina como con gentamicina y que los MIC obtenidos para gentamicina utilizando el método de dilución son menores que los hallados para **2** y oxitetraciclina

utilizando el método de difusión. Esto puede deberse probablemente a la mayor polaridad de la gentamicina cuya distribución en el medio acuoso se ve favorecida[21].

Cabe destacar que la actividad se probó sobre 6 cepas de *P. larvae* aisladas de colmenas infectadas ubicadas en el apiario de INTA Balcarce.

Compuesto	Cepa					
	A	C	I	II	III	IV
2[a]	1.0	1.0	1.0	1.0	5.0	1.0
oxitetraciclina [a]	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
gentamicina [a]	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
2[b]	32	32	32	32	32	32
oxitetraciclina [b]	64	32	32	32	16	16
gentamicina [b]	2	16	4	4	8	8

[a] MIC medido en μg/disco determinado mediante el método de difusión sobre agar

[b] MIC medido en μg/ml determinado mediante el método de dilución

Tabla 2: Valores de MIC obtenidos para el compuesto **2** y para antibióticos comerciales frente a 6 cepas de *P. larvae*

Para evaluar la especificidad de la actividad antimicrobiana de los compuestos aislados se realizaron ensayos frente a otras bacterias como *Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus, Escherichia coli* y también frente a *Candida albicans*, siendo todos los resultados negativos. Cabe mencionar que en un estudio previo se había determinado que el ácido L-tenuazónico no poseía actividad antibiótica frente a numerosas cepas de bacterias y levaduras[22].

Esto indica que el compuesto **2** posee una muy buena actividad y especificidad frente a *P. larvae.*

En trabajos anteriores se había informado sobre la actividad antiviral[23] del ácido tenuazónico frente a parainfluenza-3, vaccinia y herpes simplex, su efecto inhibidor de crecimiento del adenocarcinoma humano[23] a través de la inhibición de la incorporación de aminoácidos a las proteínas microsomales[24] en huevos embrionarios y su escasa actividad como antibiótico[22]. Este último ensayo había sido realizado tanto con el ácido tenuazónico como con el ácido D-*allo*- tenuazónico frente a 31 cepas de bacterias y 48 levaduras arrojando resultados negativos.

Debido a su promisoria actividad antitumoral se estudió la toxicidad que poseen estos compuestos sobre ratones machos, siendo su LD_{50} moderada (125 mg/kg $\pm$ 10) [23]. Todos estos ensayos de bioactividad fueron realizados con compuestos de origen sintético[22].

Si bien la actividad biológica del ácido L-tenuazónico ha sido estudiada en profundidad no se había informado con anterioridad su actividad específica frente a *P. larvae* ni la de ningún otro producto natural o sintético.

Acerca de la actividad biológica del compuesto **4**, se ha informado su fitotoxicidad en cultivos de lechuga en particular[25] y su actividad mutagénica[20].

❖ Biosíntesis

Se han realizado estudios sobre la biosíntesis del ácido L-tenuazónico y algunos derivados[26], para lo cual el microorganismo apropiado fue cultivado en medios con distintos aminoácidos (L-valina, L-leucina[27] o L-norvalina[28]) y ácido acético marcados con ^{14}C. Se propusieron inicialmente dos rutas biosintéticas que se muestran en la figura 27.

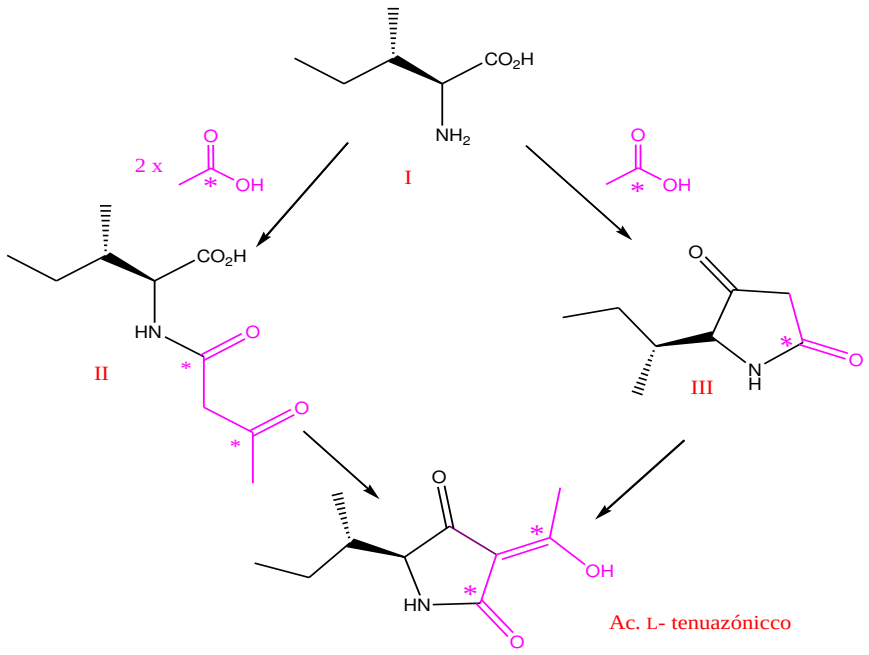


Figura 27: Ruta biosintética propuesta para el ácido L-tenuazónico[19]

En estos estudios[29, 30] se pudo aislar y caracterizar al compuesto II pero no la especie III. Con este hecho experimental se concluyó que la ruta ocurre vía ciclación de II más que por acetilación del compuesto III.

❖ Antecedentes de compuestos acil tetrámicos.

La estructura química base de los ácidos tetrámicos es encontrada en varios y distintos tipos de productos naturales tanto terrestres como marinos. Estos compuestos han sido aislados de esponjas, cianobacterias, bacterias y hongos. En los últimos 20 años se han publicado numerosos trabajos relacionados con este tipo de compuestos debido al gran espectro de actividades biológicas que poseen y a que son un reto interesante para los químicos que se especializan en síntesis orgánica.

Los ácidos tetrámicos fueron descubiertos en 1957[16]. Desde esa fecha hasta la actualidad se han aislado e identificado más de 150 derivados, se ha estudiado la biosíntesis de los mismos, sus variadas actividades biológicas y diferentes estrategias sintéticas.

En 1993, Henning y colaboradores[31], y en 2003, Ghisalberti[32] y Gossauer[33], publicaron importantes compilaciones acerca de la síntesis[27], biosíntesis y modificaciones sintéticas de estos compuestos.

El ácido L- Tenuazónico (compuesto **2**) fue aislado de diferentes especies como *Alternaria tenuis*[16], *Pyricularia oryzae*[28] y *Aspergillus sp*[23].

El ácido D-*allo*-tenuazónico (compuesto **1)** fue previamente sintetizado por Poncet y colaboradores en el año 1990[13] pero nunca antes había sido informado como producto natural. Debido a que los cultivos de las dos cepas estudiadas fueron tratados de igual modo y que el compuesto **1** fue aislado únicamente de *A. brassicicola*, puede suponerse que no se trata de un artefacto producido por racemización durante el aislamiento.

Los ácidos 3-acil tetrámicos son los más frecuentes e interesantes desde el punto de vista farmacológico ya que poseen la habilidad de quelar iones de metales indispensables y de mimetizar a los grupos fosfonato en el sitio de acción de quinasas y fosfatasas[34, 35] .

Como ejemplos se pueden citar a los **aurantósidos A** y **B** (figura 28), ácidos tetrámicos glicosidados citotóxicos, aislados en 1991 de la esponja *Theonella sp.* colectada en la isla Hachijo, Japón[36],

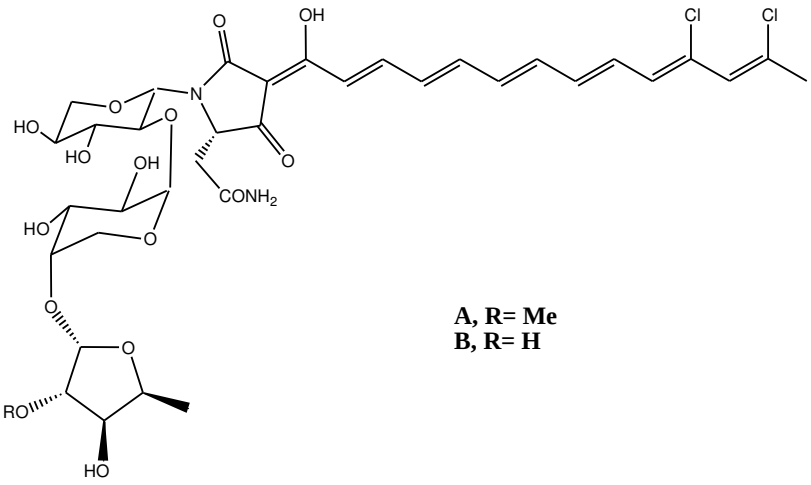


Figura 28: Aurantósidos A y B

el **ácido ravénico** (figura 29), antibiótico activo frente a cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina, obtenido a partir del cultivo del hongo *Penicillium sp*. [37] y

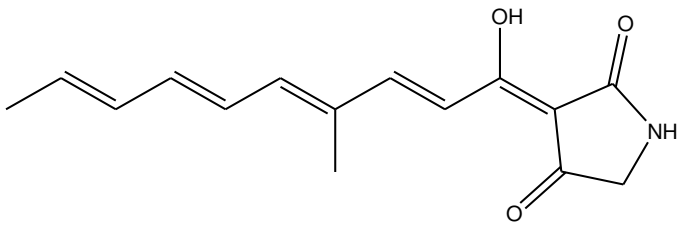


Figura 29: Ácido ravénico

la **lidicamicina** (figura 30), ácido tetrámico con esqueleto octahidronaftaleno, activo frente a las bacterias gram positivas *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus,* aislado del actinomicete *Streptomyces lydicus*[38]**.**

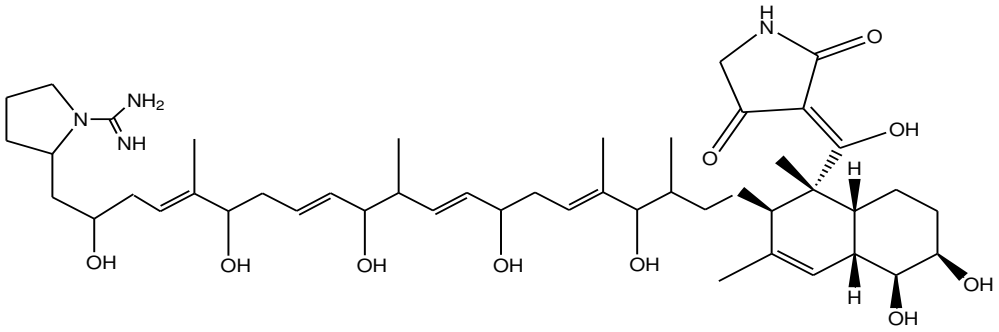
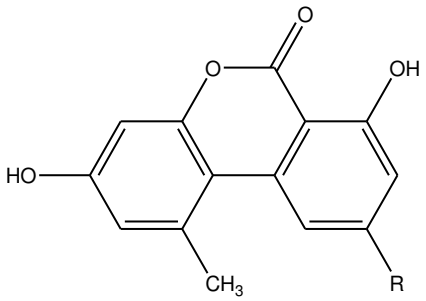


Figura 30: **lidicamicina**

❖ Antecedentes de compuestos aislados de otras cepas del mismo género.

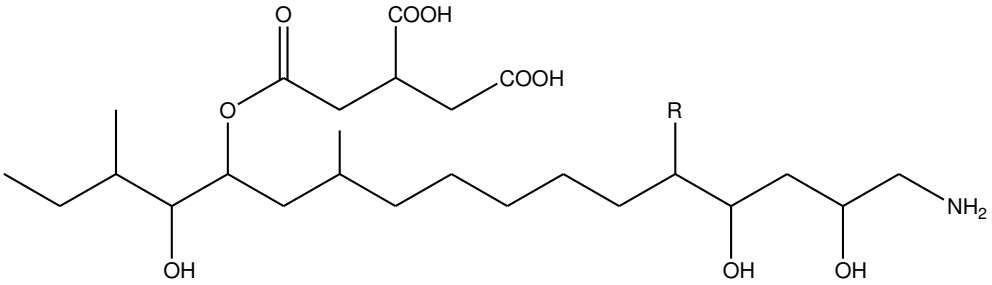
El género *Alternaria* es conocido por producir una amplia variedad de metabolitos secundarios, los cuales fueron utilizados para diferenciar especies morfológicamente similares, especialmente entre las que poseen esporas pequeñas[39]. Entre los compuestos aislados de diferentes especies de *Alternaria* pueden citarse, alternariol y metiléter de alternariol (figura 31), producidos por *A. tenuis*[40, 41],



alternariol R = OH
metiléter de alternariol R = OCH_3

Figura 31: Metabolitos aislados de *A. tenuis*

las toxinas AAL (figura 32), análogas a las fumonisinas, producidas por *A. arborescens* que inducen apoptosis en células renales tumorales de mono e inhiben la biosíntesis de esfingolípidos en hepatocitos de rata[42] y

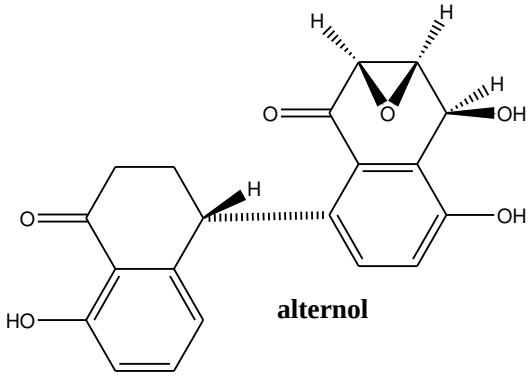


toxinas AAL

TA R = OH
TB R = H

Figura 32: Metabolitos producidos por *A. arborescens*

alternol (figura 33), compuesto que inhibe la proliferación e induce apoptosis en la línea celular A 2780 (cancerígenas ováricas humanas)[43] producido por *A. alternata.*



alternol

Figura 33: Metabolito producido por *A. alternata*

❖ Conclusión

En la búsqueda de antibióticos específicos frente a *P. larvae*, a partir de un extracto del cultivo de *A. raphani* y *A. brassicicola*, se aislaron e identificaron cuatro metabolitos **1** a **4**, de los cuales el compuesto **2** (ácido tenuazónico) ha demostrado poseer actividad antibiótica específica frente a *P. larvae* comparable a la de la oxitetraciclina *in vitro*.

A pesar de la importante y selectiva actividad presentada por este compuesto, que podría sugerir la utilización de ambas especies *A. raphani* y *A brassicicola* como agentes de biocontrol, la presencia de la toxina altertoxina I desaconsejaría este uso, ya que probablemente los metabolitos de los hongos presentes en polen puedan dejar residuos en la miel u otros productos apícolas, como así lo hacen los antibióticos de amplio espectro utilizados indiscriminadamente por los apicultores.

El compuesto **1** no había sido previamente aislado como producto natural.

Este trabajo dio origen a una publicación[44].

❖ Detalles experimentales

La cepas estudiadas de los hongos *A. brassicicola* (Schw.) Wiltshire y *A. raphani* Groves & Skolko fueron aisladas de polen, clasificadas por la Dra. Nora Peña y depositadas en el cepario de hongos de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, Argentina (BAFC).

Cultivo de *A. brassicicola* y *A. raphani*

En una primera etapa se realizaron cultivos de cada una de las especies estudiadas, *A. brassicicola* (Schw.) Wiltshire y *A. raphani* Groves & Skolko en cajas de Petri con agar malta. Cuando estos cultivos estuvieron bien crecidos se cortaron porciones pequeñas de 1 cm por 1 cm aproximadamente para inocular 4 erlenmeyers de 125 ml conteniendo 75 ml cada uno de medio de cultivo líquido de extracto de malta al 30⁄ , detallado en la parte experimental general. A la semana, estos cultivos líquidos fueron utilizados como inóculo de 4 cultivos de 1 litro cada uno contenidos en erlenmeyers de 4 litros con el mismo medio. La fermentación fue llevada a cabo a 25°C por 15 días bajo

condiciones estáticas. Los tiempos y las condiciones óptimas fueron determinados previamente en experimentos de escala menor.

Extracción y fraccionamiento de *A. brassicicola* y *A. raphani*

Ambos cultivos fueron filtrados, separando el medio de cultivo del micelio del hongo. El micelio fue descartado, ya que en estudios previos se había determinado que no poseía la bioactividad buscada y el medio de cultivo fue extraído con acetato de etilo (6 x 500ml). La masa de extracto obtenida fue de 1 g para *A. brassicicola* y 1.5 g para *A. raphani*. Ambos extractos fueron fraccionados en una columna semipreparativa (de 80 cm de largo y 3.5 cm de diámetro interno) con Sephadex LH-20 como fase fija y metanol como fase móvil.

Se recogieron 6 fracciones de 200 ml cada una para *A. brassicicola* (ALB) y 8 para *A. raphani* (ALR). Las fracciones ALB IV (400 mg) y ALR V (630 mg) fueron las que brindaron resultados positivos en los ensayos de actividad antibacteriana frente a *P. larvae*. La purificación de estas fracciones se llevó a cabo mediante HPLC, utilizando una columna de fase reversa (YMC C-18, 5 μm, 20 x 250 mm) y una mezcla de CH_3OH:H_2O (65:35) como eluyente (flujo 5 ml/min). De esta separación se obtuvieron el compuesto **1** (65 mg), el compuesto **2** (60 mg) y el compuesto **3** (2 mg) para *A. brassicicola* y el compuesto **2** (49 mg) y el compuesto **3** (1mg) para *A. raphani.*

La fracción ALR VIII (53,1 mg) del extracto de *A. raphani*, fue separada mediante cromatografía en capa delgada preparativa sobre sílica gel, utilizando como fase móvil CH_2Cl_2: AcOEt (80:20). De esta separación se obtuvo el compuesto **4**, altertoxina I (5,3 mg) (R_F=0.5).

Determinación de la configuración absoluta de los compuestos 1-3.

Un miligramo de cada compuesto fue disuelto en acetona y oxidado con 1 ml del reactivo de Jones[14]. El producto crudo obtenido fue transferido en su totalidad a un cartucho de extracción en fase sólida (LC-Si, 3ml, Sigma Aldrich), y el eluído con Cl_2CH_2- MeOH (80:20), evaporado en rotavapor. Al residuo anterior se le agregaron 0.3 ml de HCl 6M, se calentó a 120°C por 8 h y posteriormente se evaporó hasta sequedad.

Los aminoácidos así obtenidos y los aminoácidos patrones fueron derivatizados utilizando el Kit comercial PFP-IPA de Alltech, según el siguiente procedimiento general. Se colocan 1 mg de aminoácido en un vial de reacción de 5 ml, se agregan 0.5ml de HCl 0.2M, se calienta la solución a 110°C por 5 minutos y se seca bajo atmósfera de nitrógeno. Se adicionan 1 ml de una solución de cloruro de acetilo e isopropanol (1:1), previamente preparada, al vial que contenía al aminoácido seco, calentando a 100°C por 45 min con el vial cerrado herméticamente. Cumplido el tiempo de reacción se lo destapa y se eleva la temperatura de la estufa hasta 115°C, trabajando bajo atmósfera de nitrógeno para eliminar así el exceso de reactivo. Luego el vial se enfría en un baño de hielo, se le agrega 1 ml de CH_2Cl_2 y 0.5ml del reactivo PFPA (anhídrido pentafluoropropil acético) volviéndolo a cerrar y calentar por 15 minutos más a 100°C. Una vez finalizado este tiempo se deja enfriar a temperatura ambiente y se evapora el exceso de reactivo bajo atmósfera de nitrógeno.

Para realizar el análisis cromatográfico se disolvieron las muestras en CH_2Cl_2 calidad cromatográfica. La columna capilar quiral utilizada fue Chirasil-val (Alltech, 25 m de largo y 0.25 mm de d. i.) y el programa de la rampa de temperaturas fue de 90 a 180°C a una velocidad de 4°C/min[15]. Los tiempos de retención (min) observados fueron los siguientes: L-Val (5.55), D-Val (6.24), D-*allo*-Ile (7.75), D-Ile (8.11), L-*allo*-Ile (8.19), L-Ile (8.44), compuesto **1** (7.75), compuesto **2** (8.44) y compuesto **3** (5.55). Se realizaron coinyecciones a modo de confirmación de las asignaciones.

Actividad biológica.

Actividad antibacteriana frente a *P. larvae*: Los métodos que se utilizaron son el de difusión en agar[21] y el de dilución. Por el método de difusión las diferentes cepas de *P. larvae* se sembraron sobre cajas de Petri conteniendo medio Columbia agar sangre modificado, colocando luego los discos de papel de filtro que contienen los compuestos a ensayar dentro de las mismas. Las cajas fueron incubadas en estufa a 37°C con 10⁄ de CO_2.

Las cepas de *P. larvae* se repicaron semanalmente en medio Columbia agar sangre modificado y se guardaron refrigeradas.

La descripción de la actividad antibiótica frente a *Escherichia coli, Bacillus subtilis y Staphylococcus aureus*, así como el método de dilución, se encuentran en el capítulo de detalles experimentales.

Propiedades físicas de los compuestos aislados.

Los detalles del equipamiento empleado se encuentran en el capítulo 8.

Compuesto **1** ((5R,1´S)-5-*sec*-butil-3-(1-hidroxietiliden)-pirrolidin-2,4-diona)[13]**:** aceite amarillo; **$[\alpha]_D^{25}$** :+93˚ (c = 0.65, MeOH); **UV**(CH_2Cl_2) $\lambda_{máx}$ (log ε) : 275 nm (4.30); **FTIR** (KBr) $\nu_{máx}$: 3300 (OH), 2966 (CH), 2930 (CH), 2880 (CH), 1654 (CO), 1626 (CO), 1469, 1384, 1227 cm^{-1} . **EM- EI** (70 eV) *m/z* (AR): 197 ($[M]^{+\cdot}$, 1), 182 ($[M\text{-}CH_3]^+$, 1), 168 ($[M\text{-}C_2H_5]^+$, 3), 141 ($[M\text{-}C_4H_8]^{+\cdot}$, 100), 123 ($[141\text{-}H_2O]^{+\cdot}$, 19), 98 (12), 86 (13), 84 (15), 43 (92). **EM- CI (**modo **+, CH_4)** *m/z* (AR): 198 $[M+H]^+$ (52), 41 (100). **EM– FAB (**modo **+, NaI, glicerol)***:* 242 ($[M+ 2\ Na - 1]^+$, 100); **RMN-^{1}H** (CD_3OD): δ 3.91 (d, *J* = 2.9 Hz, H-5); 2.41 (s, H-7); 1.92 (m, H-1'); 1.28-1.57 (m, H-2´); 0.96 (t, *J* = 7.3 Hz, H-3'); 0.76 (d, *J* = 6.6 Hz, H-4´); **RMN-^{1}H** ($CDCl_3$): δ 6.34 (sa, NH_M), 6.17 (sa, NH_m); 4.03 (d, *J* = 3.2 Hz, H-5_m); 3.86 (d, *J* = 3.0 Hz, H-5_M); 2.51 (s, H-7_m); 2.46 (s, H-7_M); 2.03 (m, H-1'); 1.42 (m, H-2´a); 1.33 (m, H-2´b); 0.97 (t, *J* = 7.3 Hz, H-3'$_m$); 0.96 (t, *J* = 7.5 Hz, H-3'$_M$); 0.82 (d, *J* = 6.9 Hz, H-4´$_m$); 0.79 (d, *J* = 6.9 Hz, H-4´$_M$); **RMN-^{13}C** (CD_3OD): δ 199.9, C-4; 187.8, C-6; 176.1, C-2; 104.0, C-3; 66.3, C-5; 38.0, C-1´; 27.6, C-2´; 20.4, C-7; 13.3, C-4´; 12.1, C-3´; **RMN-^{13}C** ($CDCl_3$): δ 195.7, C-4; 188.9, C-6_m; 184.6, C-6_M; 175.6, C-2; 107.6, C-3_m; 102.4, C-3_M; 65.8, C-5_M; 62.6, C-5_m; 36.4, C-1´; 26.9, C-2´$_M$; 26.6, C-2´$_m$; 20.6, C-7_m; 19.5, C-7_M; 13.1, C-4´$_m$; 12.9, C-4´$_M$; 11.7, C-3´. M: tautómero mayoritario, m: tautómero minoritario.

Compuesto **2** ((5S,1´S)-5-*sec*-butil-3-(1-hidroxietiliden)-pirrolidin-2,4-diona)[12, 13]: aceite amarillo; **$[\alpha]_D^{25}$**:-99˚ (c = 0.44, MeOH); **UV**(CH_2Cl_2) $\lambda_{máx}$ (log ε): 276 nm (3.96); **FTIR** (KBr) $\nu_{máx}$: 3322 (OH), 2966 (CH), 2930 (CH), 2880 (CH), 1661 (CO), 1619 (CO), 1455, 1234 cm^{-1}. **EM- EI** (70 eV) *m/z* (AR): 197 ($[M]^{+\cdot}$, 1)], 182 ($[M\text{-}CH_3]^+$, 2), 168 ($[M\text{-}C_2H_5]^+$, 3), 141 ($[M\text{-}C_4H_8]^{+\cdot}$, 100], 123 ($[141\text{-}H_2O]^{+\cdot}$, 25), 98 (10), 86 (10), 84 (12), 43 (73). **RMN-^{1}H** (CD_3OD): δ 3.84 (d, *J* = 3.3 Hz, H-5); 2.42 (s, H-7); 1.90 (m, H-1'); 1.19-1.43 (m, H-2´); 0.99 (d, *J* = 7.3 Hz, H-4'); 0.90 (t, *J* = 7.3 Hz, H-3´); **RMN-^{13}C** (CD_3OD): δ 198.7, C-4; 187.8, C-6; 175.8, C-2; 104.0, C-3; 67.4, C-5; 38.4, C-1´; 24.8, C-2´; 20.7, C-7; 15.9, C-4´; 12.2, C-3´.

Compuesto **3** (5-isopropil-3-(1-hidroxietiliden)-pirrolidin-2,4 diona)[12, 13]**:** aceite amarillo; **$[\alpha]_D^{25}$** :-100˚ (c = 0.13, MeOH); **EM-EI** (70 eV) *m/z* (AR): 183 ($[M]^+$, 20), 168 ($[M\text{-}CH_3]^+$, 3), 141 ([M-

$C_3H_6^{+\cdot}$], 100), 123 ([141-H_2O]$^{+\cdot}$, 32], 98 (30), 84 (36), 72 (72), 43 (100). **RMN-^{1}H** (CD_3OD): δ 3.77 (d, *J* = 3.3 Hz, H-5); 2.41 (s, H-7); 2.13 (m, H-1'); 1.02 (d, *J* = 7.3 Hz, H-2´); 0.82 (d, *J* = 6.6 Hz, H-3'); **RMN-^{13}C** (CD_3OD): δ 198.5, C-4; 187.4, C- 6; 175.5, C-2; 103.3, C-3; 67.6, C-5; 35.4, C-1´; 20.1, C-7; 19.5, C-2´; 15.7, C-2´.

Compuesto **4** (altertoxina I)[20]: aceite amarillo; **$[\alpha]_D^{25}$**: +404˚ (c = 0.1, CH_2Cl_2); **EM-EI** (70 eV) *m/z* (AR): 352 ([M]$^{+\cdot}$, 100), 334 ([M-H_2O]$^{+\cdot}$, 16), 316 ([m/z 334-H_2O]$^{+\cdot}$, 81]. **RMN-^{1}H** ($CDCl_3$ + 5⁄ de CD_3OD): δ 12.73 (s, 3-*OH*); 12.38 (s, 10-*OH*); 7.85 (d, *J* = 8.8 Hz, H-1); 7.82 (d, *J* = 8.8 Hz, H-12); 7.08 (d, *J* = 8.8 Hz, H-2); 7.02 (d, *J* = 8.8 Hz, H-11); 4.67 (ddd, *J* = 11.4, 9.2, 5.3 Hz, H-7); 3.17 (m, H-5ax); 3.09 (m, H-8ec); 3.07 (d, *J* = 9 Hz, H-6b); 3.05, (m, H-6ec); 2.90 (dd, *J* = 16.3, 11.4 Hz, H-8ax); 2.68 (ddd, *J* = 17.5, 3.5, 2.9 Hz, H-5ec); 2.44, (dd, *J* = 15.4, 5.0 Hz, H-6ax); **RMN-^{13}C** ($CDCl_3$): δ 205.3, C-4; 203.0, C-9; 161.9ˆ, C-3; 161.6ˆ, C-10; 136.3, C-9b; 135.5, C-12c; 132.5*, C-1; 132.4*, C-12; 124.5, C-12a; 123.1, C-12b; 119.2, C-2; 117.2$^\#$, C-11; 116.9$^\#$, C-3a; 69.1, C-6a; 65.6, C-7; 51.9, C-6b; 47.8, C-8; 34.6, C-6; 34.0, C-5.

ˆ, *, $^\#$ señales que pueden intercambiarse.

❖ Bibliografía

1. Craig, D., Ward, W. , Control of chalkbrood disease with natural products. *Rural Industries Research and Development Corporation. Australian Government* **2003**.
2. Brown, M., Ball, R., Morton, J., Wilkins, S., Foul brood disease of honey bees: recognition and control. *Central Science Laboratory National Bee Unit, Department for Environment, Food and Rural Affairs (DEFRA); United Kingdom* **2007,** www.defra.gov.uk.
3. Suszkiw, J., New antibiotic approved for treating bacterial honey bee disease *USDA Agricultural Research Service* **2005**.
4. Plan nacional de control de residuos e higiene en alimentos plan CREHA. Plan anual 2008 de Residuos y Toxinas en alimentos de origen animal. *Secretaría de agricultura, ganadería, pesca y alimentación servicio nacional de sanidad y calidad agroalimentaria* **2008/03/14,** 1, 3.
5. Delaplane, K. S., Lozano, F., Using terramycin™ in honey bee colonies. *American Bee Journal* **1994**, 259-261.
6. Gómez Pajuelo, A., Mecanismos biológicos de defensa sanitaria de la colmena. *Asociación de Apicultores Guadalhorce de Málaga. IX Jornada Malagueña de Apicultura* **2007**, 1-4.
7. Puerta, F., Padilla, F., Bustos, M., Flores, J. M., Development of chalkbrood in a honeybee colony: a review. *Bee World* **1982,** 63, 119-130.
8. Orth, C. F., Rinderer, T. , A study of chalkbrood suceptibility in Russian domestic Honey Bee. *American Bee Journal* **2005**, 669-671.
9. Bucio Villalobos, C. M., Martínez Jaime, O. A., Torres, J. J., Morales, A., Hongos asociados al polen recolectados por las abejas. *IX Congreso de Ciencia de los Alimentos y V Foro de Ciencia y Tecnología de Alimentos* **2007**.
10. Saito, T., Hayamizu, K., Yanagisawa, M., Yamamoto, O., Spectral Database for Organic Compounds. *National Institute of Advanced Industrial Science and Technology* **2004**.
11. Laatsch, H., Antibase-A database for rapid identificacion of microbial natural products. *Chemical Concepts Weinheim Germany* **2000**.
12. Nolte, M. J., Steyn, P. S., Wessels, P. L., Structural investigations of 3-acylpyrrolidine-2,4 diones by nuclear magnetic resonance spectroscopy and X-ray crystallography. *Journal of the Chemical Society Perkin Trans I* **1980**, 1057-1065.
13. Poncet, J., Jouin, P., Castro, B., Nicolas, L., Boutar, M., Gaudemer, R., Tetramic acid chemistry. Part I. Reinvestigation of racemisation during the synthesis of tetramic acids via Dieckmann cyclisation. *Journal of the Chemical Society Perkin Transaction I* **1990**, 611-616.
14. Bowers, B., Halsall, T. G., Jones, E. R. H., Lemin, A. J., The chemistry of the triperpenes and related compounds. Part XVIII. Elucidation of the structure of polyporenic acid C. *Journal of the Chemical Society* **1953**, 2548-2553.
15. 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.

16. Rosset, T., Sankhala, R. H., Stickings, C. E., Taylor, M., E., Thomas, R., Studies on the biochemistry of microorganisms. 103. Metabolites of *Alternaria tenuis*: culture filtrate products. *Biochemical Journal* **1957,** 67, 390-400.

17. Schobert, R., Schlenk, A., Tetramic and tetronic acids: An update on new derivatives and biological aspects. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2008,** 16, 4203-4221.

18. Steyn, P. S., Wessels, P. L., Tautomerism in tetramic acids: ^{13}C NMR determination of the structures and ratios of the tautomers in 3-acetyl-5-isopropylpyrrolidine-2,4-dione. *Tetrahedron letters* **1978,** 47, 4707-4710.

19. Royles, B. J. L., Naturally occurring tetramic acids: structure, isolation and synthesis. *Chemical Review* **1995,** 95, 1981-2001.

20. Stack, M. E., Mazzola, E. P., Page, S. W., Pohland, A. E., Highet, R. J., Tempesta, M. S., Corley, D. G., Mutagenic perylenequinone metabolites of *Alternaria alternata*: Altertoxins I, II and III. *Journal of Natural Products* **1986,** 49, 866-871.

21. Vanden Berghe, D. A., Vlietinck, A. J., Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. En *"Methods in Plant Biochemistry", ed., Dey, P. M, Harbone, J. B., Academic Press INC., San Diego, CA* **1991,** 6, Assays for Bioactivity, ed Hosttetman, K., 47-69.

22. Gitterman, C. O., Antitumor, cytotoxic and antibacterial activities of tenuazonic acid and aongeneric tetramic acid. *Journal of Medical Chemistry* **1965,** 8, 483-486.

23. Miller, F. A., Rightsel, W. A., Sloan, B. J., Ehrlich, J., French, J. C., Bartz, Q. R., Antiviral activity of tenuazonic acid. *Nature* **1963,** 200, 1338-1339.

24. Smith, E. R., Fredrickson, T. N., Hadidian, Z., Cardiovascular and gastrointestinal effects of the N,N'-dibenzylethylenediamine salt of tenuazonic acid (NSC-82260) .*Cancer chemotherapy reports. Part 1* **1968,** 52, 587-591.

25. Stierle, A. C., Cardellina , J. H., Strobel, G. A., Phytotoxins from *Alternaria Alternata*, a pathogen of spotted knapweed. *Journal of Natural Products* **1989,** 52, 42-47.

26. Shigeura, H. T., Gordon, C. N., The biological activity of tenuazonic acid. *Biochemistry* **1963,** 2, 1132-1137.

27. Gatenbeck, S., Sierankiewicz, J., Microbial production of tenuazonic acid analogues. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1973,** 3, 308-309.

28. Nukina, M., Satio, T., Microbial production of a norvaline-analog of tenuazonic acid by *Pyricularia oryzae. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **1992,** 56, 1314-1315.

29. Stickings, C. E., Townsend, R. J., Studies in the biochemistry of microorganisms. 115. Metabolites of *Penicillium frequentans* Westling: isolation of sulochrin, asterric acid, (+)-bisdechlorogeodin and two new substituted anthraquinones, questin and questinol. *Biochemical Journal* **1961,** 92, 369-378.

30. Gatenbeck, S., Sierankiewicz, J., On the biosynthesis of tenuazonic acid in *Alternaria tenuis*. *Acta Chemica Scandinavica* **1973,** 27, 1825-1827.

31. Henning, H. G., Gelbin, A., Advances in tetramic acid chemistry *Advances in Heterocyclic Chemistry* **1993,** 57, 139-185.

32. Ghisalberti, E. L., Bioactive metabolites from soilborne fungi: natural fungicides and biocontrol agents, in *"Studies in Natural Products Chemistry". Atta-ur-Rahman, Ed.; Elsevier* **2003,** 21, 109-163.

33. Gossauer, A., Monopyrrolic natural compounds including tetramic acid derivatives. *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe* **2003,** 86, 1-188.
34. Tejedor, D., García Tellado, F. , Synthesis and chemistry of tetronic acids. *Organic Preparations and Procedures International* **2004,** 36, 33-59.
35. Zografos, A. L., Georgiadis, D., Synthetic strategies towards naturally occuring tetronic acids. *Synthesis* **2006**, 3157-3188.
36. Matsunaga, S., Fusetani, N., Kato, Y., Hirota, H., Aurantosides A and B: Cytotoxic tetramic acid glycosides from the marine sponge *Theonella sp. Journal of the American Chemical Society* **1991,** 113, 9690-9692.
37. Michael, A. P., Grace, E. J., Kotiw, M., Barrow, R. A., Ravenic acid, a new tetramic acid isolated from a culture microfungus *Penicillium sp. Journal of Natural Products* **2002,** 65, 1360-1362.
38. Hayakawa, Y., Kanamaru, N., Morisaki, N., Seto, H., Furihata, K., Structure of lydicamycin, a new antibiotic of a novel skeletal type. *Tetrahedron Letters* **1991,** 32 ( ), 213-216.
39. Andersen, B., Kroger, E., Roberts, R. G., Chemical and morphological segregation of *Alternaria arborescens*, *A. infectoria* and *A. tenuissima* species-groups. *Mycological Research* **2002,** 106, 170-182.
40. González, H. H. L., Etcheverry, M., Resnik, S. L., Chulze, S., Torres, A., Production of alternariol and alternariol monometilether by isolates of *Alternaria sp*. from Argentinian maize. *Food Additives and Contaminants* **1998,** 15, 56-60.
41. Andersen, B., Kroger, E., Roberts, R. G., Chemical and morphological segregation of *Alternaria alternata, A. gaisen* and *A. longipes*. *Mycological Research* **2001,** 105, 291-299.
42. Morisseau, C., Multiple epoxide hydrolases in *Alternaria alternata* f. sp. lycopersici and their relationship to medium composition and host-specific toxin production. *Applied and Environmental Microbiology* **1999,** 65, 2388-2395.
43. Liu, Z. Z., Zhu, J., Sun, B., Liu, S., Geng, S., Liu, X., Li, C., Alternol inhibits and induces apoptosis in mouse lymphosite leukemia (L12190) cells. *Molecular and Cellular Biochemistry* **2007,** 306, 115-122.
44. Gallardo, G. L., Peña, N. I., Chacana, P., Terzolo, H., Cabrera, G., M.; L- tenuazonic acid, a new inhibitor of *Paenibacillus larvae*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **2004,** 20, 609-612.

Capítulo 3

Aislamiento y elucidación estructural de metabolitos secundarios producidos por *Aspergillus restrictus* (MP 09)

❖ Introducción

Muchas veces en los programas de búsqueda de metabolitos con alguna actividad biológica específica se aíslan compuestos que, si bien no poseen la actividad buscada, presentan una estructura química novedosa, la cual podría ser activa frente a otra actividad específica no ensayada.

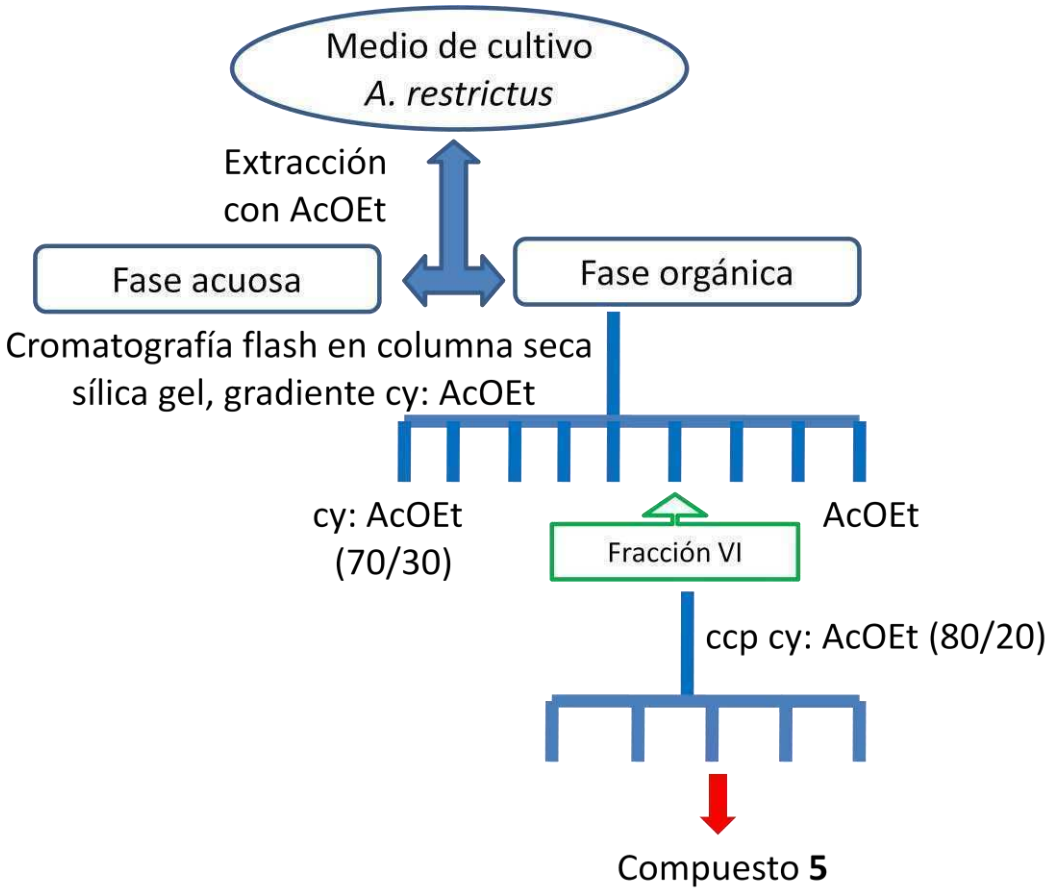
Si bien el objetivo de este trabajo de tesis era el aislamiento de metabolitos con actividad antibacteriana frente a *P. larvae* a partir de extractos de hongos aislados de polen del interior de colmenas, al realizar el screening del extracto de medio de cultivo de una de las cepas aisladas, *Aspergillus restrictus*, se obtuvieron resultados de bioactividad negativos pero dicho extracto presentó un espectro de RMN-^{1}H con señales que podían corresponder a un compuesto de estructura químicamente interesante. Por este motivo se decidió realizar el cultivo a mayor escala de esta cepa con el fin de aislar el o los metabolitos de interés.

Figura 34: Cultivo de *A. restrictus* en MEA

❖ Aislamiento de los metabolitos secundarios

El medio de cultivo obtenido de la cepa *A. restrictus* fue extraído exhaustivamente con AcOEt y el extracto de la fase orgánica fue fraccionado por medio de cromatografía flash en columna seca en sílica gel. Ninguna de las fracciones obtenidas resultó poseer actividad antibiótica ni antifúngica, sin embargo una de ellas presentó en su espectro de RMN-^{1}H las señales que habían sido observadas en el espectro de RMN-^{1}H del extracto crudo y por las cuales había sido seleccionada la cepa. Dicha fracción

fue purificada mediante cromatografía en capa delgada preparativa rindiendo el compuesto **5** (esquema 2).



Esquema 2: Diagrama de extracción de *Aspergillus restrictus*

❖ Elucidación estructural del compuesto aislado

El compuesto **5** presentó en su espectro EM-FAB en modo positivo el ión m/z 432 $[M+H]^+$. Este dato indicaba que el peso molecular del compuesto **5** era impar y sugirió que la molécula podría poseer un átomo o un número impar de átomos de N en su estructura.

En el espectro RMN-^{1}H ($CDCl_3$) del compuesto **5** (figura 35), se observó la presencia de señales en un amplio rango de frecuencias. El espectro mostró un singulete ancho a δ 8.17 (1H), perteneciente a un protón intercambiable unido probablemente a un átomo de nitrógeno. En la zona de campos bajos se observaron tres señales, un doble doblete a δ 8.32 (8.4 y 1.2 Hz, 2 H) y dos multipletes a δ 7.63 y 7.48

que integraban para 2 y 1 hidrógeno respectivamente, con un patrón característico correspondiente al de un anillo aromático monosustituído. El desplazamiento químico elevado para la señal de δ 8.32 sugería la presencia de un grupo carbonilo o equivalente en posición orto con respecto de este hidrógeno.

Por otro lado se observó la presencia de dos multipletes a δ 5.60 (1H) y 5.29 (1H), correspondientes probablemente a un doble enlace aislado, probablemente *cis* de acuerdo a las constantes de acoplamiento, un multiplete δ 4.75 (1H), un singulete a δ 4.69 (1H), y un doblete a δ 4.58 (4.8 Hz, 1H), señales que podrían pertenecer a metinos hidroxilados. Por último el espectro mostró un singulete a δ 3.42 (3H), perteneciente a un grupo metoxilo, un multiplete a δ 2.12 (2H), un singulete a δ 1.67 (3H) y un triplete a δ 0.98 (7.5 Hz, 3H).

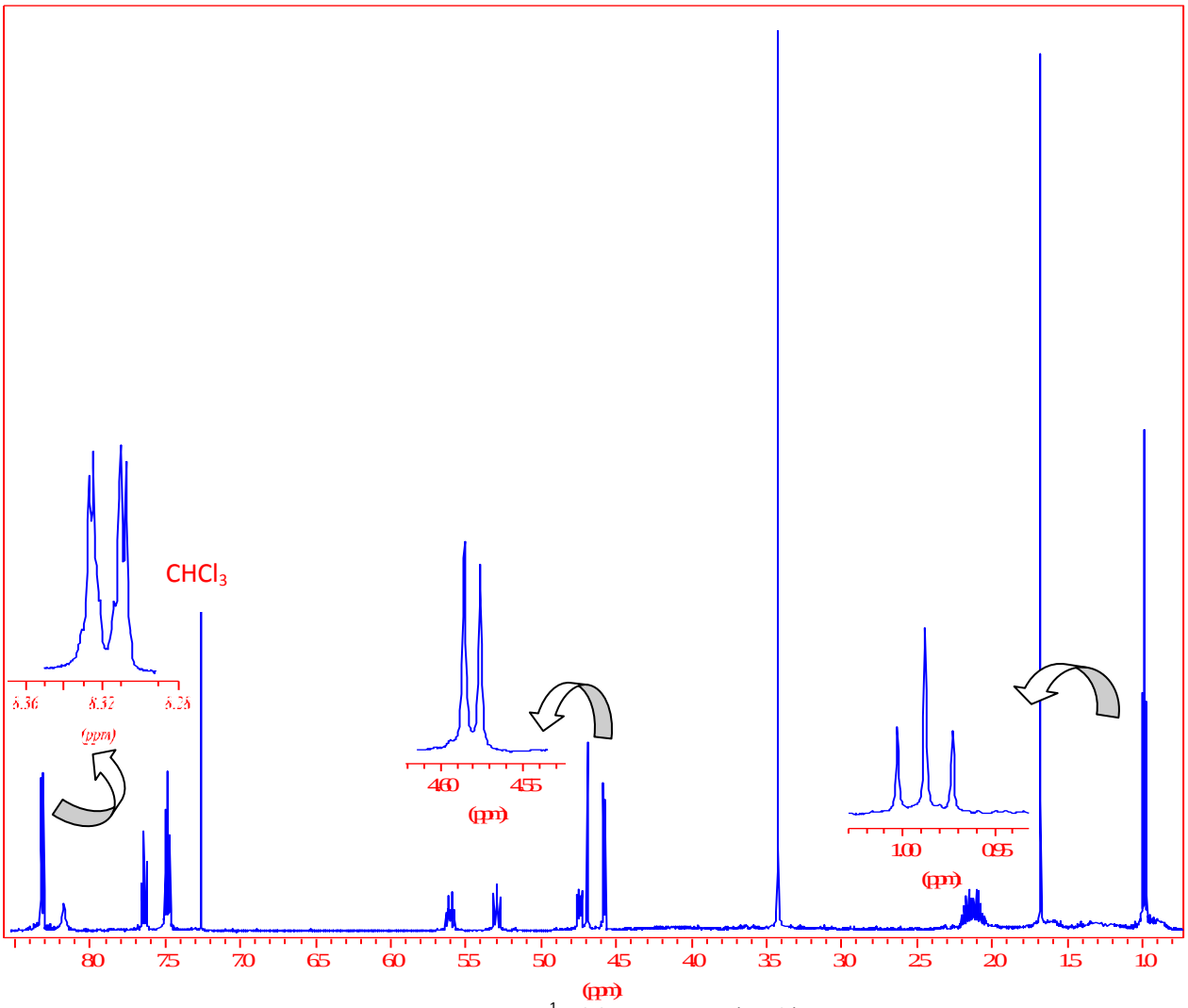


Figura 35: Espectro RMN ^{1}H del compuesto 5 ($CDCl_3$)

Al analizar en conjunto los datos anteriores con las correlaciones observadas en el espectro COSY se pudieron deducir las siguientes estructuras parciales:

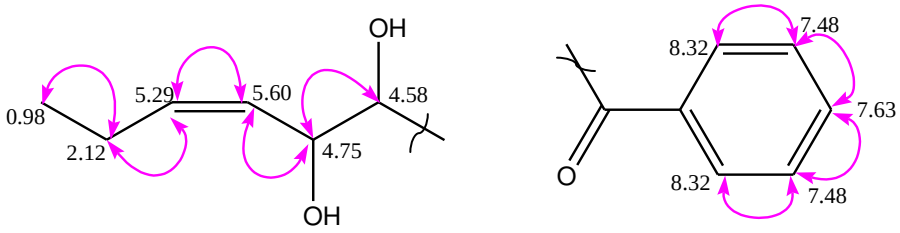


Figura 36: Estructuras parciales para el compuesto **5** observadas por COSY

En el espectro de RMN-^{13}C (figura 37) se observaron veinte señales que, junto con las correlaciones obtenidas en el espectro HETCOR y el espectro DEPT 135 permitieron deducir que la molécula poseía 8 señales que pertenecían a carbonos cuaternarios a δ 196.5, 195.1, 185.8, 166.7, 132.3, 113.4, 92.7 y 90.5, 8 a carbonos de grupos metinos a δ 136.9, 134.7, 130.7, 128.7, 126.4, 73.2, 70.7 Y 70.6, una sola a un carbono de grupo metileno δ 21.4 y tres a carbonos de grupos metilos a δ 51.8, 14.1 y 6.0. Se confirmó entonces la presencia de un anillo aromático monosustituído, un doble enlace disustituído y otro tetrasustituído, con una sustitución oxigenada y se infería también la presencia de 3 carbonilos.

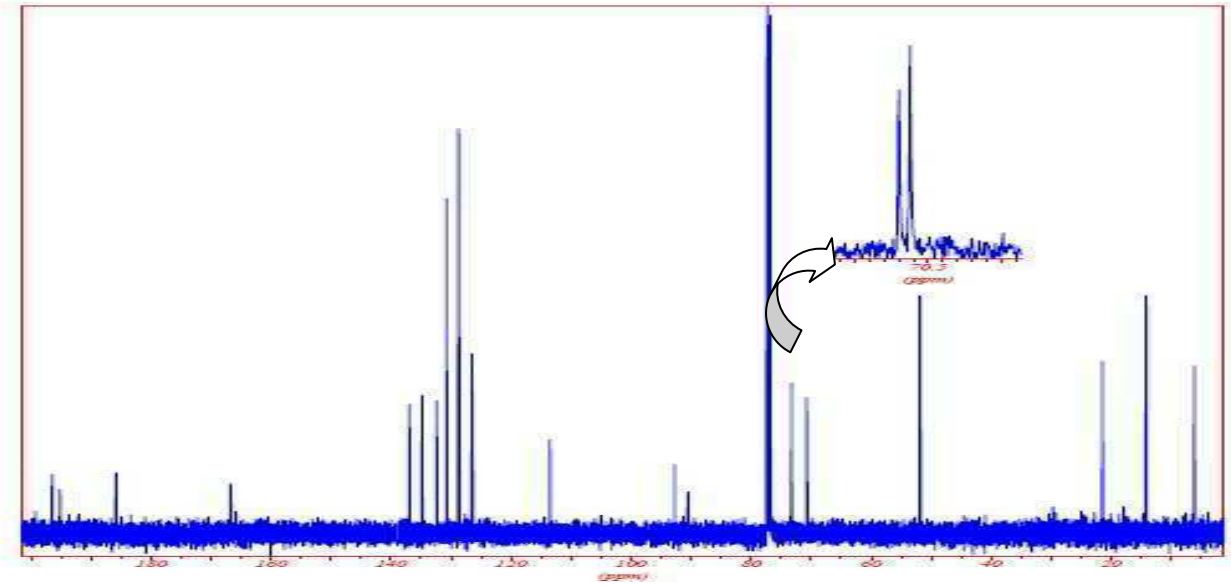


Figura 37: Espectro RMN ^{13}C del compuesto **5** ($CDCl_3$)

Teniendo en cuenta estos datos, el peso molecular y con la ayuda de la base de datos Antibase 2000[1], pudo proponerse la estructura de la figura 38, conocida como pseurotina[2-4].

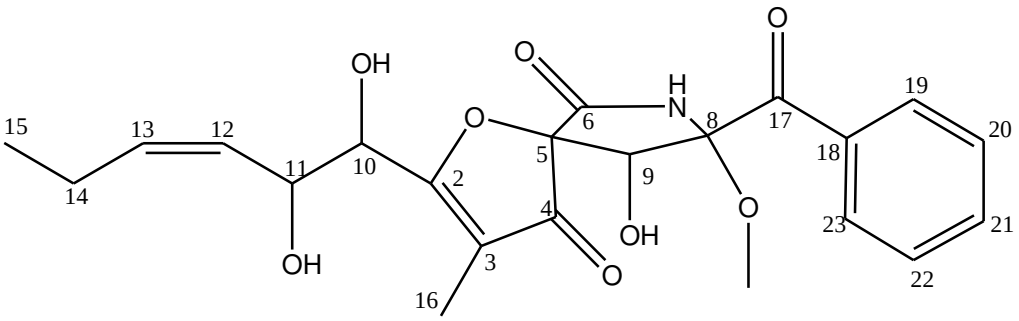


Figura 38: Estructura propuesta para el compuesto **5**

El espectro de correlación HMBC permitió confirmar la estructura planteada. Las correlaciones observadas se muestran en la figura 39.

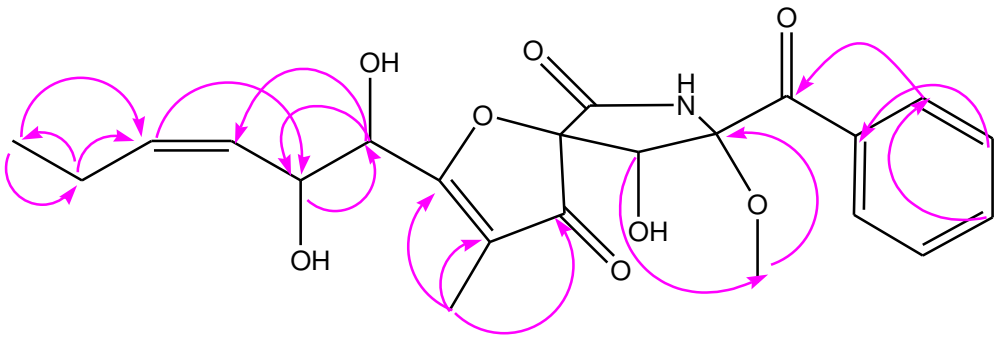


Figura 39: Correlaciones observadas en el espectro HMBC del compuesto **5**

En el espectro NOESY (figura 40) se observó una correlación entre el H-9 y el metoxilo unido al C-8, sugiriendo que ambos se encontraban sobre la misma cara.

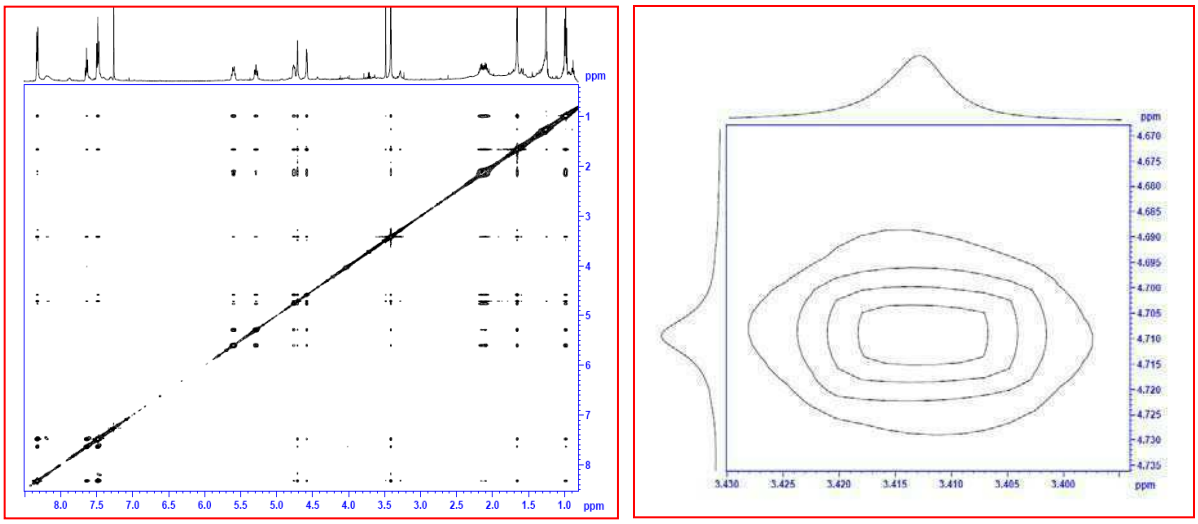
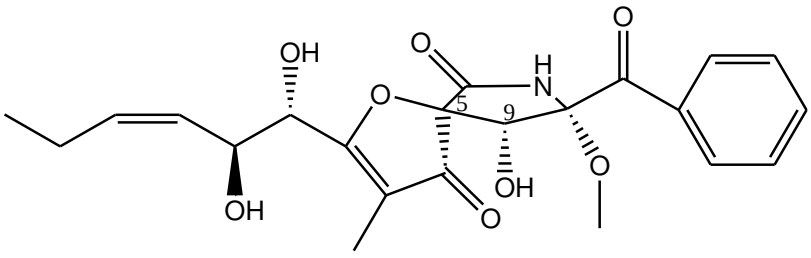


Figura 40: Espectro NOESY del compuesto **5** y ampliación

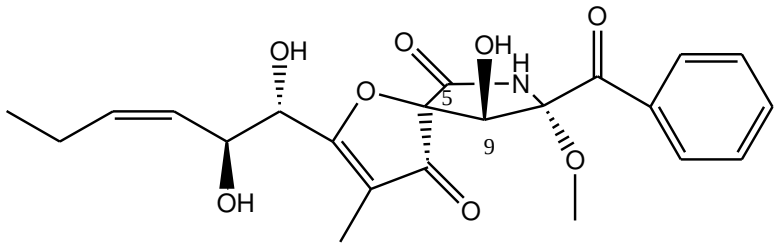
Al día de hoy ha sido informada la existencia de varias pseurotinas.

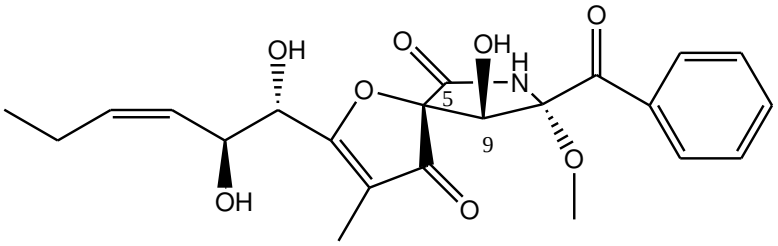
La pseurotina A fue aislada y caracterizada a partir de *Pseudeurotium ovalis*[2] y de *Penicillium sp*[4]. La configuración absoluta de todos los estereocentros presentes en la molécula fueron establecidos como 5S, 8S, 9R, 10S, 11S, mediante espectroscopía de rayos X del derivado bromado[3]. Del cultivo de *Penicillium sp*[4] fueron aisladas también las pseurotinas A_2 y A_3. La pseurotina A_2 es un epímero de la pseurotina A en el carbono 9, mientras que la pseurotina A_3 además de diferir en este carbono lo hace también en el carbono 5 (figura 41). No se hallaron datos bibliográficos sobre los poderes rotatorios de estos últimos compuestos.



pseurotina A

pseurotina A_2





pseurotina A_3

Figura 41: Estructuras de las pseurotinas A, A_2 y A_3

El valor del poder rotatorio obtenido para el compuesto **5** coincidió en signo pero no en módulo con el publicado para la pseurotina A[2].

Al no poder obtener cristales del compuesto **5** para realizarle experimentos de rayos X, se decidió utilizar la técnica de dicroísmo circular (DC) para tener así más herramientas para poder concluir acerca de la estereoquímica absoluta de dicho compuesto.

La técnica de DC mide la diferencia entre la absorción de la luz polarizada circularmente hacia el lado derecho versus el izquierdo, la cual surge de la asimetría estructural de la molécula. En este caso en particular, los esterocentros que se podrían analizar por esta técnica son el carbono 8 y el carbono 5, ya que poseen como vecinos grupos cromóforos los cuales permiten obtener la diferencia necesaria en la absorción.

Comparando la curva obtenida (figura 42) con los datos bibliográficos de DC de las 3 pseurotinas, A, A_2 y A_3, se puede concluir que la estereoquímica del carbono 8 en la pseurotina aislada (compuesto **5**) coincide con la de las conocidas, A, A_2 y A_3, ya que sus curvas de DC son semejantes[4].

No fue posible concluir acerca de la estereoquímica del carbono 5, ya que en bibliografía no figura el registro de la región correspondiente por cuestiones instrumentales.

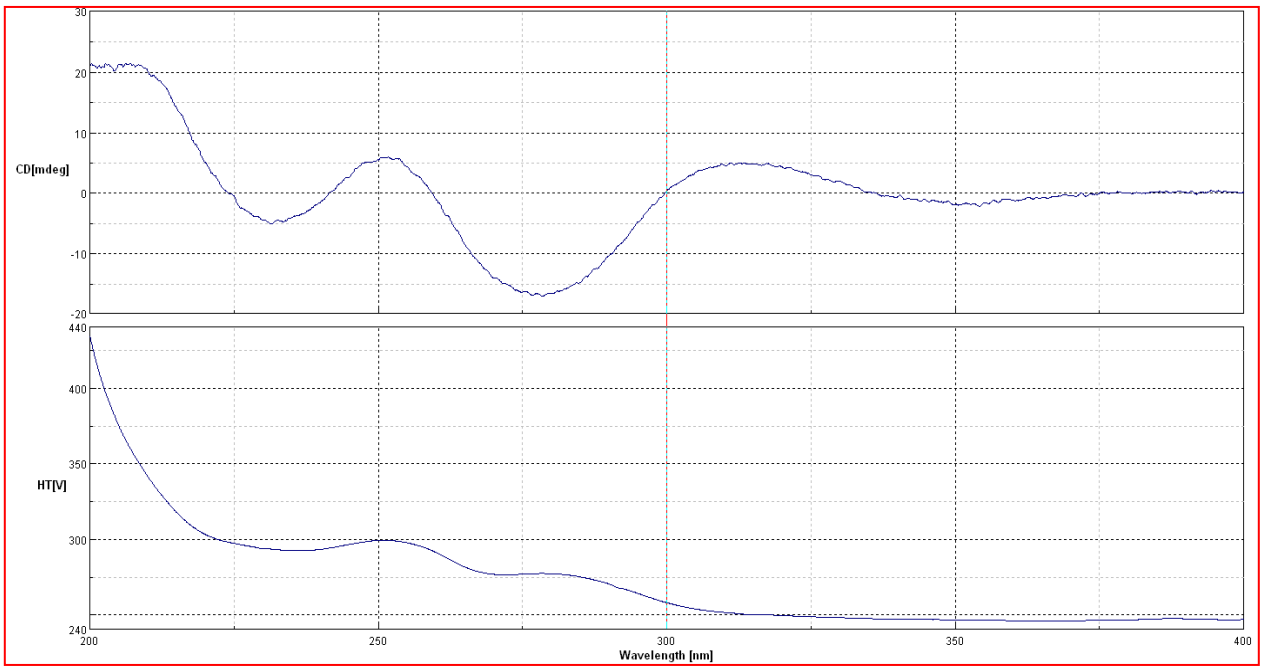


Figura 42: Curva de dicroísmo circular (DC) del compuesto **5** en MeOH

Debido a que la estereoquímica de los carbonos 10 y 11 es similar en todas las pseurotinas conocidas, se asume que probablemente sea la misma para el compuesto aislado **5**.

Con estos datos, la estructura química para el compuesto **5** puede ser la pseurotina A_2 o A_3.

Por comparación de los espectros de RMN-^{13}C en $(CD_3)_2SO$ del compuesto **5** (figura 37) con los de las pseurotinas A_2 y A_3, se encontró que la pseurotina aislada se asemeja más a la pseurotina A_3 y por lo tanto es la estructura que se propone para el compuesto **5** (figura 43).

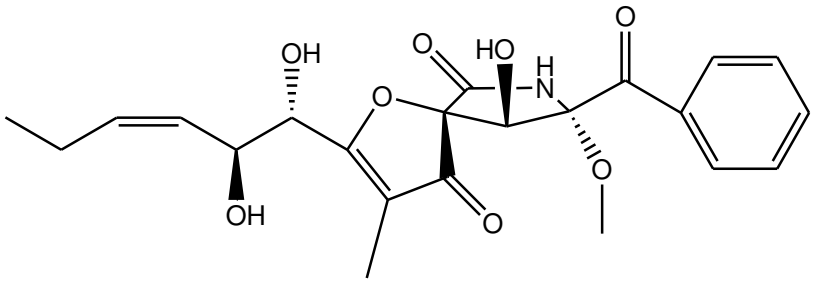


Figura 43: Estructura propuesta para el compuesto **5**

❖ Actividad biológica

Se ha informado en diversas publicaciones sobre las propiedades neuroprotectoras que posee la pseurotina A en el tratamiento de enfermedades que provocan disfunciones del sistema nervioso, generando expectativas importantes en el tratamiento de enfermedades como por ejemplo el mal de Alzheimer[5]. Se ha informado también acerca de la actividad antiviral que posee este compuesto frente al virus *Herpes simplex*[4].

Por otro lado se ha demostrado la actividad que poseen tanto la pseurotina A como la 8-*O*-demetil-pseurotina A en ensayos de inhibición de la enzima quitina sintetasa, al reducir su solubilidad y su unión con las membranas que forman el exoesqueleto o el caparazón de artrópodos o insectos invertebrados como los escarabajos, lo que provoca la muerte de los insectos por deshidratación[6]. La pseurotina **5** no posee actividad ni antifúngica ni antibacteriana[2].

❖ Biosíntesis

Se han realizado estudios sobre la biosíntesis de la pseurotina A debido al interés que generó su estructura heterospirocíclica[7]. Se utilizaron precursores marcados con ^{13}C, y se observó que la propionil-coenzima A actuaba como unidad iniciadora de la ruta biosintética.

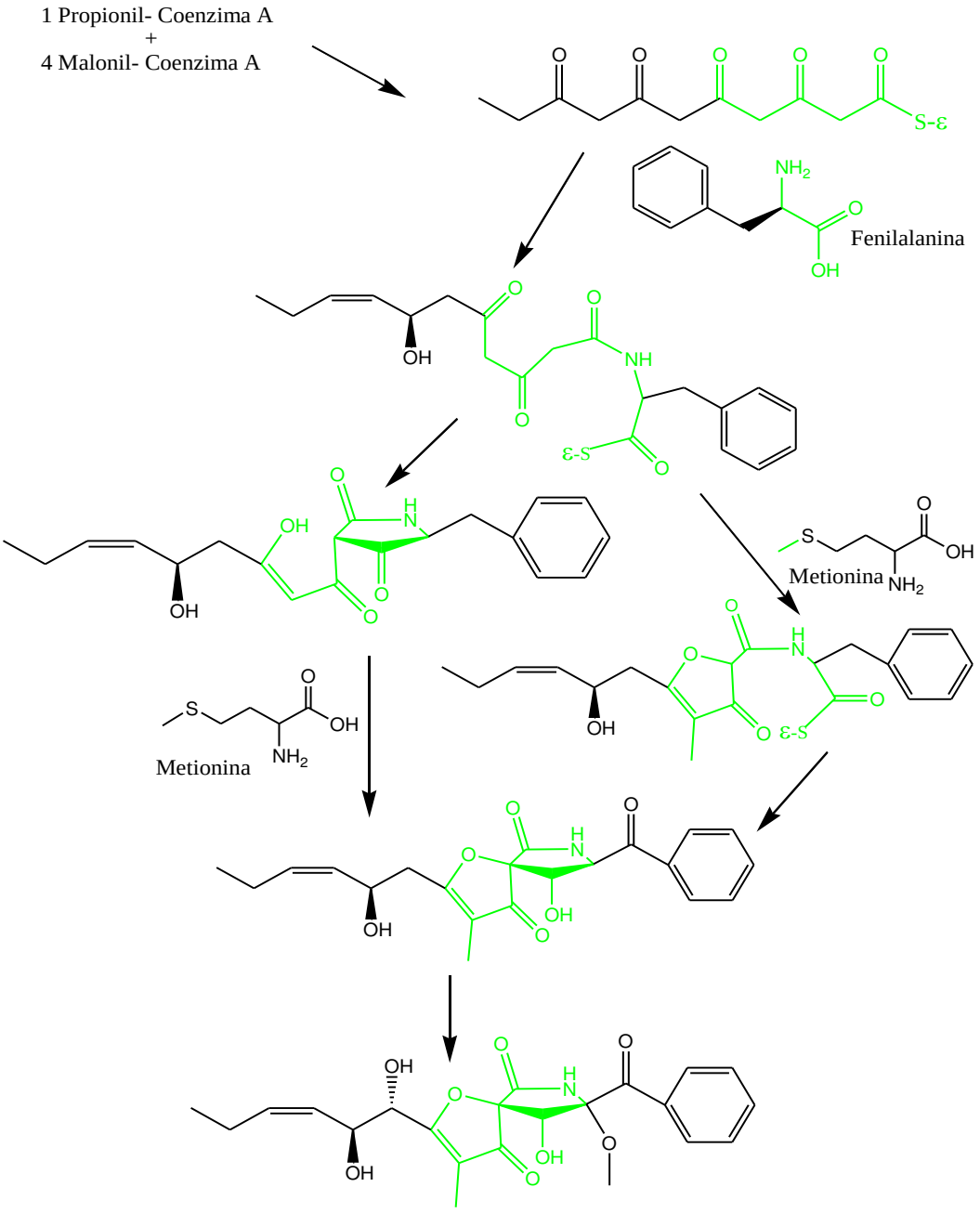


Figura 44: Ruta biosintética propuesta para la pseurotina A[7]

Se demostró recientemente que existe un gen PKS/NRPS que cumple un rol fundamental en la ruta biosintética de la pseurotina A en el hongo *Aspergillus fumigatus,* proponiéndose la ruta que se muestra en la figura 45[8].

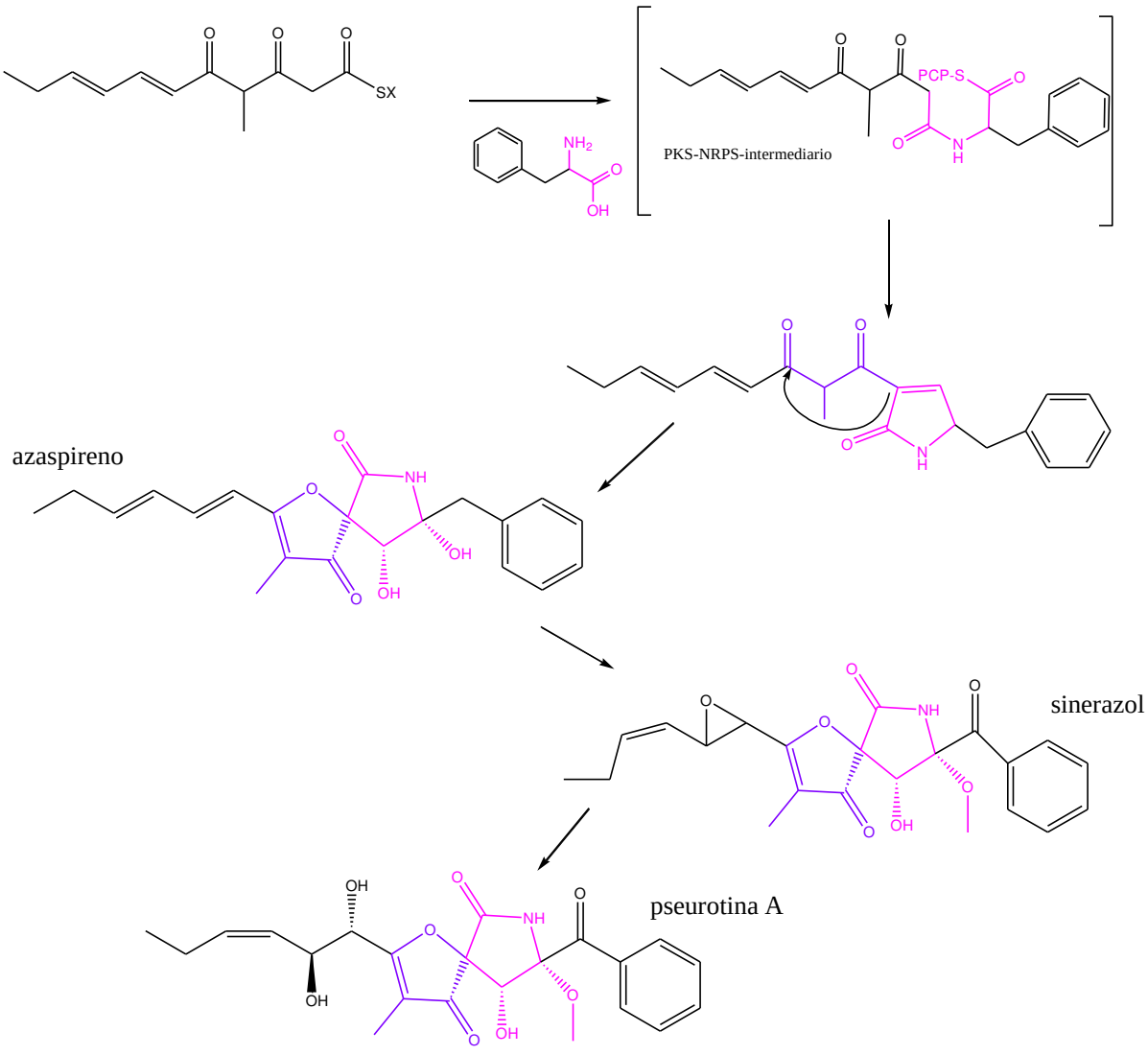


Figura 45: Ruta biosintética de pseurotina A y sinerazol

❖ Antecedentes de compuestos con estructura similar a la pseurotina A

Hasta el momento se conocen 9 compuestos dentro de la clase conocida como pseurotinas, siendo las primeras 5 (A a E) aisladas originalmente del cultivo de *Pseudeurotium ovalis*[2, 9, 10]. En los últimos años se publicaron trabajos acerca de la producción de pseurotinas por parte de otras especies

de hongos, como por ejemplo *Aspergillus fumigatus*[6, 11-14], *Aspergillus sydowi*[15], *Pochonia chlamydosporia*[16], *Diheterospora chlamydosporia*[5], *Pseudallescheria boydii*[17] y *Ulocladium sp*[18].

En particular, se aislaron 8-*O*-demetilpseurotina A, 11-*O*-metilpseurotina A, pseurotina E y sinerazol, (figura 46), intermediario propuesto en la ruta biosintética de pseurotina A a partir de cultivos de *Aspergillus fumigatus*[6, 11-14]. El azaspireno (figura 46), otro intermediario en la biosíntesis de la pseurotina A,fue aislado a partir de cultivos de *Neosartorya sp.*[19].

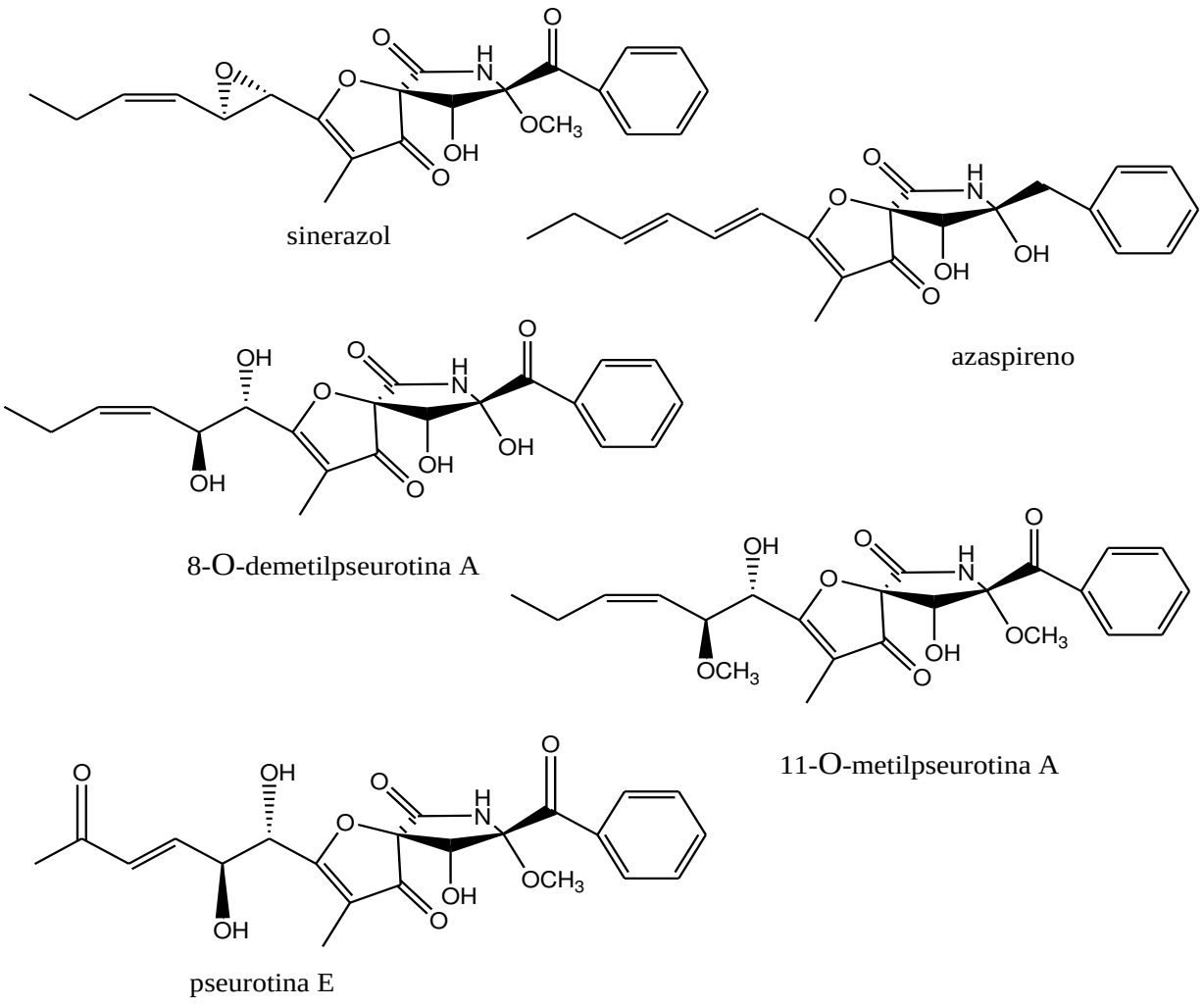


Figura 46: Compuestos de la familia de la pseurotina A

❖ Antecedentes de otros compuestos aislados de cultivos de la misma especie.

Los primeros antecedentes que existen de metabolitos secundarios aislados de *A. restrictus* son bastante recientes, ya que hasta el año 2006[20] no había ningún estudio químico sobre este hongo. Se aislaron e identificaron cristatina A, arestrictinas y asperglusida a partir de cultivos de *A.restrictus* y *A. penicilloides*[20], en este único trabajo previo (figura 47).

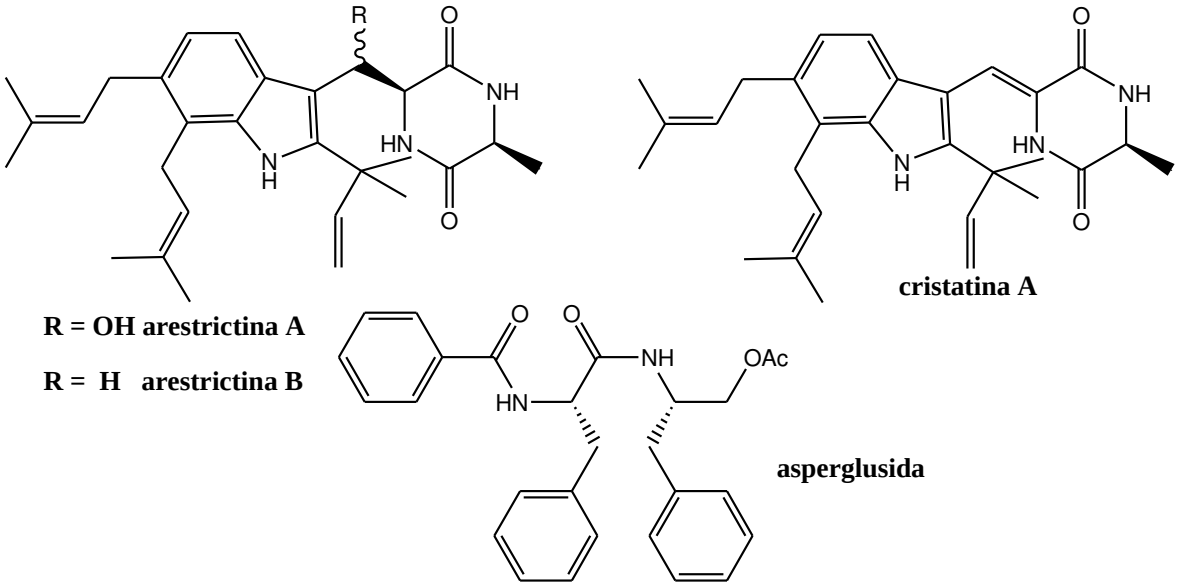


Figura 47: Compuestos aislados de *A. restrictus*

❖ CONCLUSIÓN

A partir de un cultivo del hongo *A. restrictus* se aisló y elucidó la estructura del compuesto **5**, denominado pseurotina A_3, de estructura química informada previamente.

Si bien dicho compuesto no posee actividad antimicrobiana frente a *P. larvae,* ni a otras bacterias y hongos ensayados, es activo como neuroprotector e inhibidor de ciertas enzimas según datos bibliográficos.

❖ Detalles experimentales

Cultivo de *A. restrictus*

A partir de un cultivo de *A. restrictus* crecido en caja de Petri en agar malta al 30⁄ , se cortaron porciones pequeñas de 1 cm por 1 cm aproximadamente para inocular 4 erlenmeyers de 125 ml conteniendo 75 ml cada uno de extracto de malta al 30⁄ , cuya composición está detallada en la parte experimental general, capítulo 7. A la semana, estos cultivos líquidos fueron utilizados como inóculo de 4 cultivos de 1 litro cada uno contenidos en erlenmeyers de 4 litros con el mismo medio. La fermentación fue llevada a cabo a 25°C por 15 días bajo condiciones estáticas. Las condiciones óptimas de cultivo fueron determinados previamente en experimentos de escala menor.

Extracción y fraccionamiento de *A. restrictus*

Los 4 litros de cultivo se filtraron, separando el medio de cultivo del micelio del hongo. El micelio fue descartado, ya que en estudios previos ese extracto no había mostrado la presencia de compuestos ni activos ni con estructuras químicamente interesantes. El medio de cultivo fue extraído con AcOEt (3 x 1 l) obteniéndose 530 mg de extracto. El mismo fue fraccionado mediante cromatografía flash en columna seca, con sílica gel como fase fija, utilizando un gradiente de polaridad creciente desde Ciclohexano: AcOEt (70:30) hasta AcOEt puro como sistema de elución. Se obtuvieron 10 fracciones de 500 ml que fueron analizadas mediante ccd y RMN-^{1}H, siendo la fracción VI (40 mg), eluída con Ciclohexano: AcOEt (50:50), la única que demostró contener el/los compuestos buscados. Dicha fracción fue purificada mediante cromatografía en capa delgada preparativa en sílica gel con Ciclohexano: AcOEt (80:20) como fase móvil, obteniéndose 15 mg (2.8⁄ del extracto crudo) del compuesto **5** puro (R_F 0.6).

Propiedades físicas del compuesto aislado.

Compuesto **5** , (3Z, 8*S*, 9*R*, 1'*S*, 2'S)-2[1´,2'-dihidroxi-3'-hexenil]-7-aza-8-benzoil-4,6 diona-9-hidroxi-3-metil-8-metoxi-1-oxa-2-noneno: aceite amarillo; $\mathbf{[\alpha]_D^{25}}$: -23.8˚ (c = 0.06, MeOH); **UV**(CH_2Cl_2) $\lambda_{máx}$ (log ε) : 253 nm (4.20), 280 (4.05); **EM – FAB$^+$ (Gly)** *m/z* (abundancia relativa): 470 $[M+K]^+$ (12), 454 $[M+Na]^+$ (15), 432 $[M+H]^+$ (38), **EM – FAB$^-$ (Gly)** *m/z* (abundancia relativa): 431 $[M]^{-\cdot}$ (33), 399 $[M-CH_3OH]^-$ (100); **RMN-^{1}H** ($CDCl_3$): δ 8.32 (dd, *J* = 8.4, 1.2 Hz, H-23 y H-19); 8.17 (sa, H-7); 7.63 (m, H-21); 7.48 (m, H-22 y H-20); 5.60 (m, H-13); 5.29 (m, H-12); 4.75 (ddd, *J* = 8.9, 4.8, 1.2, H-11); 4.69 (s, H-9); 4.58 (d, *J* = 4.8 Hz, H-10); 3.42 (s, C*H*$_3$O); 2.12 (m, H-14); 1.67 (s, H-16); 0.98 (t, *J* = 7.5 Hz, H-15); **RMN-^{13}C** ($CDCl_3$): δ 196.5, C-4; 195.1, C-17; 185.8, C-2; 166.7, C-6; 136.9, C-13; 134.7, C-21; 132.3, C-18; 130.7, C-23 y C-19; 128.7, C-22 y C-20; 126.4, C-12; 113.4, C-3; 92.7, C-5; 90.5, C-8; 73.2, C-9; 70.7, C-11; 70.6, C-10; 51.8, *C*H$_3$O; 21.4, C-14; 14.1, C-15; 6.0, C-16. **RMN-^{1}H** ($(CD_3)_2SO$): δ 8.26 (dd, *J* = 8.4, 1.2 Hz, H-23 y H-19); 9.95 (s, H-7); 7.68 (m, H-21); 7.54 (m, H-22 y H-20); 5.42 (m, H-13); 5.36 (m, H-12); 4.46 (dd, *J* = 5.8, 1.8, H-11); 4.92 (s, H-9); 4.35 (d, *J* = 5.8 Hz, H-10); 3.35 (s, C*H*$_3$O); 2.02 (m, H-14); 1.64 (s, H-16); 0.89 (t, *J* = 7.6 Hz, H-15); **RMN-^{13}C** ($(CD_3)_2SO$): δ 197.2, C-4; 196.9, C-17; 187.4, C-2; 167.0, C-6; 134.3, C-13; 134.2, C-21; 133.9, C-18; 130.8, C-23 y C-19; 128.9, C-22 y C-20; 129.6, C-12; 112.0, C-3; 93.0, C-5; 91.7, C-8; 73.2, C-9; 70.7, C-11; 70.6, C-10; 51.8, *C*H$_3$O; 21.4, C-14; 14.1, C-15; 6.0, C-16.

Posición	δC^{13}	δH^{1}	COSY	HMBC	NOESY
2	185.8	-	-		
3	113.4	-	-		
4	196.5	-	-		
5	92.7	-	-		
6	166.7	-	-		
7	-	8.17(sa)	-		
8	90.5	-	-		
9	73.2	4.69(s)	-	C-2, C-5	OCH_3
10	70.6	4.58(d, 4.8 Hz)	H-11	C-11, C-12, C-2, C-4	
11	70.7	4.75(m)	H-10, H-12	C-10, C-12	H-12
12	126.4	5.29(m)	H-11, H-13		H-11
13	136.9	5.60(m)	H-12, H-14	C-11	
14	21.4	2.12(m)	H-13, H-15	C-13, C-15	
15	14.1	0.98(t, 7.5 Hz)	H-14	C-13, C-14	
16	6.0	1.67(s)	-	C-2, C-3, C-4	
17	195.1	-	-		
18	132.3	-	-		
19 y 23	130.7	8.32(dd)	H-20 o H-22	C-17, C-19 o C-23, C-21	H-20 o H-22
20 y 22	128.7	7.48(m)	H-19 y H-23, H-21	C- 18, C 20 o 22	H-19 o H-23, H-21
21	134.7	7.63(m)	H-20 o H-22	C 19 o C 23, C-20 o C-22	H-20 o H-22
OMe	51.8	3.42(s)	-	C-8	H-9

Tabla 3: Datos espectroscópicos observados para el compuesto 5, δ en ppm (*J* en Hz)

❖ Bibliografía

1. Laatsch, H., Antibase-A database for rapid identificacion of microbial natural products. *Chemical Concepts Weinheim Germany* **2000**.

2. 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. *Helvetica Chimica Acta* **1976,** 59, 133-137.

3. Bloch, P., Tamm, C., Bollinger, P., Petcher, T. J., Weber, H. P., The crystal and Molecular structure of 12,13- dibromopseurotin. *Helvetica Chimica Acta* **1976,** 59, 137-140.

4. Van der Sar, S., Tesis doctoral. Studies in the chemistry of fungal natural products. *University of Canterbury* **2006**. http://library.canterbury.ac.nz/thesis/etheses_copyright.shtml.

5. Komagata, D., Fujita, S., Yamashita, N., Saito, S., Morino, T., Novel neuritogenic activities of pseurotin A and penicillic acid. *Journal of Antibiotics* **1996,** 49, 958-959.

6. Wenke, J., Anke, H., Sterner, O. , Pseurotin A and 8-*O*-demethylpseurotin A from *Aspergillus fumigatus* and their Inhibitory activities on chitin synthase. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **1993,** 57, 961-964.

7. Mohr, P., Tamm, C., Biosynthesis of pseurotin A. *Tetrahedrom* **1981,** 37, 201-212.

8. Shubha, M., Grundmann, A., Xiang, L., Shu-Ming, L., Turner, G., Identification of a hybrid PKS/NRPS required for pseurotin A biosynthesis in the human pathogen *Aspergillus fumigatus* . *ChemBioChem* **2007,** 8, 1736-1743.

9. Breitenstein, W., Chexal, K. K., Mohr, P., Tamm, C., Pseurotin B, C, D and E. Further new metabolites of *Pseudeurotium ovalis* stolk. *Helvetica Chimica Acta* **1981,** 64, 379-388.

10. Bloch, P., Tamm, C., Isolation and structure of pseurotin A, a microbial metabolite of *Pseudeurotium ovalis* stolk with an unsual heterospirocyclic system. *Helvetica Chimica Acta* **1981,** 64, 304-315.

11. 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.

12. Yasuhiro, I., Yukihiro, Y., Akira, S., Kiyonaga, F., Ken-Ichi, H., Tsutomu, O., Mayumi, S., Tamotsu, F., Toshikazu, O., Directed biosynthesis of fluorinated pseurotin A, synerazol and gliotoxin. *Journal of Antibiotics* **2004,** 57, 748-754.

13. Asami, H., Shozo, F., Manabu, N., Tsuyoshi, K., Atsumi, S., Yasuo, K., Fumiquinones A and B, nematicidal quinones produced by *Aspergillus fumigatus*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **2007,** 71, 1697-1702.

14. Boot, C. M., Gassner, N. C., Compton, J. E., Tenney K., Tamble, C. M., Lokey, R. C., Holman, T. R., Crews, P., Pinpointing pseurotins from a marine-derived *Aspergillus* as tools for chemical genetics using a synthetic lethality yeast screen. *Journal of Natural Products* **2007,** 70, 1672-1675.

15. Zhang, M., Wang, W. L., Fang, Y. C., Zhu, T. J., Gu, Q. Q., Zhu, W. M., Cytotoxic alkaloids and antibiotic nordammarane triterpenoids from the marine-derived fungus *Aspergillus sydowi*. *Journal of Natural Products* **2008,** 71, 985-989.

16. Hellwig, V., Mayer-Bartschmid, A., Mueller, H., Greif, G., Kleymann, G., Zitzmann, W., Tichy, H., Stadler, M., Pochonins A−F, new antiviral and antiparasitic resorcylic acid lactones from *Pochonia chlamydosporia* var. catenulata. *Journal of Natural Products* **2003,** 66, 829-837.

17. Maebayashi, Y., Horie, Y, Satoh, Y, Yamazaki, M., Isolation of pseurotin A and a new pyrazine from *Pseudallescheria boydii. Mycotoxins* **1985,** 22, 33-34.

18. MacLean, W. J., Tesis doctoral. *University of Canterbury* **2005**. http://library.canterbury.ac.nz/thesis/etheses_copyright.shtml.

19. Asami, Y., Kakeya, H., Onose, R., Yoshida, A., Matsuzaki, H., Osada, H., Azaspirene: A novel angiogenesis inhibitor containing a 1-oxa-7-azaspiro[4.4]non-2-ene-4,6-dione skeleton produced by the Fungus *Neosartorya sp*. *Organic Letters* **2002,** 4, 2845-2848

20. Itabashi, T., Matsuishi, N., Hosoe, T., Toyazaki, N., Udagawa, S., Imai, T., Adachi, M., Kawai, K., Two new dioxopiperazine derivatives, arestrictins A and B, isolated from *Aspergillus restrictus* & *Aspergillus penicilloides*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **2006,** 54, 1639-1641.

Capítulo 4

Aislamiento y elucidación estructural de metabolitos secundarios producidos por *Ascosphaera apis* (MP 07)

❖ Introducción.

Los hongos entomopatógenos son microorganismos que viven a expensas de insectos de diferentes órdenes en forma natural. Algunas especies de insectos son particularmente susceptibles al ataque de hongos entomopatógenos, siendo estos últimos muy específicos al grado de género y/o especie, por lo que no infectan al hombre, a plantas y a animales. El desarrollo de estos patógenos es favorecido por condiciones particulares de humedad, pH y temperatura, las cuales varían para cada especie de hongo[1].

Los hongos entomopatógenos actúan por contacto en los diferentes estadíos de los insectos. Los conidios, que son las unidades infectivas, penetran el cuerpo del insecto, produciéndole al crecer disturbios a nivel digestivo, nervioso, muscular, respiratorio y/o excretorio, enfermando al insecto hasta provocarle la muerte, que dependiendo de la virulencia del hongo y del estadío del insecto, puede ocurrir entre los tres y los cinco días después de la infección. Por todos estos motivos esta clase de hongos posee extrema importancia ya que pueden utilizarse para el control de insectos plaga, en particular ectoparásitos (parásitos que viven en la superficie de otro organismo parasitado, huésped, como por ejemplo pulgas o piojos), ya que este tipo de insectos es muy susceptible a las enfermedades fúngicas[1].

Se conocen en la actualidad más de 700 especies de hongos entomopatógenos con alrededor de 100 géneros; dentro de los más importantes se encuentran: *Metarhizium spp, Beauveria spp, Aschersonia spp, Entomopthora spp, Zoophthora spp, Erynia spp, Eryniopsis spp, Akanthomyces spp, Fusarium spp, Hirsutella spp, Hymenostilbe spp, Paecilomyces spp y Verticilliun spp*[1]. Varias de estas especies son utilizadas actualmente para controlar diversas plagas como alternativa al uso de insecticidas químicos. Algunas de las especies comerciales son: *Beauveria bassiana* para controlar coleópteros o escarabajos; *Verticillium lecanii* para controlar áfidos o pulgones, moscas blancas y tisanópteros (insectos comúnmente conocidos como trips, que afectan la producción agrícola particularmente en Latinoamérica[2]) y *Metarhizium anisopliae* para controlar homópteros o cigarras.

Se sabe que muchos hongos entomopatógenos ejercen su acción insecticida a través de la producción de diversos metabolitos secundarios, lo que los convierte en nuevas fuentes naturales potenciales de agentes insecticidas[3] con bajo impacto ambiental[4]. Un claro ejemplo es el caso de las

dextrudinas producidas por el hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae,* que poseen actividad insecticida frente a ácaros y arañas[5].

Para conocer cuáles toxinas son las responsables de la actividad y porqué son tóxicas para los insectos, es importante estudiar el modo de acción del hongo patógeno tanto a nivel celular como molecular y los metabolitos secundarios que produce[6].

Por este motivo se decidió estudiar una cepa de *Ascosphaera apis* aislada de polen colectado de colmenas del apiario del INTA – Balcarce, a pesar de que sus extractos no presentaban actividad ni antibiótica ni antifúngica. *A. apis* es un hongo entomopatógeno responsable de la enfermedad conocida como chalkbrood o cría yesificada que afecta a las larvas de las abejas melíferas como ha sido comentado en el capítulo 2.

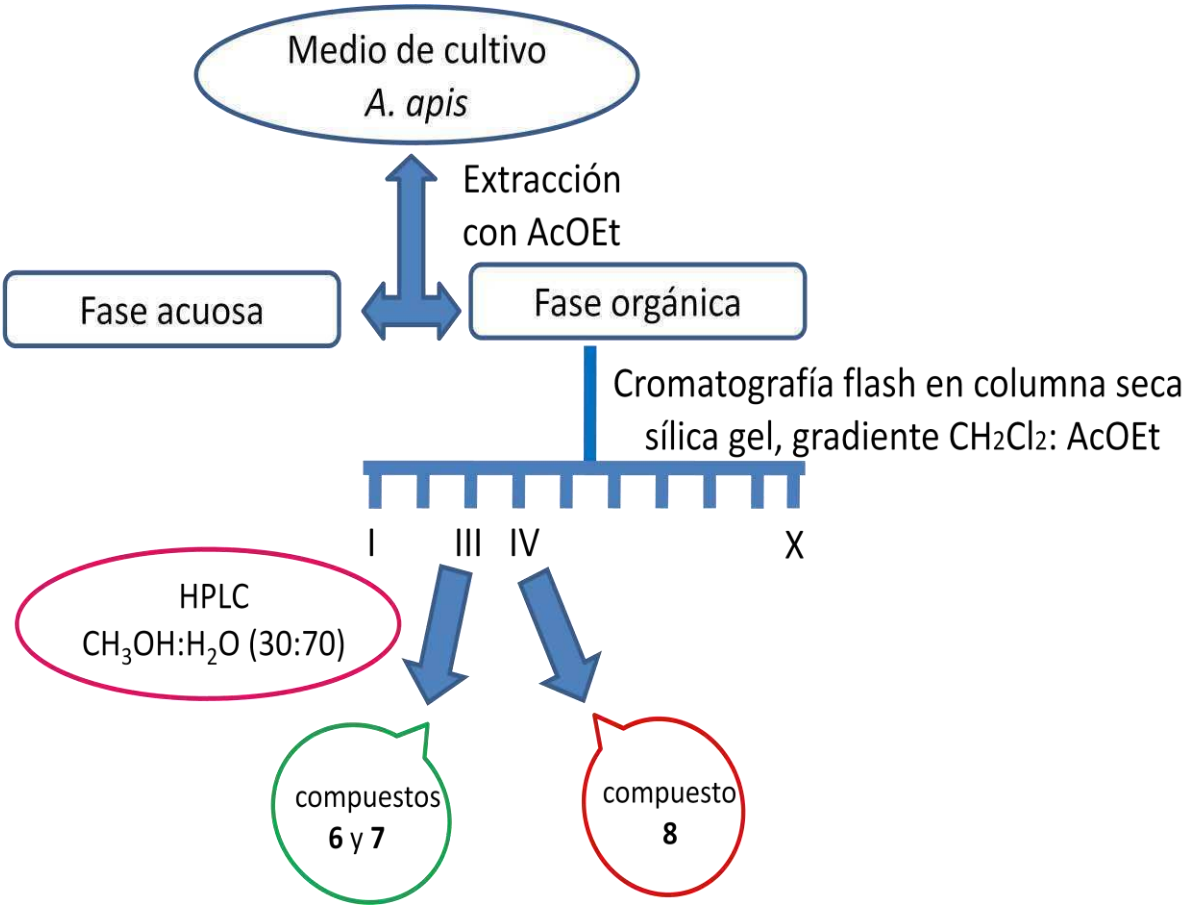
Debido a que no existe en la actualidad ningún compuesto antifúngico específico para controlar esta enfermedad y a que solamente existe una publicación del año 1993[7] acerca del aislamiento de algún metabolito producido por este hongo y que ese metabolito fue el ácido linoleico, se consideró importante estudiar químicamente la especie patógena para contribuir con su conocimiento y poder aportar datos que puedan servir para su control efectivo.

Figura 48: Cultivo de *A. apis* en medio MY20

❖ Aislamiento de los metabolitos secundarios.

La cepa de *A. apis* aislada se cultivó utilizando como medio de fermentación MY20. Una vez crecido el cultivo se separó el medio del micelio mediante filtración y se extrajo el medio exhaustivamente con AcOEt. El extracto de la fase orgánica obtenido fue fraccionado inicialmente mediante el uso de cromatografía flash en columna seca en sílica gel utilizando como eluyente mezclas de polaridad creciente de CH_2Cl_2: AcOEt. De esta separación se obtuvieron 2 fracciones que presentaron por ccd y RMN-^{1}H compuestos de estructura químicamente interesante. Por esta razón ambas fueron separadas mediante el uso de HPLC a escala preparativa.

La fracción III rindió los compuestos **6** y **7** y la IV el compuesto **8** (esquema 3).



Esquema 3: Diagrama de separación de los compuestos producidos por *A. apis*

❖ Elucidación estructural de los compuestos aislados.

Compuesto 6

La fórmula molecular del compuesto **6** fue determinada como $C_{10}H_{16}O_3$ mediante espectrometría de masa de alta precisión utilizando como técnica de ionización ESI/APCI, ya que el valor de m/z encontrado para el ión $[M+H]^+$ fue 185.1183. En el espectro RMN-H^1 ($CDCl_3$) (figura 49), se observó la presencia de tres singuletes a δ 1.98, 1.27 y 1.25 correspondientes a tres metilos, indicando el valor de desplazamiento químico correspondiente al primero que se encontraba unido a un doble enlace. En este espectro se observaron también seis señales correspondientes a un hidrógeno cada una, a δ 5.86 ppm (qa, 1.2 Hz), perteneciente a un hidrógeno sobre un carbono olefínico, δ 4.04 (dd 9.0 y 2.1 Hz), que podría pertenecer a un protón unido a un carbono oxigenado, δ 2.53, 2.16, 1.93 (dt, 17.7 y 5.6 Hz), y el último a δ 2.36 (ddd 17.7, 8.8 y 7.0 Hz).

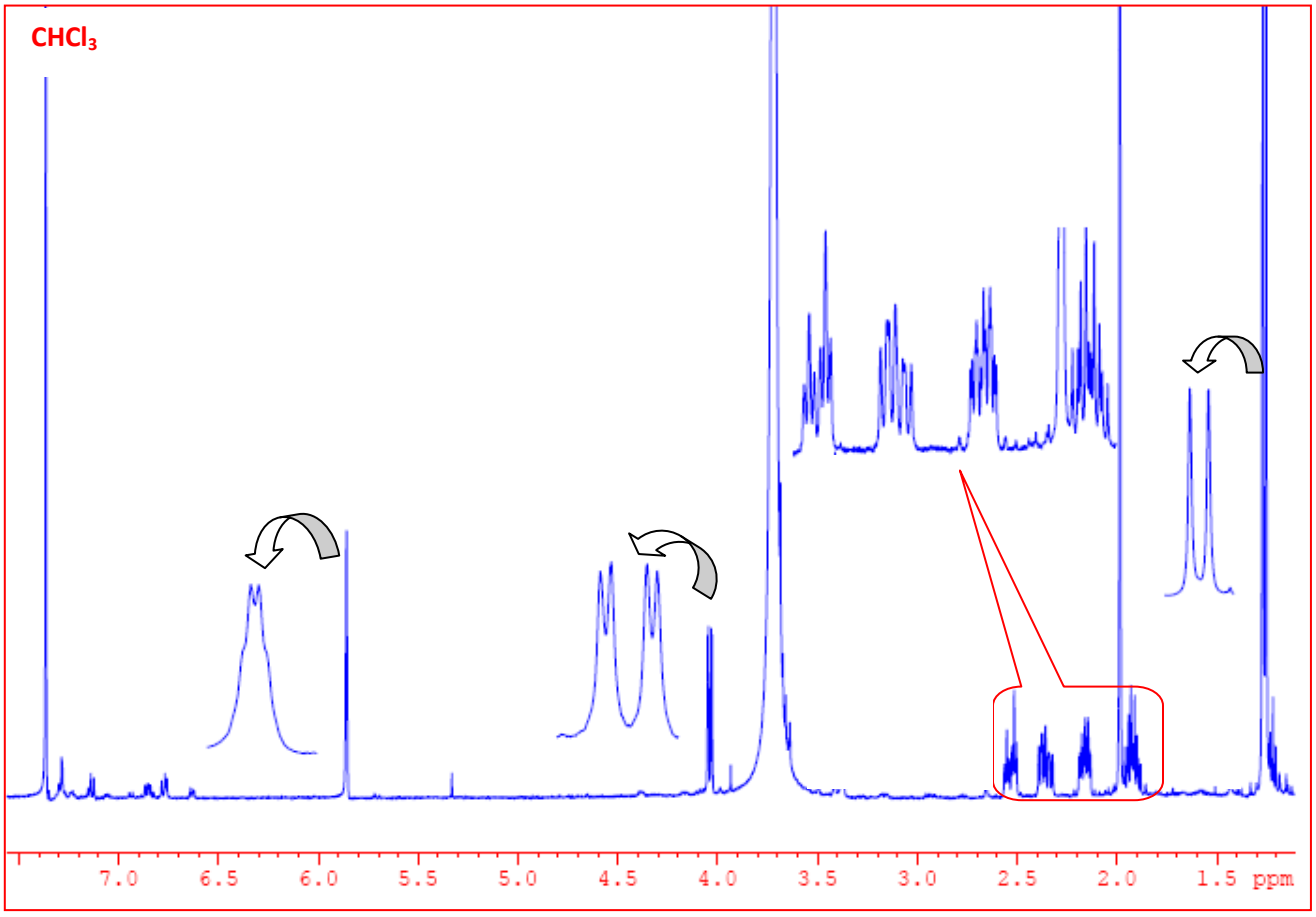


Figura 49: Espectro RMN H^1 del compuesto **6** ($CDCl_3$)

El espectro COSY (figura 51), permitió deducir las siguientes estructuras parciales:

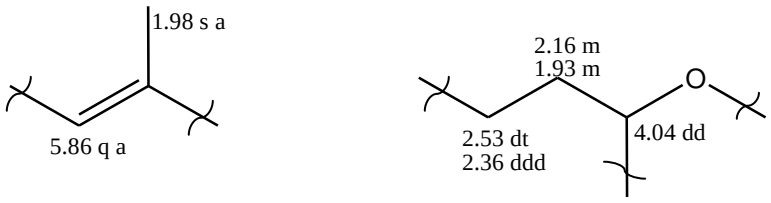


Figura 50: Estructuras parciales correspondientes al compuesto **6**

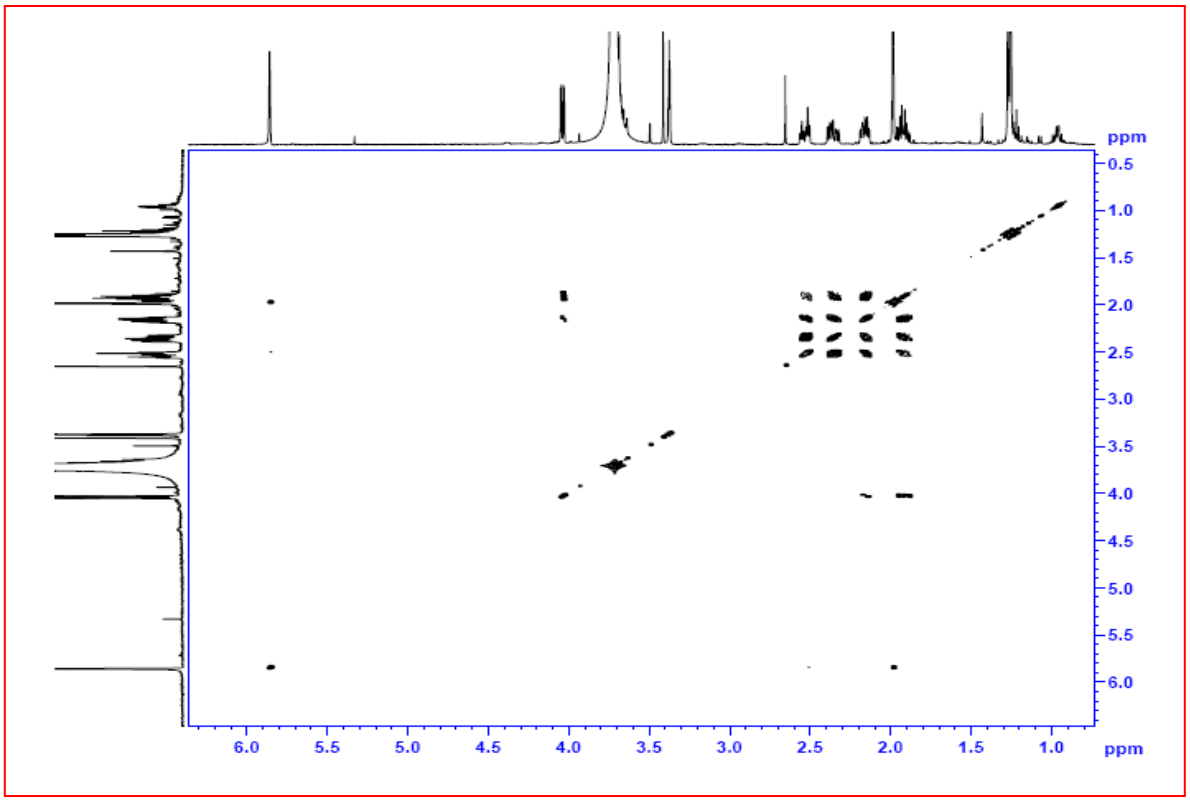


Figura 51: Espectro COSY del compuesto **6**

En el espectro de RMN-^{13}C ($CDCl_3$-CD_3OD, 95:5) del compuesto **6** (figura 52), se observaron 9 señales, tres de las cuales pertenecían a carbonos cuaternarios (δ 169.3, 156.2 y 71.2), dos a grupos metinos (δ 117.8 y 84.7), otras dos a grupos metilenos (δ 33.6 y 27.2) y las dos restantes a 3 metilos (δ 26.1 y 24.6). La multiplicidad de las señales de RMN-^{13}C se determinó a través del espectro HSQC-DEPT

(figura 53). La señal de δ 24.6 pertenecía a dos grupos metilos según lo observado en el espectro HSQC. El valor de desplazamiento químico de la señal a 169.3 ppm indicaba probablemente la presencia de un grupo carbonilo α,β – insaturado, las señales a δ 156.2 y 117.8 a un doble enlace conjugado con el carbonilo y las señales a δ 84.7 y 71.2 a carbonos oxigenados.

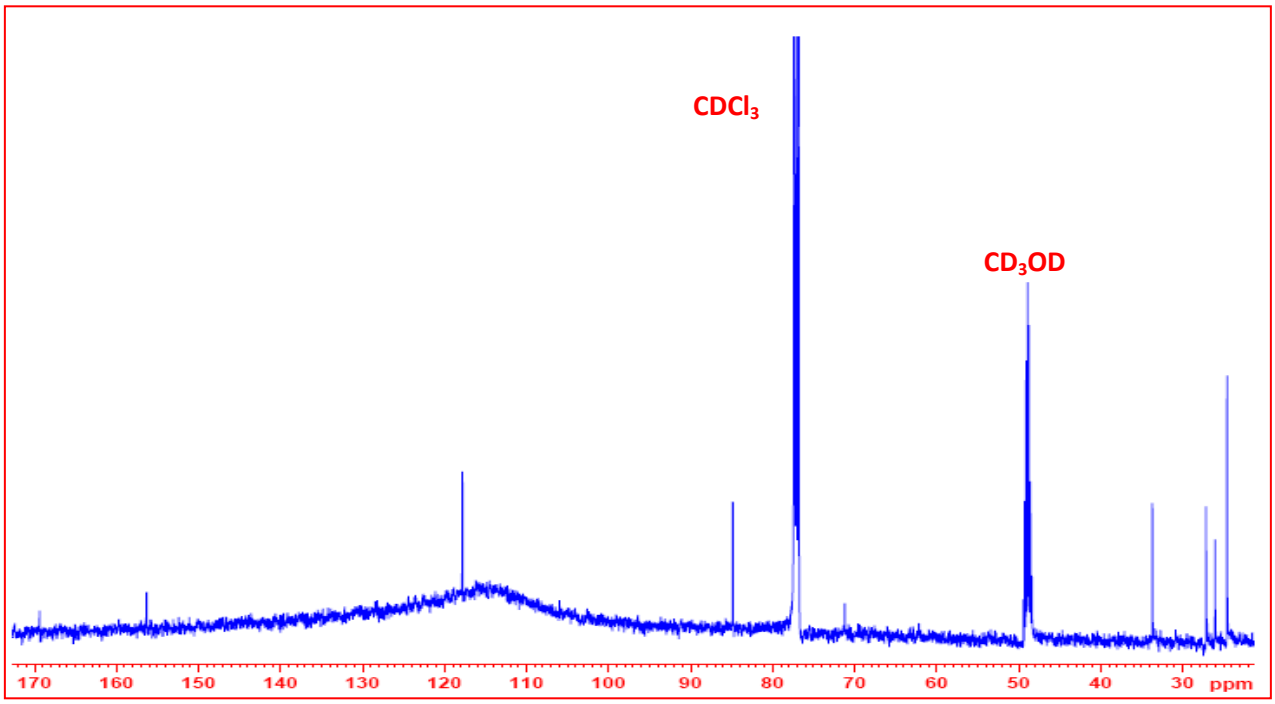


Figura 52: Espectro RMN-^{13}C del compuesto **6** ($CDCl_3$ + CD_3OD (95:5))

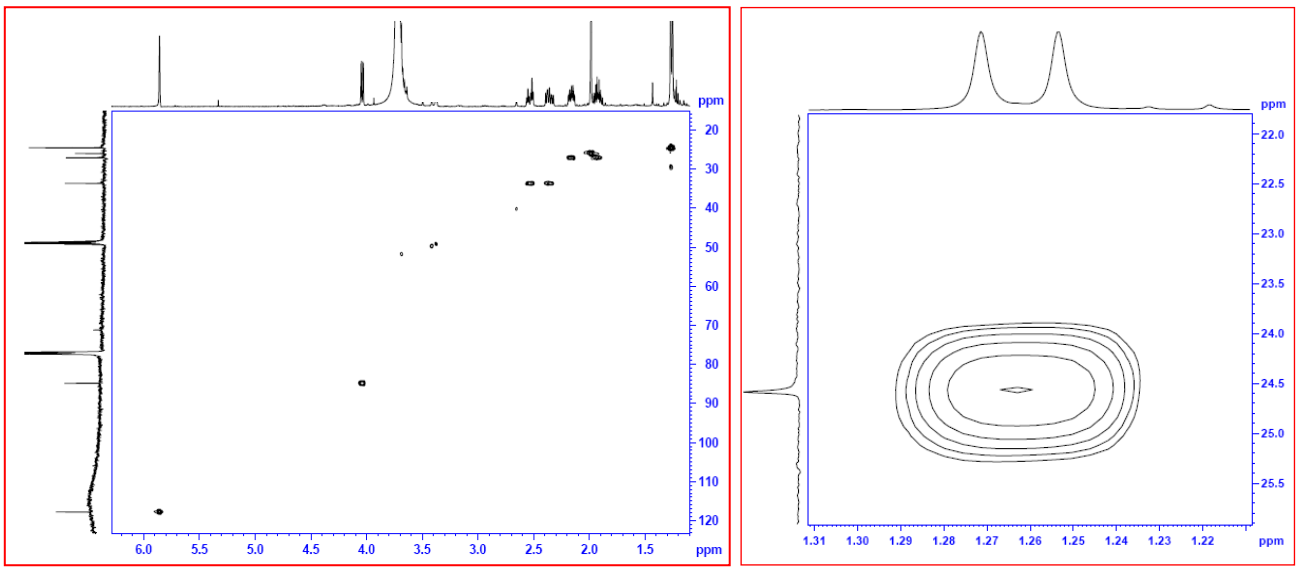


Figura 53: Espectro HSQC-DEPT del compuesto **6** y una ampliación

El experimento HMBC confirmó las estructuras parciales propuestas además de permitir elucidar completamente la estructura del compuesto **6**. Se observó que los dos grupos metilos de δ 1.27 y 1.25 correlacionaban con el carbono cuaternario a δ 71.2 y con el carbono oxigenado a δ 84.7, mientras que tanto el protón olefínico de δ 5.86 como el de δ 4.04 lo hacían con el carbonilo a δ 169.3. Esta última observación resultó muy importante ya que permitió determinar que el compuesto **6** poseía un anillo lactónico de 7 miembros.

En la figura 54 se muestra el espectro HMBC y algunas correlaciones ampliadas.

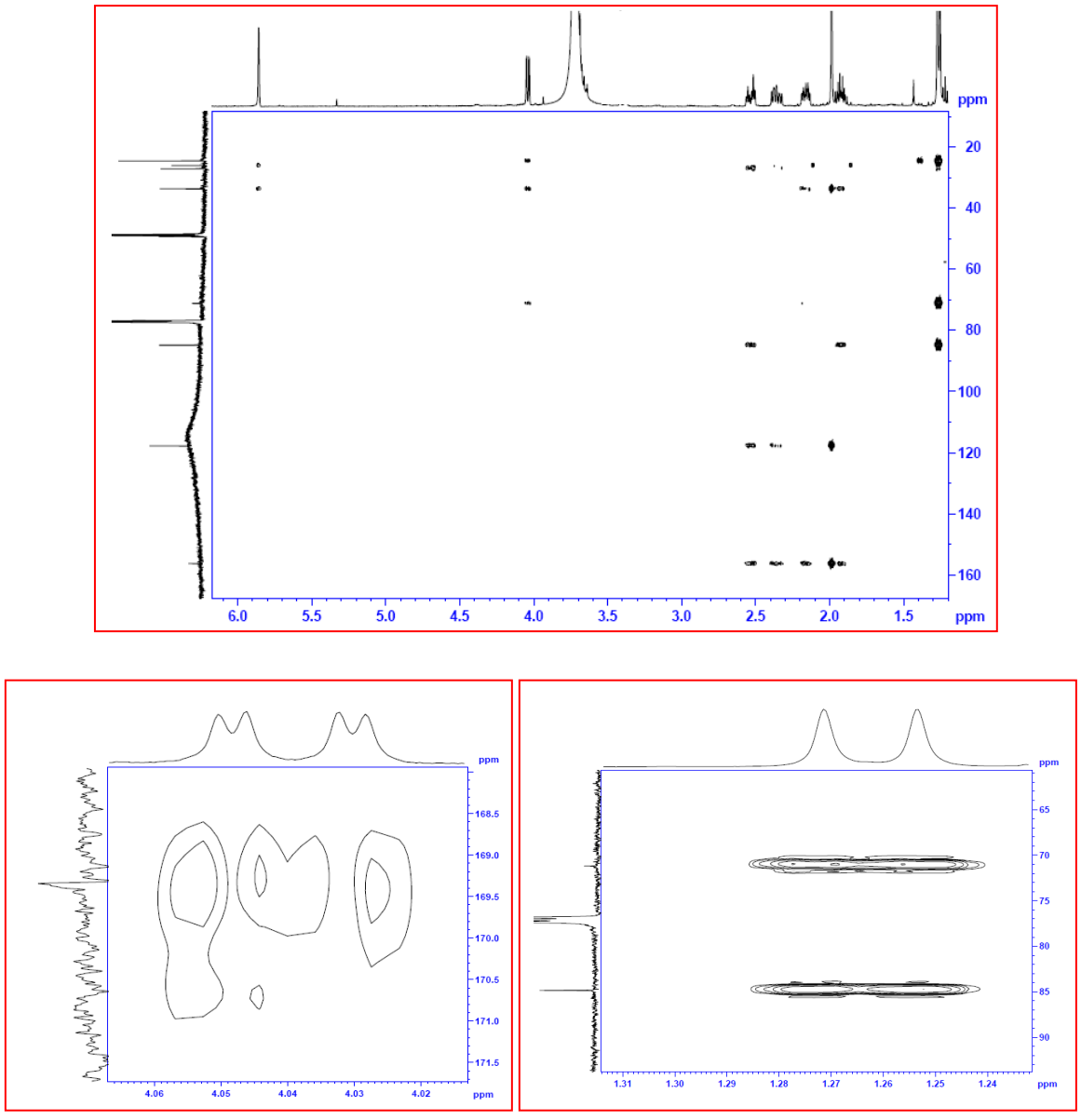


Figura 54: Algunas ampliaciones del espectro HMBC del compuesto **6**

Quedó así determinada la estructura del compuesto **6,** que se muestra en la figura 55. En la misma figura se pueden observar las correlaciones mencionadas anteriormente del espectro HMBC.

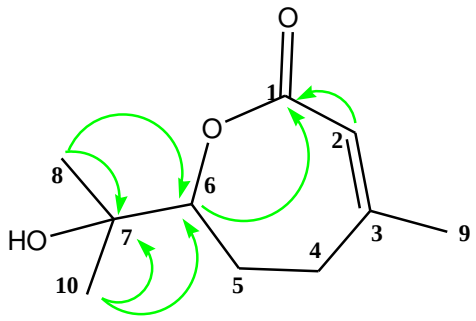


Figura 55: Estructura propuesta para el compuesto **6** y correlaciones importantes observadas en el espectro HMBC

El espectro ROESY permitió confirmar la configuración **Z** del doble enlace. Se observó una fuerte correlación entre el protón olefínico y el grupo metilo unido al doble enlace (figura 56).

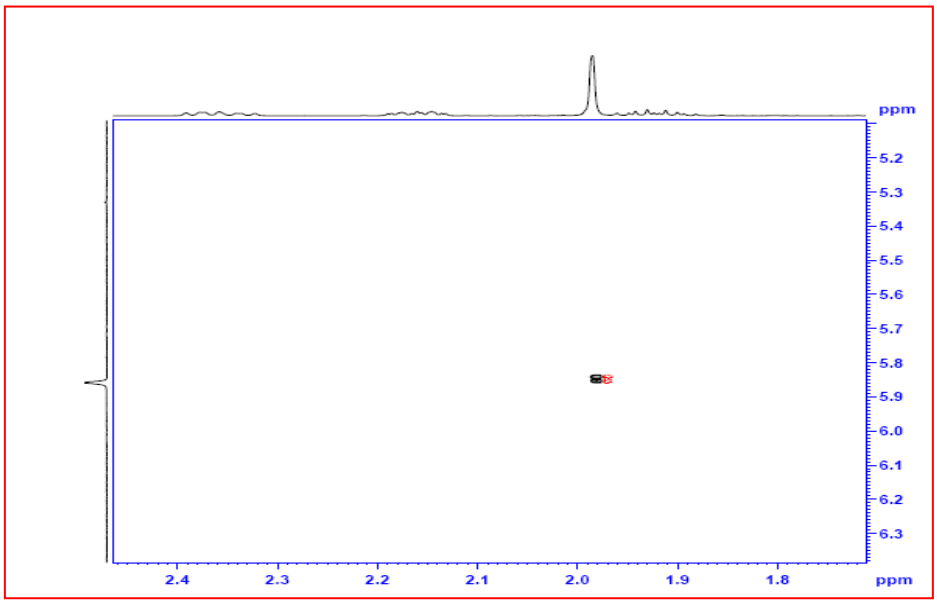


Figura 56: Ampliación del espectro ROESY del compuesto **6**

Compuesto 7

El ión molecular obtenido por espectrometría de masa para el compuesto **7** fue m/z 138 (determinado por la técnica de ionización por electrones). En el espectro RMN-^{1}H ($CDCl_3$) del compuesto **7** (figura 57) se observó la presencia de dos dobletes a δ 7.01 (8.1 Hz) y 6.73 (8.1 Hz) que integraba cada uno para dos protones, lo cual estaría indicando la presencia de un anillo aromático *para*-disustituído. Se observaron también dos tripletes a δ 3.73 (6.8 Hz) y 2.72 (6.8 Hz) correspondientes a dos grupos metilenos, el primero de ellos probablemente perteneciente a un carbono oxigenado.

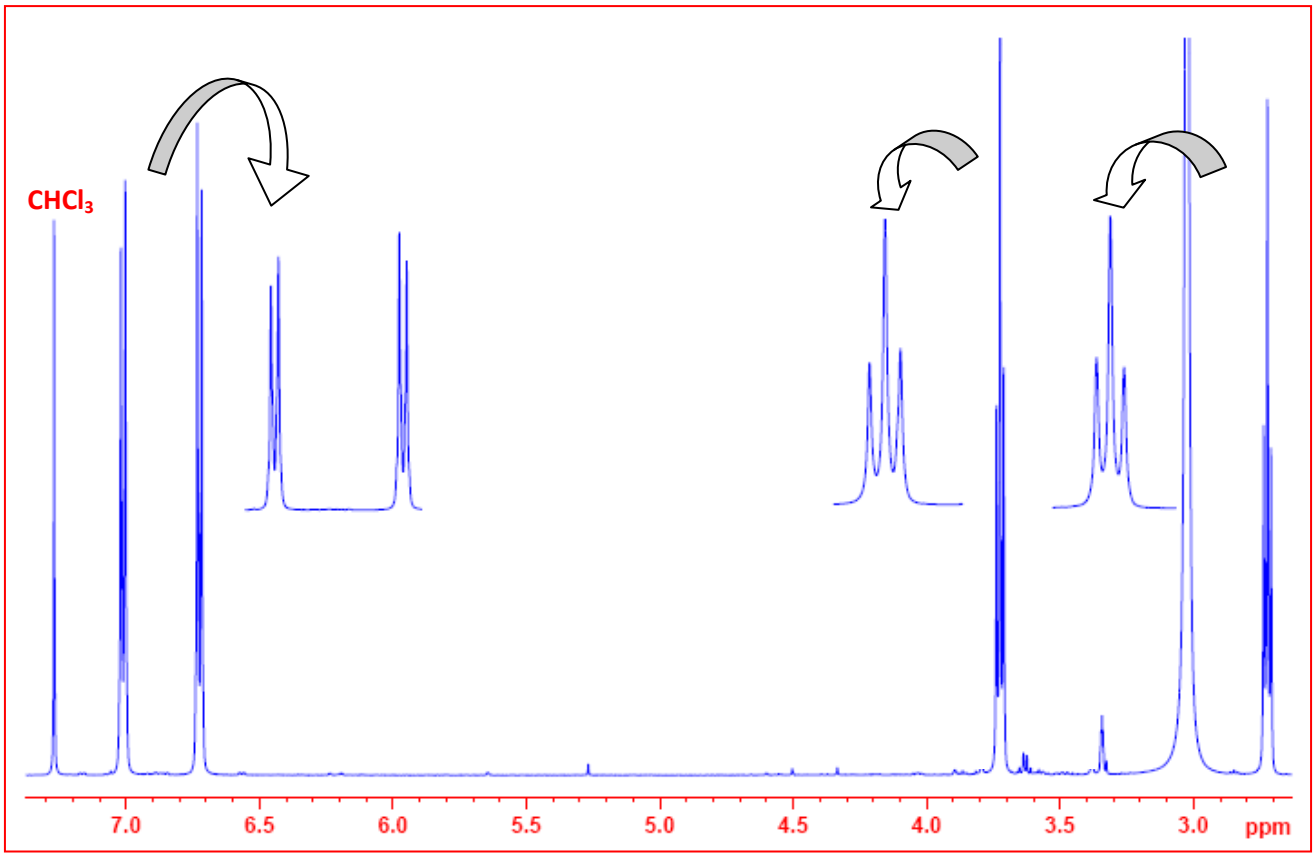


Figura 57: Espectro RMN ^{1}H del compuesto **7** ($CDCl_3$)

Teniendo en cuenta estos datos, y el espectro RMN-^{13}C ($CDCl_3$) que presentó 6 señales, 4 en la zona aromática (δ 155.1, 130.0, 129.6, 115.6) y dos en la zona alifática, (δ 63.7, 38.3), se determinó entonces la estructura del compuesto **7** como p-hidroxifeniletanol (figura 58).

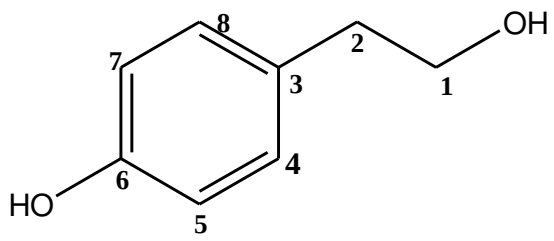


Figura 58: Estructura propuesta para el compuesto **7**

Los datos espectroscópicos obtenidos de RMN-^{1}H, RMN-^{13}C y espectrometría de masa para el compuesto **7**, coinciden con los publicados en la base de datos japonesa SDBS[8].

Compuesto 8

La fórmula molecular del compuesto **8** fue determinada por espectrometría de masa utilizando la técnica de ionización (ESI/APCI) con alta precisión, siendo la misma $C_{10}H_{18}O_4$ sobre la base del ión $[M+Na]^+$ medido a m/z 225.1099, indicando que **8** poseía 18 unidades de masa (2H y 1 O) más que **6**.

Tanto el espectro RMN-H^{1} (figura 59) como el de RMN-^{13}C (figura 60) resultaron ser muy similares a los observados para el compuesto **6.** La principal diferencia en el espectro RMN-H^{1} se encontraba en que el compuesto **8** presentaba una señal como doblete a δ 3.32 en lugar de un doble doblete a δ 4.04. En el espectro de RMN-^{13}C, las principales diferencias se encontraban en los corrimientos de C-6 de 84.7 a 76.7 ppm y de C-3 de 156.2 a 161.8 ppm en el compuesto **8**. Estas diferencias sugerían que el compuesto 8 podría ser la forma abierta de la lactona **6**.

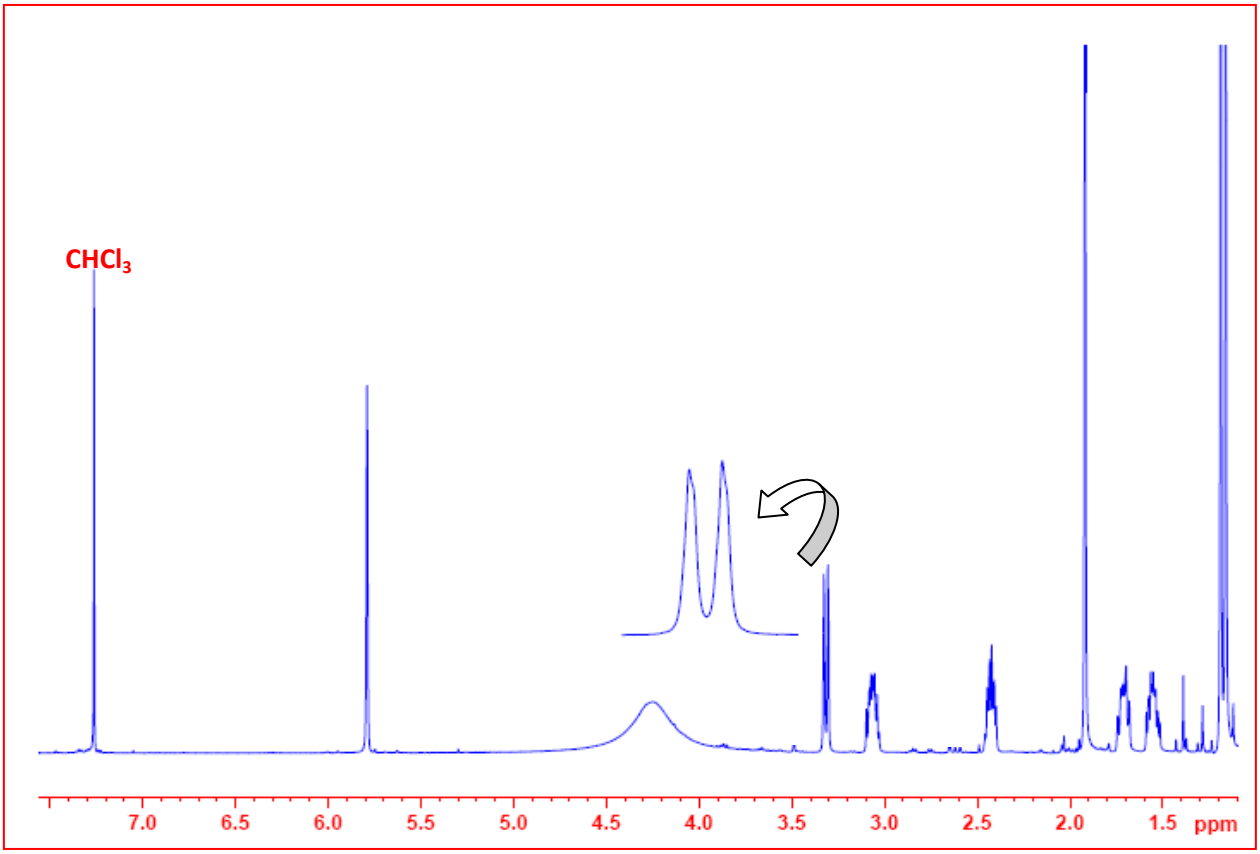


Figura 59: Espectro RMN-H^1 del compuesto **8** ($CDCl_3$)

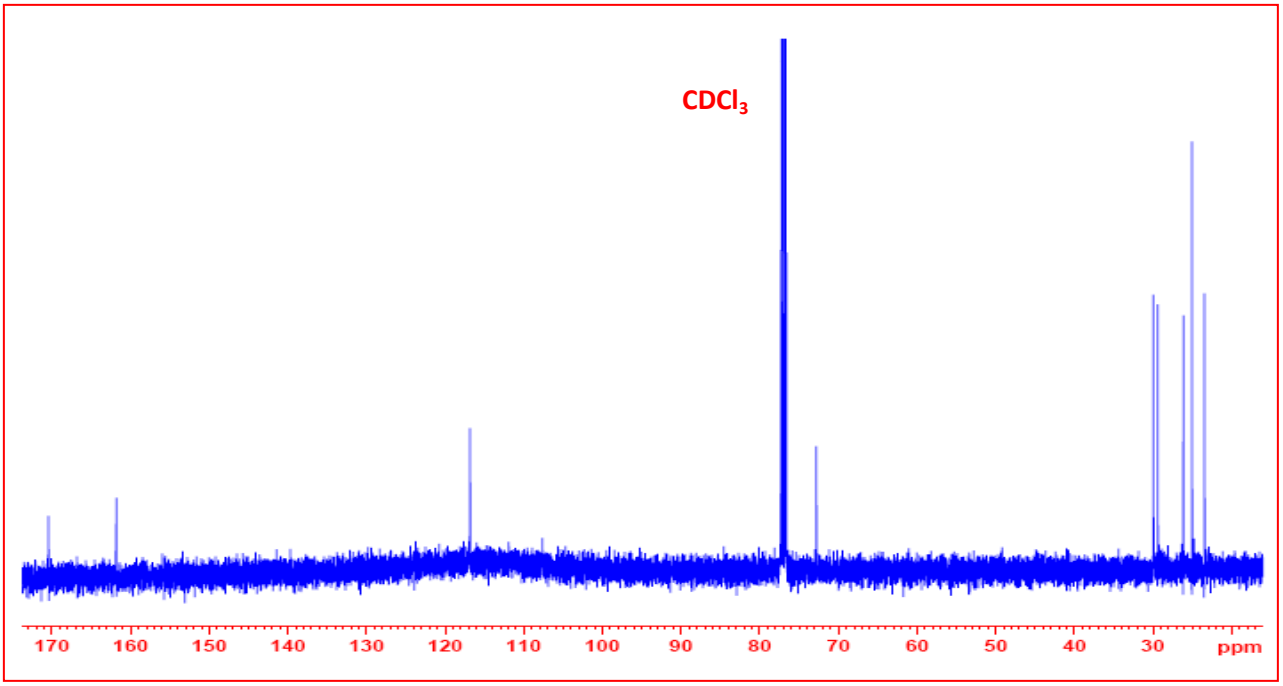


Figura 60: Espectro RMN - ^{13}C del compuesto **8** ($CDCl_3$)

En forma coherente con esta suposición, no se observó la presencia de correlación entre el H-6 (δ=3.32) y el C-1 (δ= 170.4) en el espectro HMBC (figura 62). Todos los espectros de correlación realizados confirmaron la estructura propuesta (figura 61), mostrándose en la misma figura algunas de las correlaciones observadas en los espectros COSY y HMBC.

En el espectro ROESY se observó, al igual que para el compuesto **6** una correlación entre el protón olefínco de δ 5.79 (H-2) y los protones del metilo unido al doble enlace (H-9) (figura 63), deduciéndose que la configuración del doble enlace también era Z.

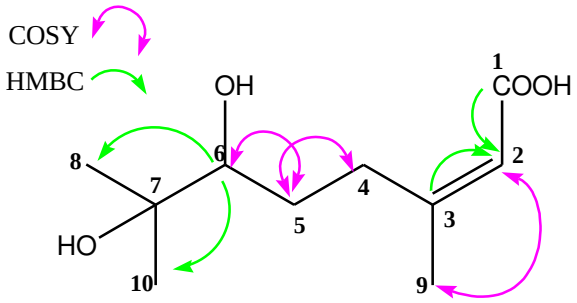


Figura 61: Estructura del compuesto **8** y correlaciones observadas en los espectros COSY y HMBC

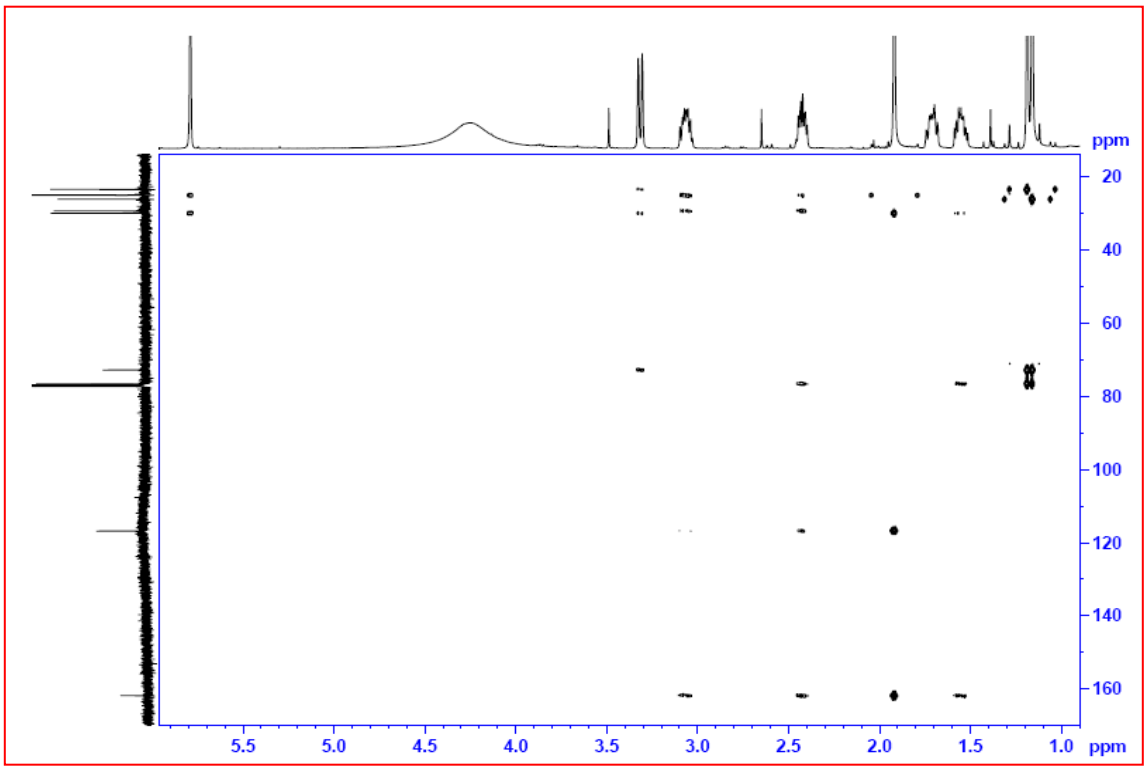


Figura 62: Espectro HMBC del compuesto **8**

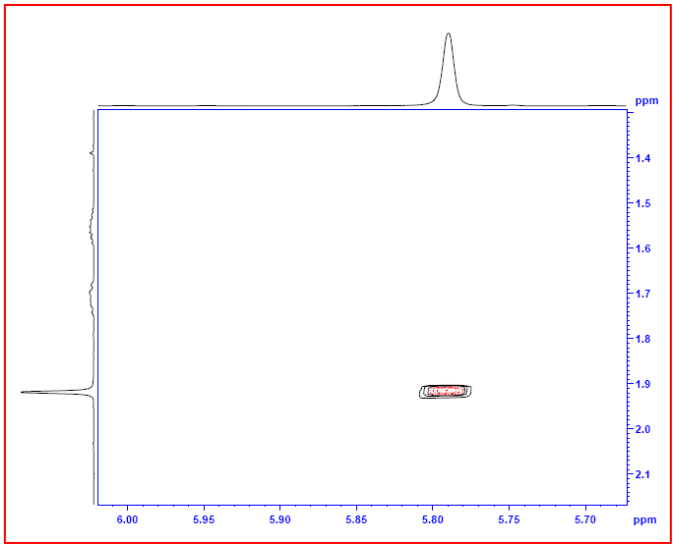


Figura 63: Ampliación de una región del espectro ROESY del compuesto **8**

La estereoquímica absoluta del único centro quiral, C-6, del compuesto **8** metilado con CH_2N_2, fue determinada mediante la utilización del método de Mosher modificado[9] a través de la derivatización química con el cloruro del ácido *S* y *R*-α- metoxi-trifluorometil-fenilacético (MTPA) (figura 64) y el análisis subsecuente de los ésteres diastereoméricos resultantes por RMN-^{1}H.

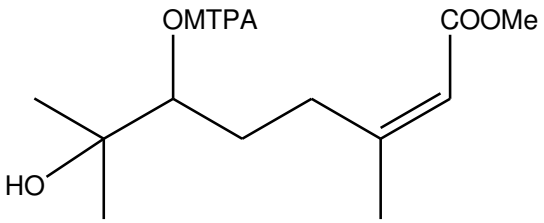


Figura 64: Derivado de Mosher del compuesto **8**

Se encontraron valores de $\Delta\delta$ (δ_S-δ_R) negativos para H-10 y H-8 mientras que para H-9, H-4 y H-2 los valores fueron positivos (figura 65). Siguiendo las reglas del método[9], estos datos indicaron una configuración *R* en el C-6.

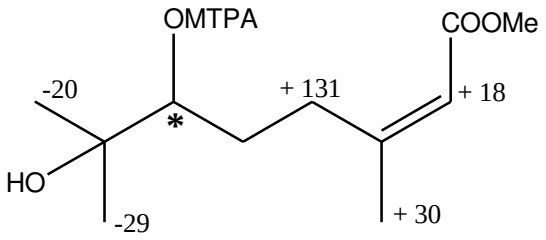


Figura 65: Valores de $\Delta\delta$ (en Hz) obtenidos para los derivados de MTPA del compuesto **8**

Debido a que el compuesto **6** presentaba también un único centro quiral en la molécula, el mismo que **8**, teniendo en cuenta además que para ambos compuestos el signo del poder rotatorio era negativo y que ambos compuestos estaban estructuralmente relacionados, se asumió que la configuración de C-6 era también *R* en el compuesto **6** (figura 66). La relación estructural entre ambos compuestos también se determinó químicamente, ya que al tratar al compuesto **8** con HCl concentrado en MeOH, se convirtió en **6** y al tratar a **6** con NaOH 40⁄ en MeOH se transformó en **8**.

La estereoquímica absoluta y el signo del poder rotatorio hallados resultaron coincidentes con datos informados previamente para un diol de farnesilacetona (figura 67), relacionado estructuralmente con los compuestos **6** y **8**, aislado de *Cystophora moniliformis*[10].

Los compuestos **6** y **8** resultaron poseer una estructura no informada previamente como productos naturales.

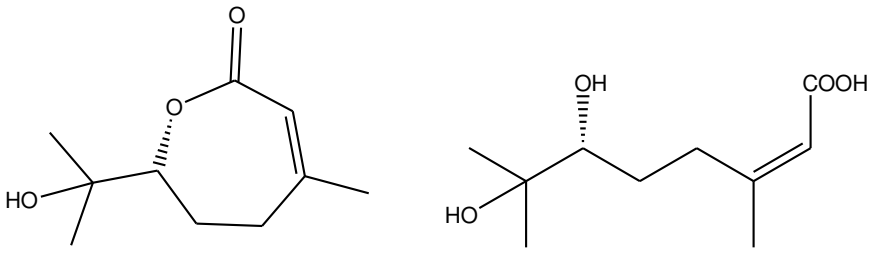


Figura 66: Estructuras de los compuestos **6** y **8**

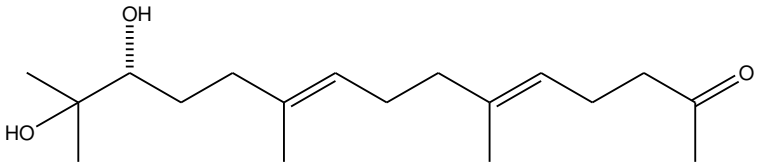


Figura 67: Estructura de un diol de farnesilacetona

Recientemente se ha publicado la obtención de una mezcla racémica del compuesto **6** como producto secundario de la reacción de 6,7-epoxicitral y malononitrilo[11].

El compuesto **7** fue aislado de diversas fuentes naturales, por ejemplo como metabolito de la esponja marina china *Cinachyrella australiensis*[12], como componente del aceite de la semilla *Neem Azadirachta indica* (Meliaceae)[13] y como metabolito secundario bioactivo inhibidor del citocromo CYP3A4, responsable de metabolizar drogas, aislado del cultivo de una especie marina de *Penicillium*[14]. Por otro lado este compuesto es comercializado como intermediario de la síntesis de metoprolol, medicamento utilizado en enfermedades cardio y cerebro vasculares, bajo el número de registro CAS 501-94-0.

Se ha publicado una patente sobre la síntesis del isómero *E* del compuesto **8** a partir del ácido geránico, para ser utilizado como principio activo en medicamentos tópicos para el tratamiento de acné, psoriasis y lesiones pre-cancerígenas de piel[15].

❖ Actividad biológica.

La actividad antibiótica de los compuestos **6** a **8** fue determinada mediante el método de difusión en agar[16] frente a cepas ATCC de *Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* y frente a dos cepas de *P. larvae* (A y C), ambas provenientes del laboratorio de bacteriología del departamento de producción animal, INTA, EEA Balcarce.

Tanto el compuesto **6** como el compuesto **8** mostraron resultados positivos frente a *B. subtillis*, con halos de inhibición de 6 y 11 mm respectivamente. Por otro lado el compuesto **8** mostró actividad antibiótica frente a *S. aureus* con una zona de inhibición de 12 mm de diámetro y el compuesto **6** contra *E. coli* con un halo de 7 mm. Estos valores corresponden a una actividad moderada o baja (< 10

mm). Como compuesto testigo se utilizó el antibiótico comercial gentamicina, el cual presentó halos de inhibición entre 25-30 mm a concentraciones similares.

En una publicación del año 1993[7] se informó sobre el estudio de la actividad de un cultivo de *A. apis* frente a *P. larvae*, aislándose un único metabolito activo, el ácido 9, 12-octadecadienoico (ácido linoleico). Sin embargo en este trabajo no se ha encontrado actividad antibiótica alguna frente a *P. larvae*.

Para evaluar la actividad antifúngica se empleó el método de bioautografía directa sobre placas de ccd[17], a una concentración de 50 μg/punto. Se utilizó benomyl como compuesto testigo que presentó zonas de inhibición entre 20 y 28 mm a una concentración de 25μg/punto. Tanto el compuesto **6** como el **8** mostraron resultados positivos leves frente a *F. lateritium* con halos de inhibición de 4 y 5 mm respectivamente, mientras que el compuesto **7** mostró buena actividad antifúngica frente a *F. virguliforme,* con 15 mm de halo de inhibición.

Por último se evaluó la actividad antioxidante de los compuestos **6** y **8** mediante el ensayo de decoloración de una solución metanólica del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)[18], utilizando como referencia catequina. Los porcentajes de decoloración obtenidos fueron: compuesto **6** (100μg), 34⁄ , compuesto **8** (100μg), 37⁄ y catequina (10μg y 1μg), 96⁄ y 36⁄ . Es decir, los compuestos **6** y **8** presentan una leve actividad antioxidante.

❖ Biosíntesis.

Tanto el compuesto **6** como el **8** podrían biosintetizarse a través de la ruta típica de isoprenoides a geraniol[19] , luego a geranial, neral y ácido nérico[20, 21] (figura 68). La dihidroxilación del ácido nérico llevaría a la formación del compuesto **8**, el cual luego podría ciclarse para dar como producto la lactona **6**.

Como los intermediarios biosintéticos no fueron aislados, no puede excluirse la biosíntesis a través de una ruta más compleja, por ejemplo a través de la oxidación de terpenos cíclicos. Se conoce sobre la presencia de Baeyer-Villiger monooxigenasas en diversos microorganismos[22], las cuales poseen la capacidad de transformar monoterpenos cíclicos en sus correspondientes ε-lactonas, y además se ha demostrado que los microorganismos con esta habilidad pueden tener también

actividad hidrolasa sobre las lactonas formadas, con lo cual se podría explicar la presencia del compuesto **8** (lactona) y de su producto hidrolizado (compuesto **6**).

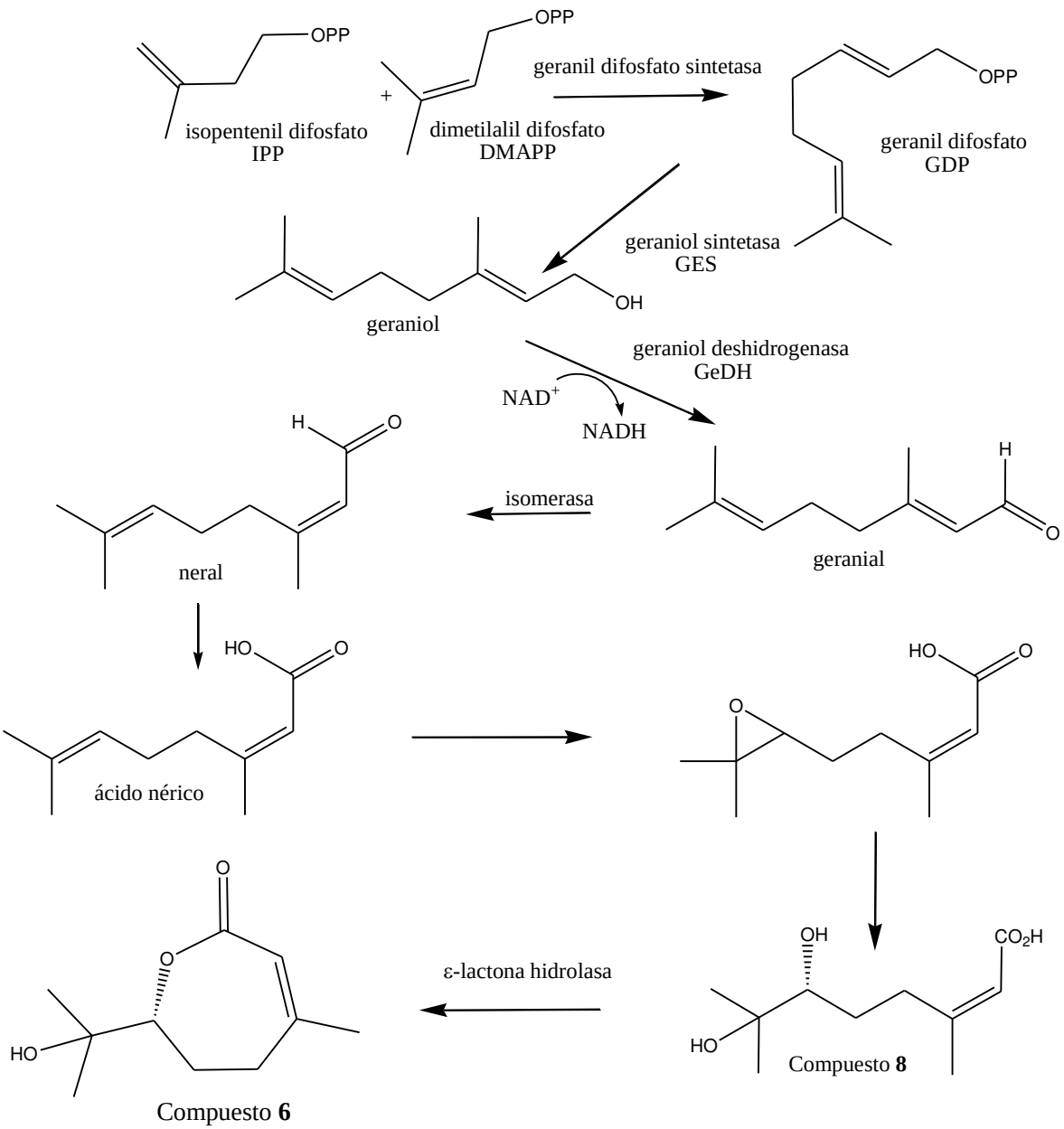


Figura 68: Ruta biosintética propuesta para el ácido nérico y para los compuestos **6** y **8**[19-22]

❖ Antecedentes de compuestos con estructura similar.

Si bien diversas clases de monoterpenos han sido aisladas previamente de hongos[23], los compuestos **6** y **8** no fueron aislados con anterioridad de ninguna fuente natural. Entre los muchos ejemplos de monoterpenos aislados de microorganismos, pueden citarse geraniol y nerol presentes en *Trametes odorata*[24] y *Cetatocystis moniliformis*[25], mientras que del cultivo del hongo endofítico *Phomopsis sp.* se aisló el monoterpeno dihidroxisabinano (figura 69)[26].

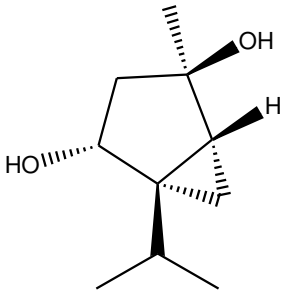
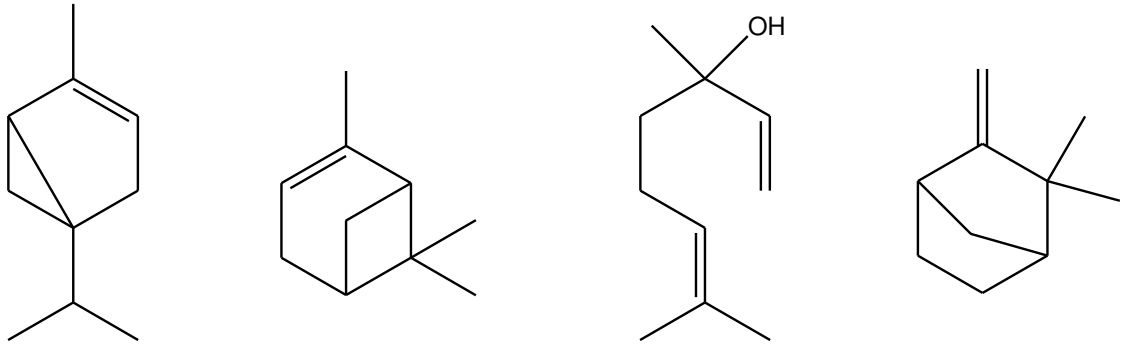


Figura 69: Estructura de dihidroxisabinano

Por otro lado se han aislado también compuestos monoterpénicos de *Amanita ovoidea, Amanita citrina, Agrocybe aegerita, Cantharellus cibarius,* entre otras especies de hongos. Los principales monoterpenos aislados de estas especies se muestran en la figura 70[23].



α-tujeno α-pineno linalool camfeno

Figura 70: Monoterpenos aislados de hongos[23]

❖ Antecedentes de otros compuestos aislados de cultivos de la misma especie.

Como se mencionó previamente, existe un único estudio del cultivo de *A. apis* previo a este trabajo. El único compuesto aislado en esa oportunidad fue el ácido linoleico, reportándolo como responsable de la actividad antibiótica frente a *P. larvae*.

❖ Conclusión.

A partir de un cultivo del hongo *A. apis* se aislaron y elucidaron dos monoterpenos **6** y **8**, de estructura química no informada previamente como productos naturales y un fenol, compuesto **7**.

Los compuestos **6** y **8** mostraron actividades antimicrobianas moderadas y antioxidantes leves, mientras que el compuesto **7** mostró buena actividad antifúngica frente al hongo fitopatógeno *F. virguliforme*.

Numerosos productos químicos han sido probados para intentar controlar la ascosfaerosis en colonias de abejas productoras de miel. Tanto el geraniol, el citral como el citronelal, todos compuestos relacionados estructuralmente con **6** y **8**, han probado inhibir el crecimiento del hongo patógeno[27].

Por otro lado, es sabido que los monoterpenos como el citronelal y el nerol, son tóxicos para las larvas del escarabajo de la papa de Colorado[28], mientras que el citral posee actividad insecticida contra el mosquito *Culex pipiens quinquefasciatus*[29].

También se sabe que las abejas poseen el sistema de comunicación feromonal más complejo que existe en la naturaleza. Entre las feromonas conocidas figuran los ácidos geránico y nérico[30, 31].

Debido a estos hechos cabe pensar que la producción del compuesto **6** y/o del **8** por parte de *A. apis* tiene algún propósito determinado, ya sea en la causa de la enfermedad de las larvas de las abejas o en el favorecimiento de la infección.

El compuesto 4-hidroxi-3-metoxifeniletanol, relacionado estructuralmente con el compuesto **7**, también se ha informado como una feromona mandibular de la abeja reina [32].

Sería interesante poder estudiar la relación directa que puede existir entre los compuestos aislados y las abejas *in vivo* para poder así determinar fehacientemente la actividad que poseen como feromonas. Para este propósito se plantea sintetizar los compuestos en un futuro cercano para poder realizar los ensayos *in vivo* en un centro especializado.

Este trabajo dio origen a una publicación[33].

❖ Detalles experimentales.

La cepa estudiada del hongo *A. apis* (Maassen ex Claussen) Spiltoir y Olive fue aislada de polen del interior de colmenas, clasificada por la Dra. Nora Peña y depositada en el cepario de hongos de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, Argentina (BAFC), con el número BAFC 3298.

Cultivo de *A. apis.*

La fermentación fue llevada a cabo utilizando como medio de cultivo MY20 líquido, el cual está compuesto por 20⁄ de glucosa, 0.5⁄ de peptona, 0.3⁄ de extracto de malta y 0.3⁄ de extracto de levadura. Como primer paso se deben colocar a baño María 70 ml de agua junto con la levadura y el extracto de malta hasta disolución total. Por otro lado se disuelve la glucosa en 30 ml de agua. Luego se mezclan ambas soluciones y se autoclava a 120° C y 1 atmósfera durante 20 minutos.

Se realizaron cultivos en caja de Petri con agar MY20, compuesto por los nutrientes mencionados en el párrafo anterior más el agregado de un 2⁄ de agar junto con la levadura y el extracto de malta. Porciones pequeñas de 1 cm por 1 cm aproximadamente fueron empleadas para inocular 2 erlenmeyers de 250 ml conteniendo 75 ml de medio líquido cada uno. A la semana, estos cultivos líquidos fueron utilizados como inóculo de 2 cultivos de 1 litro cada uno con el mismo medio contenidos en erlenmeyers de 4 litros. La fermentación fue llevada a cabo a 25°C por 10 días bajo condiciones estáticas. Las condiciones óptimas fueron determinadas previamente en experimentos de escala menor.

Extracción y fraccionamiento.

El cultivo fue filtrado, separando el medio de cultivo del micelio del hongo. Este último fue descartado, ya que en estudios previos se había determinado que era inactivo en los bioensayos testeados y no presentaba interés por ccd, y el medio de cultivo fue extraído con acetato de etilo (3 x 500 ml). La masa de extracto obtenida fue de 2.2 g luego de ser evaporado en evaporador rotatorio. Como paso siguiente se fraccionó el extracto mediante cromatografía flash en columna seca en sílica gel, utilizando como eluyente mezclas de polaridad creciente de CH_2Cl_2:AcOEt.

Se recogieron 10 fracciones de 200 ml cada una. Las fracciones III (134 mg, eluída con la mezcla CH_2Cl_2-AcOEt 60:40) y IV (106.4 mg, eluída con AcOEt puro) se purificaron mediante HPLC, utilizando una columna de fase reversa (YMC C 18, 5 μm, 20 x 250 mm, CH_3OH:H_2O (30:70) como eluyente, flujo 3 ml/min, detectores UV a 254nm e índice de refracción en serie). De esta separación se obtuvieron de la fracción III el compuesto **6** (3.7 mg, 0.17⁄ del extracto original) y el compuesto **7** (4.5 mg, 0.20⁄ del extracto original) y de la fracción IV, el compuesto **8** (14.7 mg, 0.67⁄ del extracto original).

Los compuestos **6** y **8** revelaron manchas amarillo-verdosas con vainillina y presentaban un Rf de 0.6 y 0.4 en CH_2Cl_2: AcOEt (50/50) respectivamente.

Ensayo de decoloración de DPPH.

Para medir la actividad antioxidante se utilizaron 100, 50, y 10 μg/ml de los compuestos **6** y **8** puros mediante el ensayo de decoloración de una solución metanólica del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo ($DPPH^{\bullet}$)[18]. Para realizar el ensayo se preparó una solución metanólica fresca de $DPPH^{\bullet}$ (Sigma Aldrich) (20 mg/l), la cual fue utilizada como blanco. Los compuestos fueron disueltos en metanol. Como control positivo se utilizó catequina (10 y 1 μg/ml). La capacidad antioxidante se determinó espectroscópicamente a 517 nm, como el porcentaje de decoloración del radical $DPPH^{\bullet}$, utilizando la siguiente ecuación:

Porcentaje de decoloración = (1-(Abs. del compuesto/ Abs. del blanco)) X 100

Propiedades físicas de los compuestos aislados.

Compuesto **6** ((6*R*)-3,7-*dimetil*-7-*hidroxi*-2(*Z*)-*octen*-6-ólido)**:** aceite amarillo; **$[\alpha]_D^{25}$**:-56˚ (c = 0.1, MeOH); **UV**(MeOH) $\lambda_{máx}$ (log ε): 224 nm (2.7); **FTIR** (KBr) $\nu_{máx}$: 3439 (OH), 2962 (CH), 2920 (CH), 2850 (CH), 1688 (CO), 1374, 1291, 1071, 1080 cm^{-1}; **EM-AR ESI/APCI** *m/z:* $[M+H]^+$ 185.1183, (valor calculado para $C_{10}H_{17}O_3$, 185.1178, Δ 2.9 ppm), $[M+Na]^+$ 207.1001 (valor calculado para $C_{10}H_{16}O_3Na$, 207.0997, Δ 1.7 ppm). Los valores de RMN-^{1}H y RMN-^{13}C se detallan en la tabla 4.

Compuesto **7** (2-(p-hidroxifenil) etanol): aceite amarillo; **EM EI** (70 eV) *m/z* (abundancia relativa): 138 $[M]^{+\cdot}$ (55), 107 $C_7H_7O^+$ (100). **RMN-^{1}H** ($CDCl_3$): δ 7.01 (d, *J* = 8.1 Hz, H-4, 8), 6.73 (d, *J* = 8.1 Hz, H-5,7), 3.73 (t, *J* = 6.8 Hz, H-1), 2.72 (t, *J* = 6.8 Hz, H-2); **RMN-^{13}C** ($CDCl_3$): δ 155.1, C-6; 130.0, C-4, 8; 129.6, C-3; 115.6, C-5, 7; 63.7, C-1; 38.3, C-2.

Compuesto **8** (ácido (6*R*)-3,7-*dimetil*-6,7-di*hidroxi*-2(*Z*)-*octenoico*)**:** aceite amarillo; **$[\alpha]_D^{25}$**:-10˚ (c = 0.1, MeOH); **UV**(MeOH) $\lambda_{máx}$ (log ε) : 226 nm (2.7); **FTIR** (KBr) $\nu_{máx}$: 3384 (OH), 2976 (CH), 2912 (CH), 2848 (CH), 1693 (CO), 1646 (CC), 1435, 1380, 1244, 1188, 1072 cm^{-1}**; EM FAB$^+$ (Gly)** *m/z* (abundancia relativa): 203 $[M+H]^+$ (70), 185 $[M+H-H_2O]^+$ (60), 167 $[M+H-2H_2O]^+$ (100); **EM FAB$^-$ (Gly)** *m/z* (abundancia relativa): 201 $[M-H]^-$ (100), **EM-AR ESI/APCI** *m/z:* $[M+Na]^+$ 225.1099, (valor calculado para $C_{10}H_{18}O_4Na$, 225.1106, Δ 1.7 ppm). Los datos de los espectros RMN-^{1}H y RMN-^{13}C se detallan en la tabla 4.

	Compuesto **6**[a]		Compuesto **8**[b]	
	^{13}C	^{1}H	^{13}C	^{1}H
1	169.3		170.4	
2	117.8	5.86 qa (1.2)	116.8	5.79 sa
3	156.2		161.8	
4	33.6	2.53 dt (17.7, 5.6)	29.9	3.07 m
		2.36 ddd (17.7, 8.8, 7.0)		2.42m
5	27.2	2.16 m	29.4	1.71m
		1.93 m		1.56m
6	84.7	4.04 dd (9.0, 2.1)	76.7	3.32 da (11.0)
7	71.2		72.8	
8	24.6	1.27 s	26.1	1.19 s
9	26.1	1.98 sa	25.0	1.92 sa
10	24.6	1.25 s	23.4	1.16 s
OH				4.25 sa

Las asignaciones están basadas en experimentos COSY H, H, HSQC y HMBC. [a] $CDCl_3$-CD_3OD, 95:5, [b] $CDCl_3$

Tabla 4: Datos espectroscópicos de los compuesto **6** y **8**, δ en ppm (*J* en Hz)

Determinación de la configuración absoluta del éster metílico del compuesto 8 mediante la preparación de los ésteres de (R) y (S)-MTPA.

El compuesto **8** (1mg) fue metilado con una solución etérea de CH_2N_2 (1ml). Luego, 10 µl del cloruro de *(S) (*o *(R)*) MTPA fueron agregados a 200 µl de una solución del éster metílico de **8** en piridina, dejando la mezcla a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación. La mezcla fue entonces volcada sobre un baño de hielo con HCl (c), extraída con AcOEt (3x2 ml), lavada con una solución acuosa de $NaHCO_3$ al 5⁄ y luego con agua. La fase orgánica se evaporó hasta sequedad y los diésteres derivados **8a** (*R*-MTPA) y **8b** (*S*-MTPA) fueron purificados mediante ccd preparativa utilizando una mezcla de CH_2Cl_2-AcOEt (80:20) como fase móvil.

Derivado **8a**: **RMN-^{1}H** ($CDCl_3$): δ 5.656 (sa, 1H, H-2), 2.183 (dt, *J* = 11.6, 5.0 Hz, H-4a), 2.803 (m, H-4b), 1.183 (s, 3H, H-8), 1.792 (s, 3H, H-9), 1.247 (s, 3H, H-10).

Derivado **8b**: **RMN-^{1}H** ($CDCl_3$): δ 5.692 (sa, 1H, H-2), 2.445 (dt, *J* = 11.7, 5.4 Hz, H-4a), 2.803 (m, H-4b), 1.143 (s, 3H, H-8), 1.852 (s, 3H, H-9), 1.188 (s, 3H, H-10).

❖ Bibliografía.

1. López, L. V., Hans Börje, J., Biodiversidad del suelo: control biológico de nematodos fitopatógenos por hongos nematófagos. *Cuaderno de Biodiversidad* **2001,** 6, 12 – 15.

2. Mound, L. A., Marullo, R. , The thrips of central and south America: An introduction (Insecta: *Thysanoptera*). *Memoirs in Entomology International* **1996,** 6, 1- 487.

3. Mollier, P., Lagnel, J., Fournet, B., Aïoun, A., Riba, G. , A glycoprotein highly toxic for *Galleria melonela* larvae secreted by the entomopathogenic fungus *Beauveria sulfurecens*. *Journal of Invertebrate Pathology* **1994,** 64, 200-207.

4. Asaff, A., Cerda-García-Rojas, C., De la Torre, M. , Isolation of dipicolinic acid as an insecticidal toxin from *Paecilomyces fumosoroseus*. *Applied Microbiology Biotechnology* **2005,** 68, 542- 547.

5. Skrobek, A., Farooq, S., Butt, T. M., Destruxin production by the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* in insects and factors influencing their degradation. *BioControl* **2008,** 53, 361-373.

6. Vey, A., Quiot, J. M., Mazet, I., McCoy, C. W. , Toxicity and pathology of crude broth filtrate produced by *Hirsutella thompsonii* var. thompsonii in shake culture. *Journal of Invertebrate Pathology* **1993,** 61, 131-137.

7. Feldlaufer, M. F., Lusby, W. R., Knox, D. A., Shimanuki, H., Isolation and identification of linoleic acid as an antimicrobial agent from the chalckbrood fungus *Ascosphaera apis*. *Apidologie* **1993,** 24, 89-94.

8. Spectral database for organic compounds (SDBS). *National Institute of Advanced Industrial Science and Technology* **2001**.

9. Ohtani, I., Kusumi, T., Kashman Y., Kakisawa, H., High-field FTNMR application of Mosher´s method. The absolute configurations of marine terpenoids. *Journal of American Chemical Society* **1991,** 113, 4092-4096.

10. Ravi, B. N., Murphy, P. T., Lidgard, R. O., Warren, R. G., Wells, R. J., C_{18} terpenoid metabolites of the brown alga *Cystophora moniliformis*. *Australian Journal of Chemistry* **1982,** 35, 171-182.

11. Volcho, K. P., Yarovaya, O. I., Kurbakova, S. Y., Korchagina, D. V., Barkhash, V. A., Salakhutdinov, N. F., Synthesis of epoxy dinitriles from citral and their acid-catalyzed transformations. *Russian Journal of Organic Chemistry* **2007,** 43, 511-517.

12. Liya, L., Zhiwei, D., Jun, L., Hongzheng, F., Wenhan, L., Chemical constituents from chinese marine sponge *Cinachyrella australiensis*. *Beijing daxue Xuebao, Yixueban* **2004,** 36, 12-17.

13. Gosse, B., Amissa, A., Adje, F. A., Niamke, F. B., Ollivier, D., Ito, Y.I., Analysis of components of neem (*Azadirachta indica*) oil by diverse chromatographic techniques. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **2005,** 28, 2225-2233.

14. Ahmed Atef, E. B., Hikaru, K., Sachiko, T., Tomihisa, O., CYP3A4 inhibitors isolated from a marine derived fungus *Penicillium species*. *Journal of Natural Medicines* **2007,** 61, 175-177.

15. Burton, A. F., McLean, D., Medium chain fatty acids of C8-10 for the treatment of skin lesions. *United States Patent* **1992,** 5.175.190.

16. Vander-berghe, D. A., Vlietinck, A. J., Screening methods for antibacterial and antiviral agents for higher plants. en "Methods in Plant Biochemistry", ed Dey, P. M., Harbone, J. B., *Academic Press INC., San Diego, CA* **1991,** 6, Assays for Bioactivity, ed *Hosttetman, K.,* 47-69.

17. Homans, A. L., Fuchs, A., Direct bioautography on thin-layer chromatography as a method for detecting fungitoxic substances. *Journal of Chromatography* **1970,** 51, 325-328.

18. Tapia, A., Rodriguez, J., Theoduloz, C., Lopez, S., Egly Feresin, G., Schmeda-Hirschmann, G., Free radical scavengers and antioxidants from *Baccharis grisebachii*. *Journal of Ethnopharmacology* **2004,** 95, 155-161.

19. Carter, O. A., Peters, R. J., Croteau, R., Monoterpene biosynthesis pathway construction in *Escherichia coli*. *Phytochemistry* **2003,** 64, 425-433.

20. Noge, K., Kato, M., Iguchi, T., Mori, N., Nishida, R., Kuwahara, Y., Biosynthesis of neral in *Carpoglyphus lactis* (Acari: Carpoglyphidae) and detection of its key enzyme, geraniol dehydrogenase, by electrophoresis. *Journal of Acarological Society of Japan* **2005,** 14, 75-81.

21. Davidovich-Rikanati, R., Sitrit, Y., Tadmor, Y., Iijima, Y., Bilenko, N., Bar, E., Carmona, B., Fallick, E., Dudai, N., Simon, J. E., Pichersky, E., Lewinsohn, E., Enrichment of tomato flavor by dispersion of the early plasticidal terpenoid pathway. *Nature Biotechnology* **2007,** 25, 899-901.

22. Van der Vlugt-Bergmans, C. J. B., Van der Werf, M. J., Genetic and biochemical characterization of a novel monoterpene ε- lactona hydrolase from *Rhodococcus erythropolis* DCL14. *Applied and Environmental Microbiology* **2001,** 67, 733-741.

23. Breheret, S., Talou, T., Rapior, S., Bessiére, J. M., Monoterpenes in the aromas of fresh wild mushrooms (Basidiomycetes). *Journal of Agriculture Food Chemistry* **1997,** 45, 831-836.

24. Halim, A. F., Collins, R. P., An analysis of the odorus constituents of *Trametes odorata*. *Lloydia* **1971,** 34, 451-452.

25. Bluemke, W., Schrader, J., Integrated bioprocess for enhanced production of natural flavors and fragances by *Ceratocystis moniliformis*. *Biomolecular Engineering* **2001,** 17, 137-142.

26. Lin, T., Lin, X., Lu, C., Hu, Z., Huango, W., Huang, Y., Shen, Y., Secondary metabolites of *Phomopsis* sp. XZ-26, an endophytic fungus from C*amptotheca acuminate. European Journal of Organic Chemistry* **2009,** 18, 2975-2982.

27. Calderone, N. W., Shimanuki, H., Allen-Wardell, G., An *in vitro* evaluation of botanical compounds for the control of the honeybee pathogens *Bacillus larvae* and *Ascosphaera apis*, and the secondary invader *B. alvei*. *Journal of Essential Oil Research* **1994,** 6, 279-287.

28. Kordali, S., Kesdek, M., Cakir, A., Toxicity of monoterpenes against larvae and adults of Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae). *Industrial Crops and Products* **2007,** 26, 278-297.

29. Yang, P., Ma, Y., Zheng, S., Adulticidal activity of five essential oils against *Culex pipiens quinquefasciatus*. *Journal of Pesticide Science* **2005,** 30, 84-89.

30. Boch, R., Shearer, D. A., Identification of nerolic and geranic acids in the Nassanoff pheromone of the honey bee. *Nature* **1964,** 202, 320-321.

31. Schmidt, J. O., Attraction of reproductive honey bee swarms to artificial nests by Nasonov pheromone. *Journal of Chemical Ecology* **1994,** 20, 1053-1056.

32. Slessor, K. N., Kaminski, L. A., King, G. G. S., Borden, J. H., Winston, M. L., Semiochemical basis of the retinue response to queen honey bees. *Nature* **1988,** 332, 354-356.

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

Capítulo 5

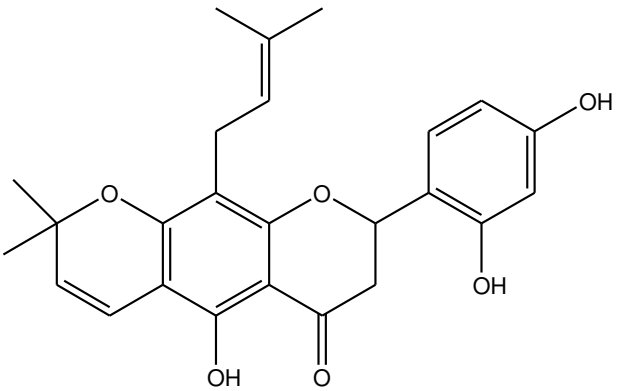
Aislamiento y elucidación estructural de metabolitos secundarios producidos por *Trichoderma koningii* (MP 18)

❖ Introducción.

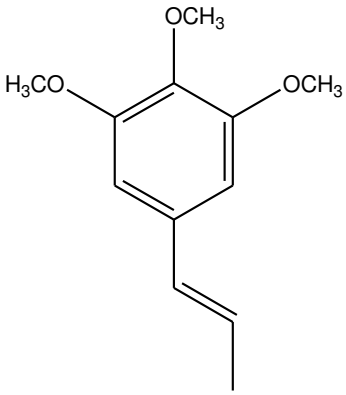
En la actualidad resulta de gran importancia encontrar variantes que permitan el desarrollo de una agricultura rentable y no contaminante del medio ambiente. Si bien el uso de productos químicos para intentar solucionar o prevenir los daños causados por hongos fitopatógenos aumenta notablemente los rendimientos y la rentabilidad de los cultivos, la utilización constante de éstos puede alterar el medio biológico produciendo graves daños en los diversos ecosistemas. Es por eso que la utilización de prácticas sostenibles como por ejemplo la reducción de productos químicos y las rotaciones de suelos son las mejores variantes para garantizar una buena producción manteniendo a salvo el futuro de nuestro planeta[1].

En la búsqueda de compuestos con actividades antifúngicas para intentar resolver esta problemática han sido probadas diversas fuentes naturales como plantas y microorganismos, ya que estos organismos, debido a su imposibilidad de movimiento, deben desarrollar numerosas estrategias de defensa frente a ataques de insectos y/o microorganismos parásitos. La eficacia de la defensa muchas veces radica en la producción de metabolitos bioactivos.

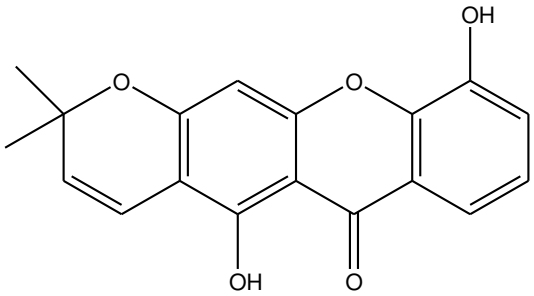
Como ejemplos de compuestos antifúngicos aislados de plantas se pueden citar algunas flavonas e isoflavonas, aisladas de *Eriosema tuberosum*[2], planta medicinal utilizada en la cultura china; miristicina, elemicina e isoelemicina aisladas de *Diplolophium buchanani*[2] y diversos metabolitos bioactivos producidos por *Hypericum brasiliense* y *Rapanea melanophloeos*[2]. En la figura 71 se muestran algunas de las estructuras de los compuestos activos.



Compuesto antifúngico aislado de Eriosema tuberosum



Compuesto antifúngico aislado de Diplolophium buchanani



Compuesto antifúngico aislado de
Hypericum brasiliense

Figura 71: Compuestos antifúngicos aislados de plantas[2]

Mientras que la relación entre los metabolitos producidos por las plantas y su actividad como defensa ya ha sido estudiada en detalle para una gran variedad de plantas[3,4], los mecanismos de defensa de los hongos a través de la producción de metabolitos secundarios han sido menos investigados[5]. Es sabido que la diversidad de los metabolitos secundarios está relacionada con sus mecanismos de supervivencia, su continua competencia con otros hongos y/o bacterias por alimento y espacio[6] y frente a microorganismos parásitos[7]. Por esta razón, muchos de los metabolitos secundarios aislados a partir de cultivos de hongos son compuestos que poseen actividades antibióticas y/o antifúngicas.

Aprovechando estas potenciales actividades, se han realizado estudios sobre la producción de metabolitos secundarios de hongos, focalizados en el descubrimiento de nuevas drogas con potencial actividad frente a diversos microorganismos fitopatógenos[8]. Como primer ejemplo se puede citar el aislamiento de griseofulvina (figura 72), aislada de *Penicillium griseofulvum*, cuyo uso en agricultura fue discontinuado en 1975 debido al elevado costo de producción[9].

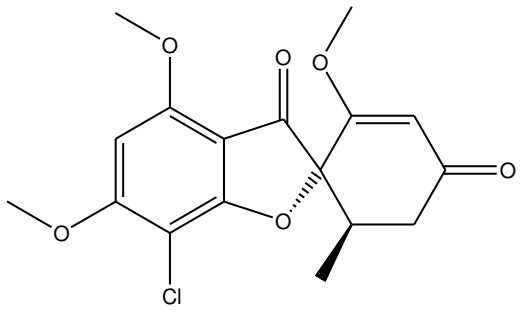


Figura 72: Estructura de griseofulvina

Otro ejemplo importante es el de la oudemansina y la estrobilurina A (figura 73) aislados de *Oudemansiella mucida*[9] y *Strobilurus tenacellus*[10] respectivamente. Estos compuestos presentaron un mecanismo de acción antifúngico muy específico y particular basado en su habilidad de inhibir la respiración mitocondrial mediante el bloqueo de la transferencia de electrones entre los citocromos b y c_1[11, 12]. Debido a esta importante actividad, diversas empresas agroquímicas desarrollaron estrobilurinas sintéticas basándose en el producto natural, siendo algunos de estos productos líderes en el mercado actualmente[11].

En la figura 73 se muestra el desarrollo de estos los productos comerciales por dos empresas a partir de los metabolitos naturales.

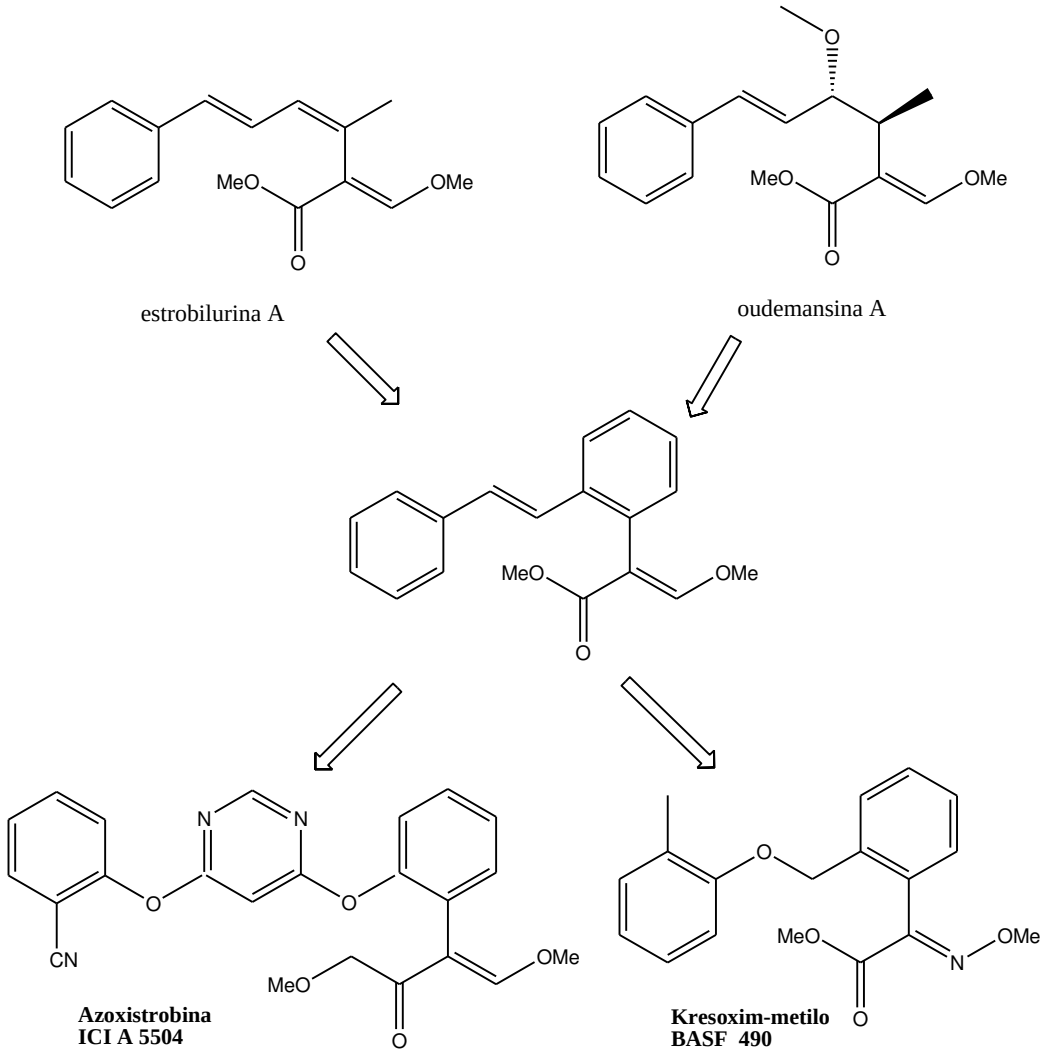


Figura 73: Compuestos comerciales derivados de estrobilurina A y oudemansina A[11]

Ambos productos son comercializados actualmente y utilizados por los agricultores para la protección y cura de una amplia gama de cultivos de frutas, cereales, trigo y arroz[13].

Teniendo en cuenta estos antecedentes y que el extracto de medio de cultivo de una cepa de *Trichoderma koningii* aislada de colmenas del INTA Balcarce presentó importante actividad antifúngica frente a diferentes hongos fitopatógenos, se decidió cultivar este hongo en escala mayor para poder aislar e identificar los compuestos responsables de la actividad observada.

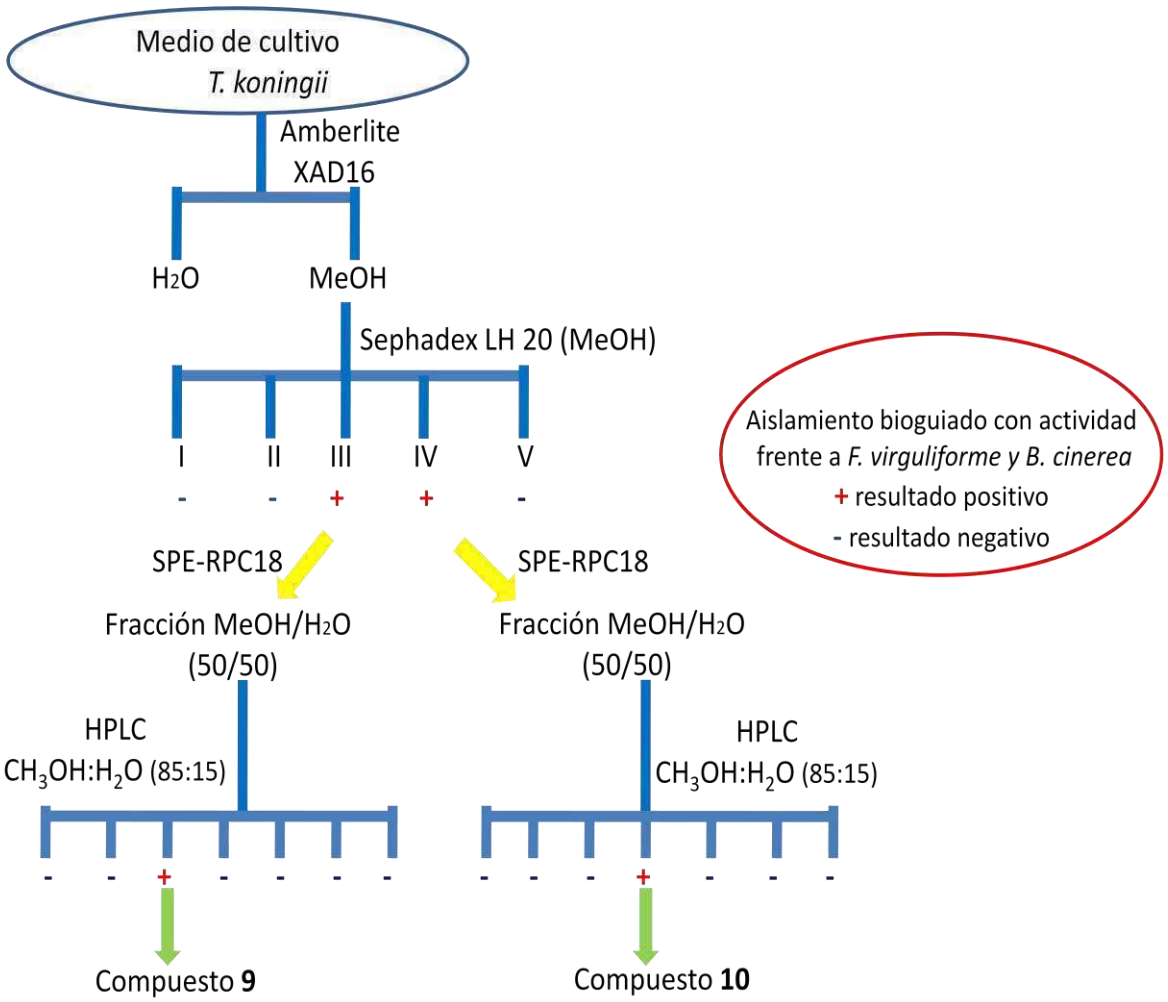
Figura 74: Cultivo de *T. koningii* en medio MEA

Los hongos pertenecientes al género *Trichoderma* suelen interactuar en ambientes diversos como hojas, raíces y/o suelos y se los utiliza comercialmente como agentes de biocontrol (ABC) contra hongos patógenos[14, 15]. Las especies de *Trichoderma* más conocidas y estudiadas como ABC son *T. harzianum, T. virens* y *T. viride*. Se ha descripto también a *T. koningii* como biocontrolador de enfermedades de plantas agrícolas causadas por hongos, como por ejemplo las producidas por *Pyrenphora tritici-repentis, Sclerotium cepivorum* y *Sclerotinia sclerotiorum*.

❖ Aislamiento de los metabolitos secundarios.

Se cultivó la cepa de *T. koningii* en medio líquido extracto de malta al 30⁄ , detallado en la parte experimental general. Una vez crecido el cultivo, se separó el medio del micelio mediante filtración. Luego, el medio de cultivo fue extraído en fase sólida utilizando Amberlite XAD16 eluyendo con MeOH. El extracto orgánico obtenido se separó por cromatografía en una columna preparativa de sephadex LH-

20 rindiendo 5 fracciones, de las cuales 2 demostraron poseer actividad antifúngica frente a *Botrytis cinerea* y *Fusarium virguliforme*, hongos patógenos de cultivos de vid y soja respectivamente. Las fracciones activas fueron separadas por medio de cartuchos de extracción en fase sólida (SPE) con fase reversa C18 eluyendo con un sistema H_2O-MeOH de polaridad decreciente. Cada una de las fracciones activas rindió a su vez una subfracción activa, las que fueron purificadas finalmente por HPLC a escala preparativa, rindiendo la fracción III el compuesto **9** y la fracción IV el compuesto **10** (esquema 4)



Esquema 4: Diagrama de extracción de *T. koningii*

❖ Elucidación estructural de los compuestos aislados.

Compuesto 9

La fórmula molecular del compuesto **9** fue determinada como $C_{12}H_{20}N_2O_3$ mediante espectrometría de masa de alta resolución utilizando la técnica DCI con NH_3.

En el espectro de RMN-^{1}H (CD_3OD) (figura 75), se observó la presencia un singulete a δ 7.45 (1H), un doblete a 2.60 ppm (6.5 Hz) (2H), tres multipletes a δ 2.12 (1H), δ 2.01 (1H) y 1.94 (1H). La señal de δ 7.45 podía corresponder a un H perteneciente a un heterociclo aromático, teniendo en cuenta la fórmula molecular hallada, el número de insaturaciones (4), la presencia de 2 átomos de N y el número de carbonos aromáticos. Se observó además un singulete a δ 1.53 (3H), un doblete a δ 0.88 ppm (5.6 Hz) (6H) y un triplete ancho a δ 0.79 (3H)

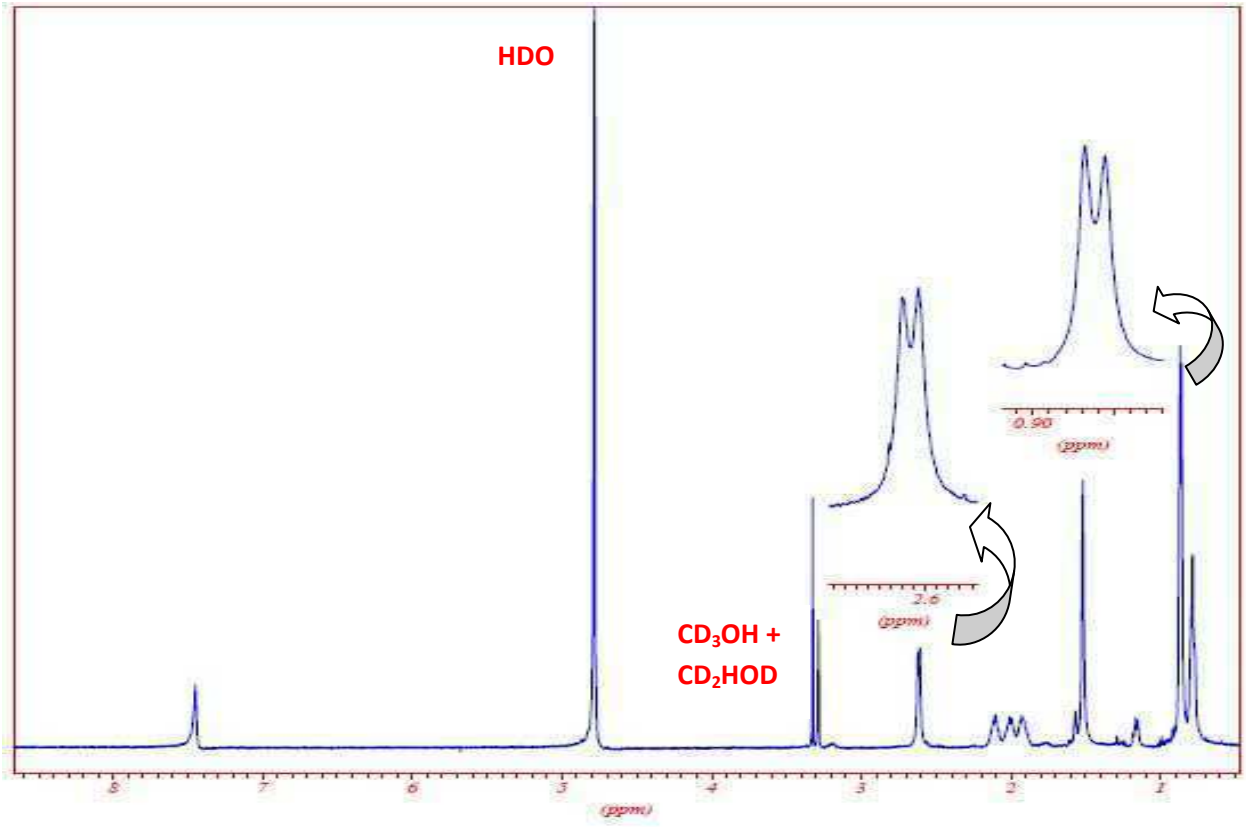


Figura 75: Espectro RMN ^{1}H del compuesto **9** (CD_3OD)

En el espectro de RMN-^{13}C (CD_3OD) del compuesto **9,** se observaron once señales, cuatro de las cuales pertenecían a carbonos cuaternarios (δ 158.3, 150.5, 144.3 y 74.9), dos a grupos metinos (δ 124.4 y 28.6), otras dos a grupos metilenos (δ 42.8 y 33.2) y las tres restantes a metilos (δ 24.8, 22.9 y 8.8). Debido a la intensidad de la señal a δ 22.9 y a la fórmula molecular, ésta debía corresponder a dos grupos metilo equivalentes.

El espectro HMQC permitió correlacionar las señales de H y C directamente unidos y el experimento COSY permitió deducir que la molécula poseía dos cadenas, un etilo y un isobutilo, ya que se observaban las correlaciones indicadas en la figura 76.

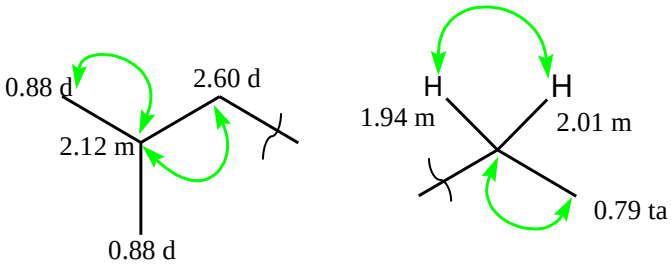


Figura 76: Estructuras parciales y correlaciones observadas vía COSY del compuesto **9**

En el espectro HMBC se observó una correlación entre el protón de δ 7.45 y los carbonos cuaternarios de 150.5 y 144.3 ppm, y que los protones del metileno de δ 2.60 correlacionaban con los carbonos de 158.3 y 150.5 ppm. Otra importante correlación observada fue la del protón de δ 1.53 con el carbono de δ 144.3. Las demás correlaciones permitieron confirmar las subestructuras antes deducidas.

En la figura 77 se muestran las correlaciones observadas en este experimento y la estructura propuesta para el compuesto **9**.

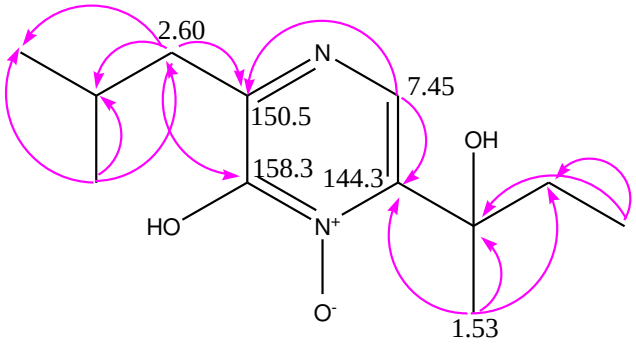


Figura 77: Estructura propuesta para el compuesto **9** y las correlaciones observadas en el espectro HMBC

La presencia de un N-óxido se estableció por consideración de la fórmula molecular.

La configuración absoluta del carbono 1´ fue deducida como *R* según las reglas de asimetría de Brewster[16] teniendo en cuenta que la molécula presenta un solo centro quiral, suponiendo al anillo pirazínico de igual efecto que un anillo aromático y considerando el valor positivo del poder rotatorio[17, 18] (figura 78).

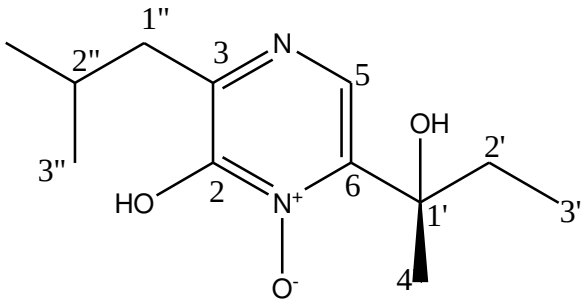


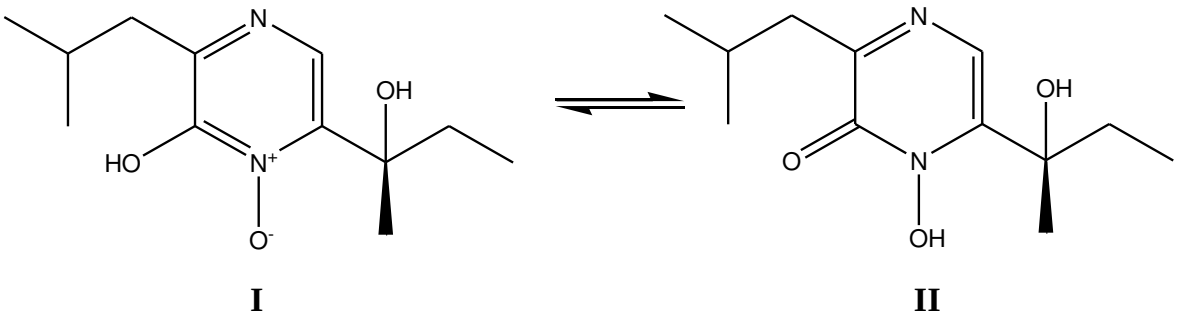
Figura 78: Estructura propuesta para el compuesto **9**

El compuesto **9,** conocido como ácido hidroxiaspergílico, fue previamente aislado de cultivos de *Aspergillus flavus*[19] y *A. oryzae*[20], aunque nunca fue determinada su esteroquímica absoluta.

Los valores obtenidos experimentalmente para el poder rotatorio y el espectro UV coinciden con los datos bibliográficos hallados[19]. Sin embargo, no fue posible realizar una comparación de los datos de RMN debido a que las publicaciones referidas al aislamiento y elucidación estructural del ácido

hidroxiaspergílico son muy antiguas y carecen de estos datos. Por este motivo se comparó con los datos de literatura hallados para el ácido aspergílico[21], los cuales resultaron coincidentes en línea general.

Los N-óxidos de las hidroxipirazinas se encuentran en equilibrio tautomérico con la pirazinona correspondiente. Según estudios realizados con estos compuestos, la especie que predomina en solución es la hidroxil-amida. Uno de los factores que pueden afectar dicho equilibrio es el ambiente estérico en el cual se encuentra el anillo heterocíclico, en particular si posee sustituyente en la posición 6[22]. Por lo tanto, es posible que el compuesto **9** que se encuentra en el equilibrio tautomérico que se muestra en la figura 79, se halle predominantemente en la forma II.



I **II**

Figura 79: Equilibrio tautomérico del compuesto **9**

Compuesto 10

La fórmula molecular del compuesto **10** fue determinada como $C_{11}H_{14}O_4$ sobre la base del espectro de masa de alta resolución utilizando la técnica de ionización ESI.

El espectro RMN-^{1}H ($CDCl_3$) del compuesto **10** (figura 80) mostraba multipletes a δ 4.95 (1H), 4.62 (1H), 3.62 (1H), 3.58 (1H), 3.30 (1H), 2.38 (1H), 1.96 (1H), 1.89 (1H) y 1.80 (1H), dos dobletes a δ 1.48 y 1.46 (1H) (7.2 Hz) y un triplete a δ 1.07 (3H) (7.5 Hz).

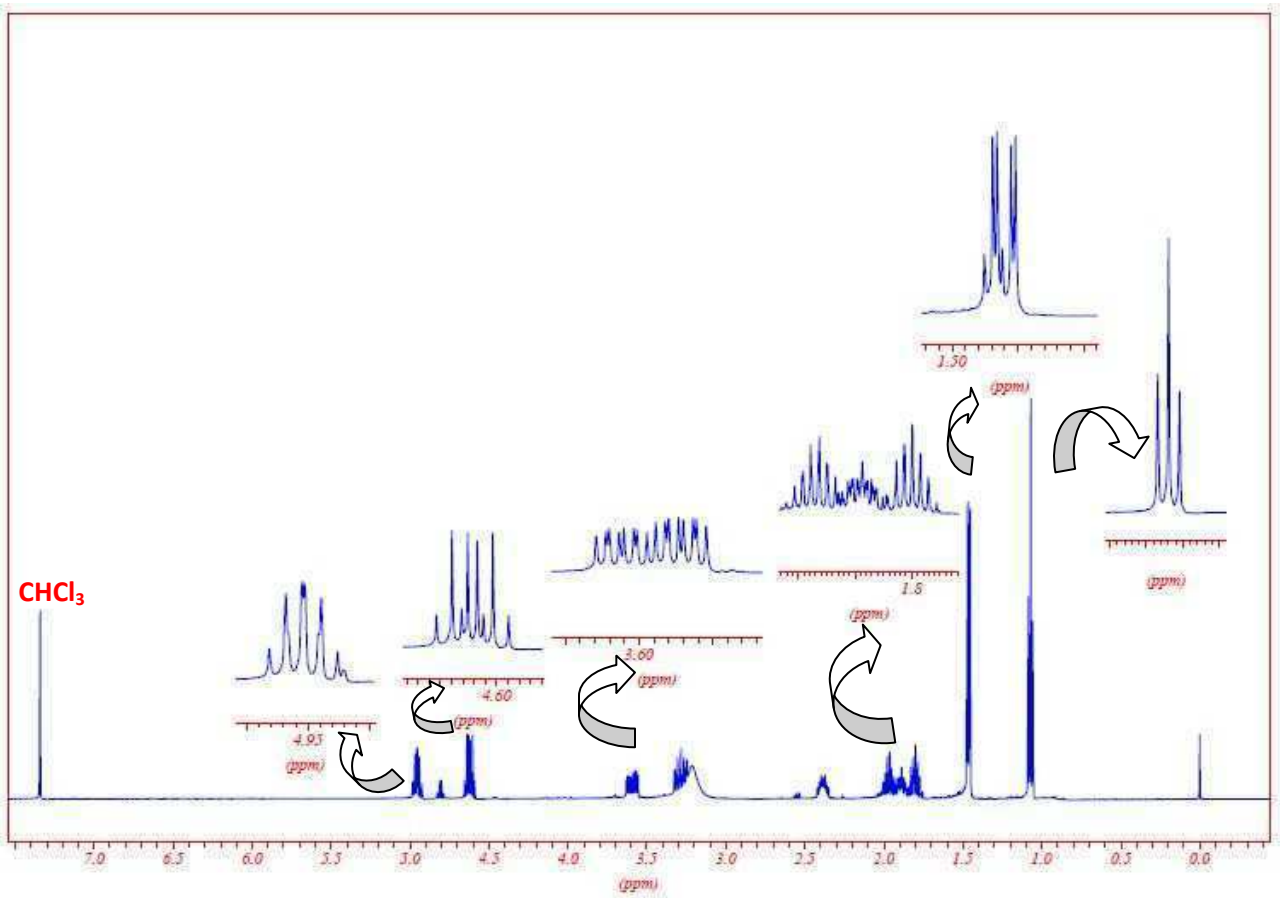


Figura 80: Espectro RMN ^{1}H del compuesto **10** ($CDCl_3$)

En el espectro de RMN-^{13}C ($CDCl_3$) se observaba la presencia de señales que parecían duplicadas, lo que sugería que el compuesto **10** o no estaba puro y era una mezcla de dos compuestos distintos pero de similares características estructurales en relación 1:1, o eran dos isómeros de interconversión lenta.

El análisis cromatográfico empleando distintas fases y condiciones parecía indicar que la segunda suposición era la correcta.

Considerando entonces la presencia de señales duplicadas en el espectro de RMN-^{13}C y que esas señales duplicadas correlacionaban cada una con dos señales de ^{1}H en el espectro HMQC, la presencia de isómeros interconvertibles se hizo evidente.

Se observaban entonces once pares de señales de ^{13}C, de las cuales cuatro pares pertenecían a carbonos cuaternarios (δ 199.3 y 195.8, 187.6 y 186.9, 170.1 y 167.7 y 94.9 y 94.4), correspondiendo

probablemente los dos primeros a carbonilos α-β insaturados. Se veían también dos pares de señales correspondientes a metinos oxigenados (δ 93.2 y 92.7 y 79.5 y 79.3), tres pares de señales de metilenos (δ 33.8 y 33.6, 27.5 y 27.4 y 26.2) y dos señales de metilos (δ 16.8 y 9.1).

Las correlaciones observadas en el experimento COSY para uno de los isómeros se muestran en la figura 81.

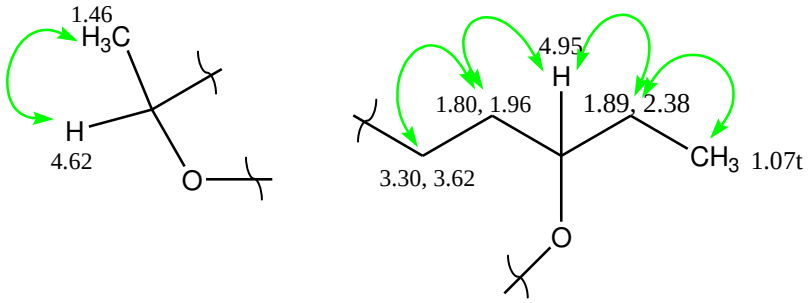


Figura 81: Estructuras parciales propuestas para uno de los isómeros del compuesto **10** sobre la base del experimento COSY

El otro isómero presentó correlaciones conducentes a las mismas subestructuras que las descriptas en la figura anterior.

Los espectros HMQC y HMBC permitieron corroborar estas subestructuras y demás el HMBC determinó la presencia de un carbonilo α al carbono oxigenado cuyo protón resonaba a δ 4.62 y de un doble enlace vecino a los protones de δ 3.62 y 3.30.

Con estas subestructuras se realizó entonces una búsqueda en la base de datos Antibase 2000. Como resultado de la búsqueda se obtuvo el compuesto conocido como ácido terréstrico, cuyos datos espectroscópicos de literatura coinciden con los obtenidos para el compuesto **10** (figura 82).

En esta figura se indican las correlaciones observadas en el HMBC que confirman la estructura propuesta.

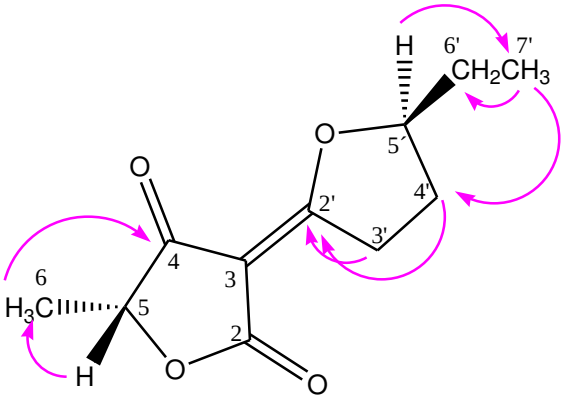


Figura 82: Correlaciones observadas en el espectro HMBC del compuesto **10**

Para éste y otros compuestos similares también se ha informado que sus espectros de RMN presentan señales duplicadas que varían de intensidad relativa en distintos solventes. Por ejemplo al realizar los experimentos de RMN-^{1}H y -^{13}C en $CDCl_3$ del ácido carólico (figura 83), aparecían todas las señales duplicadas en relación 4:5 debido a la presencia de los isómeros *E* y *Z* en equilibrio. En cambio, al cambiar el solvente por CD_3CN prevalecía el isómero *E*. Estos hechos indican que el equilibrio entre el isómero *E* y el *Z* es dependiente de las condiciones experimentales[23].

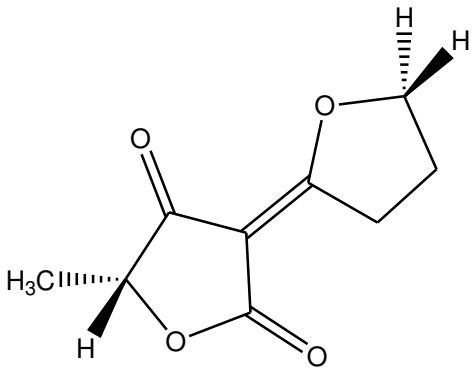


Figura 83: Estructura del ácido carólico

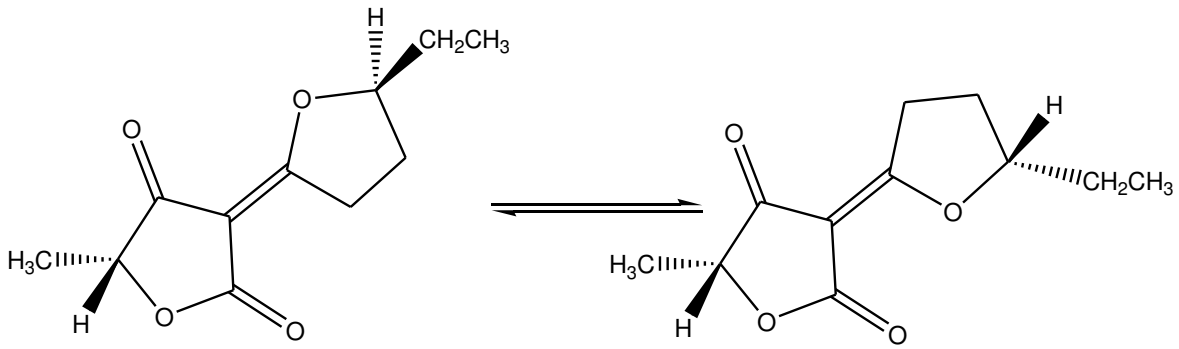


Figura 84: Equilibrio entre los isómeros *E* y *Z* del ácido terréstrico

La configuración absoluta del carbono 5 en el ácido terréstrico es R[24, 25] y la del carbono 5' es S[26]. Debido a que el valor experimental obtenido para el poder rotatorio del compuesto **10** coincidió con el de literatura, se concluyó que la estereoquímica absoluta del compuesto **10** era la misma.

❖ Actividad biológica.

Los hongos fitopatógenos empleados en los bioensayos fueron: *Fusarium virguliforme*, hongo que afecta a los cultivos de soja produciendo la enfermedad conocida como síndrome de muerte repentina (SMR) o síndrome de muerte súbita (SDS)[27]; *Fusarium lateritium*, hongo que afecta a los cultivos de batatas[28], porotos, cucurbitáceas y otros cultivos; *Botrytis cinerea*, hongo patógeno de muchas especies de vegetales, aunque su hospedador económicamente más importante es la vid[29] y *Rhizoctonia solani*, que es un patógeno de cultivos de soja entre otros, con un gran rango de huéspedes en horticultura y de distribución mundial[30].

Los resultados obtenidos para ambos compuestos frente a *F. virguliforme* fueron marcadamente positivos, siendo los halos de inhibición medidos de 25 mm para cada uno de ellos. Frente a *Botrytis cinerea* el compuesto **9** mostró también una fuerte actividad con un halo de 20 mm, mientras que la actividad observada para el compuesto **10** fue menor con un halo de inhibición de 5 mm. Las actividades observadas para ambos compuestos frente a *F. lateritium y Rhizoctonia solani* fueron negativas.

Cabe destacar que estos halos de 20-25 mm son similares a los correspondientes para antifúngicos comerciales como el benomyl o el Maxim XL.

La actividad antibiótica fue determinada experimentalmente frente a dos cepas de *P. larvae* (A y C), ambas provenientes del laboratorio de bacteriología del departamento de producción animal, INTA, EEA Balcarce. El compuesto **9** fue el único que dio resultados positivos frente a la bacteria patógena con un halo de inhibición de crecimiento de 15 mm.

Con respecto a la actividad biológica conocida para ambos compuestos se ha informado que el compuesto **9** posee actividad antibacteriana frente a diversas cepas de bacterias como por ejemplo *Streptococcus pyogenes, Micrococcus pyogenes, Klebsiela pneumoniae* y *Escherichia coli* entre otras[19, 20], mientras que el compuesto **10** ha sido informado como agente fitotóxico en cultivos de arroz, inhibiendo el crecimiento de las raíces, ramas y hojas dependiendo de la concentración utilizada[31].

No existe ninguna publicación hasta el momento que describa la actividad antifúngica de estos compuestos.

❖ Biosíntesis.

Compuesto 9

La ruta biosintética del ácido hidroxiaspergílico (compuesto **9**) fue estudiada por primera vez en el año 1962[32]. Este estudio se basó en la similitud que existe entre la estructura química del ácido hidroxiaspergílico con la del ácido aspergílico y que cepas de *A. flavus* bajo determinadas condiciones pueden biosintetizar una mezcla de ambos compuestos[33], sugiriendo que las rutas biosintéticas de ambos compuestos son similares. En varios estudios sobre las rutas biosintéticas se propuso la condensación inicial de dos aminoácidos para formar una dicetopiperazina, que se oxida luego para formar el N-óxido de pirazina[34-36] (figura 85).

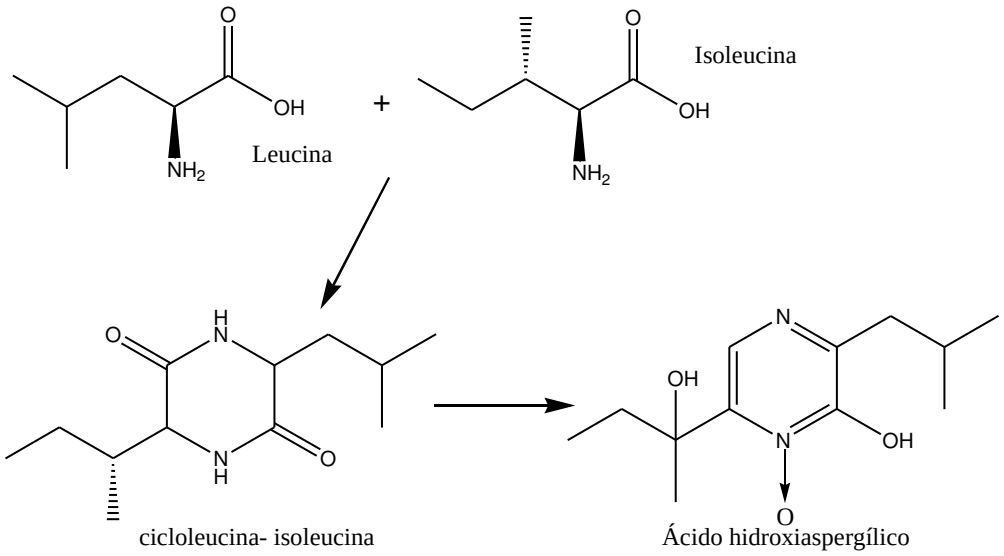


Figura 85: Ruta biosintética propuesta por Mac Donald para el compuesto **9** [32]

Cada uno de los pasos de esta ruta biosintética involucraría varias enzimas, las cuales no son aún conocidas.

Sin embargo, otros estudios demostraron que la biosíntesis no necesariamente ocurriría vía la formación del *ciclo*leucina-isoleucina, ya que comprobaron que este compuesto se incorpora con mayor eficiencia a las proteínas miceliales que al ácido hidroxiaspergílico[37].

Compuesto 10

Debido a que los ácidos tetrónicos son compuestos habitualmente encontrados como productos naturales, existen diversos estudios acerca de la biosíntesis de los mismos. En el año 1962 se publicó la primera ruta biosintética (figura 86) para el ácido carólico[38] la cual podría extrapolarse a su análogo, el compuesto **10**.

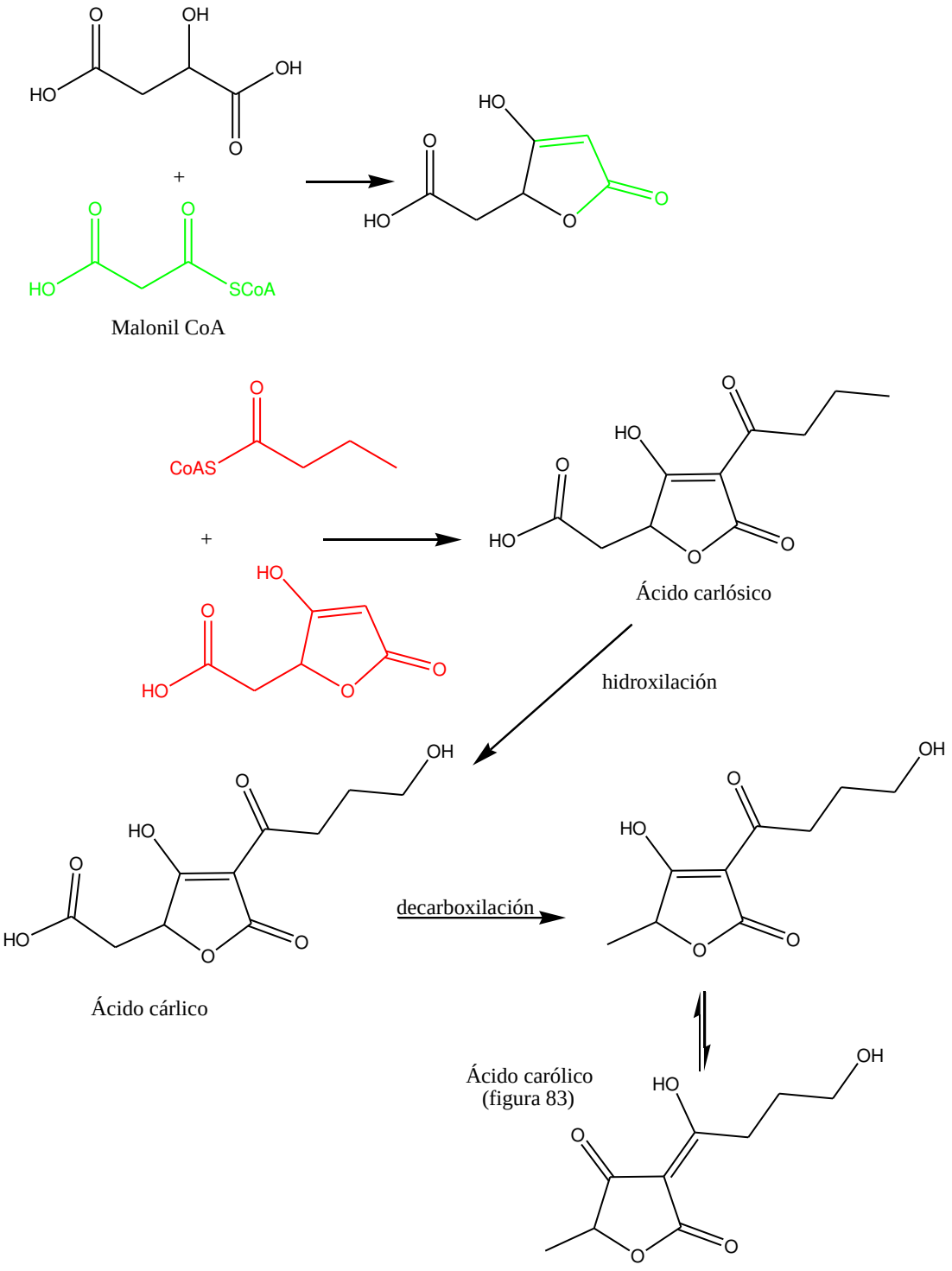


Figura 86: Ruta biosintética propuesta para el ácido carólico, análogo al ácido terréstrico

❖ Antecedentes de compuestos con estructura similar.

Se han aislado diversos compuestos pirazínicos de variadas especies de hongos y bacterias. Un ejemplo es el ácido aspergílico (figura 87), estructuralmente relacionado con el ácido hidroxiaspergílico. Tal como se indicó anteriormente ambos compuestos son producidos por las mismas especies de hongos[19, 33]. Otros ejemplos son los compuestos antifúngicos y antibacterianos denominados terezinas, aislados del hongo *Sporormiella teretispora*[39] y las pirazinas A y B aisladas del hongo *Menisporopsis theobromae*[40] (figura 87).

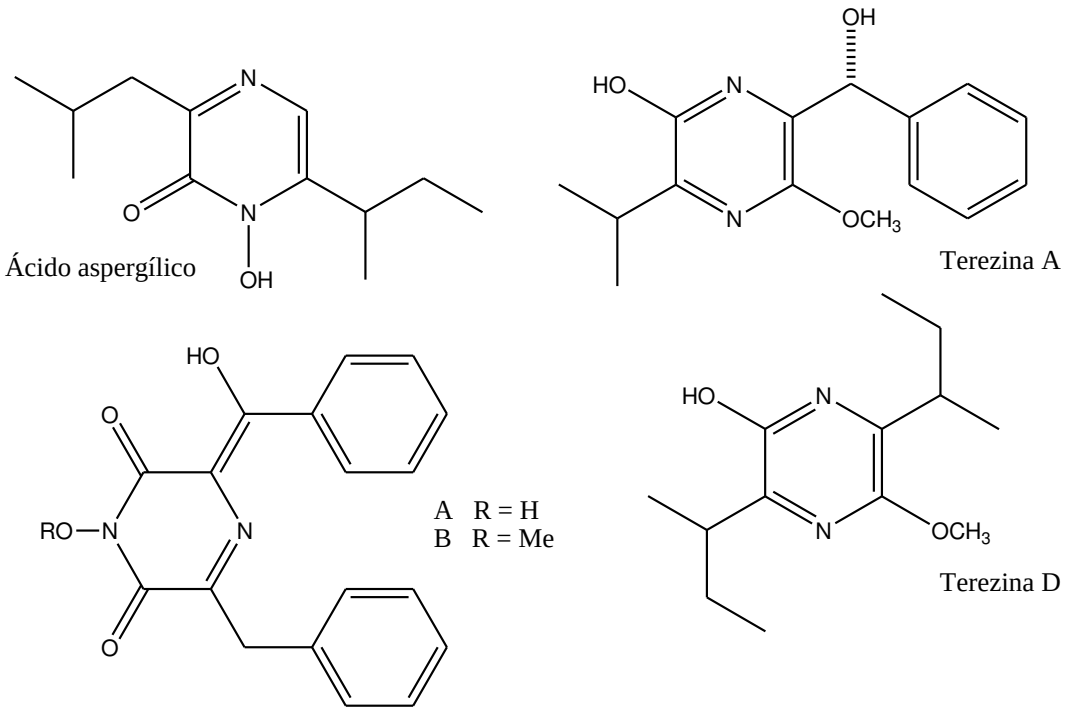


Figura 87: Algunas pirazinas aisladas de otras especies de hongos

Los ácidos tetrónicos son compuestos producidos frecuentemente por hongos, en particular pertenecientes al género *Penicillium*[38]. El ácido terréstrico, compuesto **10**, es uno de los compuestos

utilizados como marcador para identificar y clasificar diferentes cepas de este género[41]. En la tabla 5 se citan ejemplos.

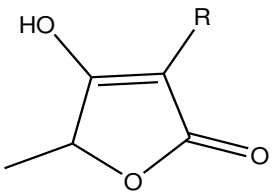
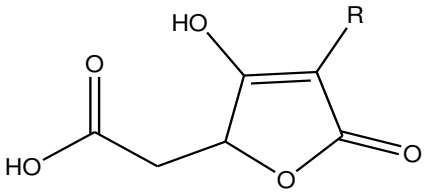
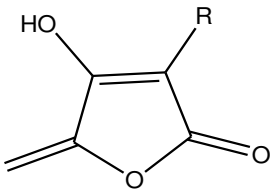
Estructura	Nombre	R=	hongo
	ácido terréstrico	$_COCH_2CH_2CHOHC_2H_5$	P. terrestris P.aurantiogriseum P. veneium P. hirsutum P. hordei P. radicicola P. viridicatum P. crustosum P. oryzae
	ácido L- γ- metiltetrónico	$_H$	P. charlesii
	ácido carólico	$_COCH_2CH_2CH_2OH$	P. charlesii P. cinerascens
	ácido carolínico	$_COCH_2CH_2COOH$	P. charlesii
	ácido carlósico	$_COCH_2CH_2CH_3$	P. charlesii P. cinerascens
	ácido cárlico	$_COCH_2CH_2CH_2OH$	P. charlesii
	ácido viridicático	$_COC_5H_{11}$	P. viridicatum
	ácido dehidrocarólico	$_COCH_2CH_2CH_2OH$	P. cinerascens

Tabla 5: Ácidos tetrónicos aislados de diversas especies de *Penicillium*[31, 38, 41, 42]

❖ Antecedentes de otros compuestos aislados de cultivos de la misma especie.

La especie *T. koningii* ha sido estudiada en reiteradas oportunidades debido a la diversidad de metabolitos secundarios con variadas bioactividades que produce. Se puede citar el aislamiento de peptaiboles denominados trichokoninas, las cuales presentan actividad antibiótica frente a un amplio rango de bacterias Gram positivas y actividad antifúngica frente a diversos hongos fitopatógenos[43, 44].

También se ha aislado de la misma especie un compuesto denominado koningina D[45] y varios sesquiterpenos[46]. Algunas estructuras se muestran en la figura 88.

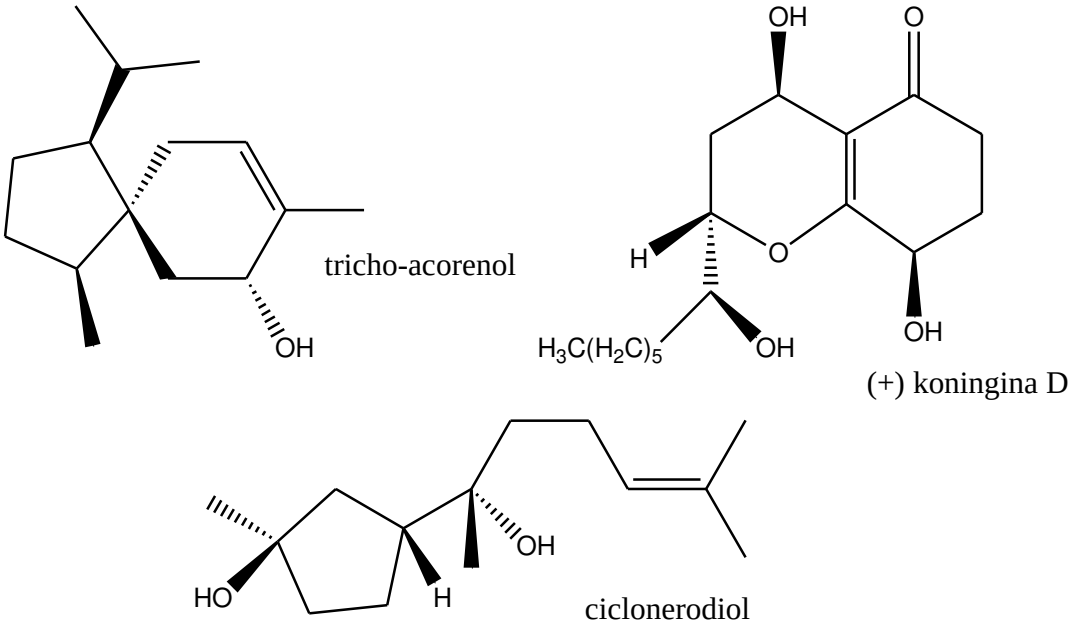


Figura 88: Algunos compuestos aislados de *T. koningii*

❖ Conclusión.

A partir de un cultivo de *T. koningii* aislado de polen de colmenas cuyo extracto preliminar poseía actividad antibiótica frente a *P. larvae* y antifúngica frente a *F. virguliforme*, fueron aislados los componentes activos.

Se aislaron e identificaron dos compuestos, **9** y **10,** de estructura conocida aunque nunca antes aislados en cultivos de *T. koningii*. Ambos compuestos presentaron importante actividad antifúngica frente a *F. virguliforme,* actividad que no había sido informada previamente para estos compuestos. El compuesto **9** además presentó buena actividad frente a *P. larvae*.

❖ Detalles experimentales.

La cepa de *T. koningii* estudiada fue aislada de polen, clasificada por la Dra. Nora Peña y depositada en el cepario de hongos de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, Argentina (BAFC), con el número de acceso BAFC 3293.

Cultivo de *T. koningii*

Se realizaron cultivos en caja de Petri en agar malta y se cortaron porciones pequeñas de 1 cm por 1 cm aproximadamente para inocular 2 erlenmeyers de 250 ml conteniendo 75 ml de medio líquido cada uno. La fermentación fue llevada a cabo utilizando como medio de cultivo líquido, extracto de malta 30⁄ . A la semana, estos cultivos líquidos fueron utilizados como inóculo de 4 cultivos de 1 litro cada uno con el mismo medio, contenidos en erlenmeyers de 4 litros. La fermentación fue llevada a cabo a 25°C por 9 días bajo condiciones estáticas. Las condiciones óptimas fueron determinadas previamente en experimentos de escala menor.

Extracción y fraccionamiento

Los 4 litros de cultivo se filtraron, separándose el medio de cultivo del micelio del hongo. Este último fue descartado, ya que en estudios previos se había determinado que era inactivo en los bioensayos testeados y que no contenía compuestos con estructuras químicas interesantes. El medio

fue extraído en fase sólida utilizando Amberlite XAD-16 (Sigma) (200 g/l de cultivo), obteniéndose 1.26 g de extracto, luego de extraer el amberlite con 2 litros de MeOH y evaporar la fase obtenida en evaporador rotatorio. El extracto fue fraccionado en una columna semipreparativa (80 cm de largo y 3.5 cm de diámetro interno) de Sephadex LH-20 como fase fija y metanol como fase móvil. Se recogieron 5 fracciones de 200 ml cada una. Las únicas fracciones que demostraron poseer actividad antifúngica frente a *Botrytis cinerea* y *Fusarium virguliforme*, fueron la III (700 mg) y la IV (225 mg). Se analizaron los perfiles cromatográficos de estas fracciones activas mediante el uso de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) analítica, con gradiente de solventes desde 90⁄ de agua hasta 100⁄ de metanol. Mediante el análisis de los cromatogramas obtenidos para cada fracción se decidió realizar una separación previa al uso de HPLC preparativo con cartuchos de extracción en fase sólida (SPE) de 6 ml con relleno de C 18 (Supelco). Cada fracción activa fue eluída con 25 ml de cada una de las siguientes fases móviles: H_2O, MeOH/H_2O (50/50) y MeOH. Las fracciones eluídas con MeOH/H_2O (50/50), 326 mg para III, 185 mg para IV resultaron activas y fueron purificadas finalmente por HPLC a escala preparativa, utilizando una columna de fase reversa (YMC C 18, 5 μm, 20 x 250 mm, CH_3OH:H_2O (85:15), 4 ml/min, detector de índice de refracción y UV a 215 nm en serie) rindiendo la fracción III el compuesto **9** (15 mg, 1.19⁄) y la fracción IV el compuesto **10** (10 mg, 0.79⁄).

Propiedades físicas de los compuestos aislados.

Compuesto **9** (Ácido hidroxiaspergílico)**:** sólido amarillo; **$[\alpha]_D^{25}$**: +224˚ (c = 0.1, MeOH); **UV** (MeOH) $\lambda_{máx}$ (log ε): 202 nm (3.49), 229 nm (3.60), 331 nm (3.34); **EM-AR-ESI (+)**: *m/z* 263.1172 $[M+Na]^+$ (valor calculado para $C_{12}H_{20}N_2NaO_3$, 263.1366, Δ -2.2 ppm); **EM- AR- DCI/NH_3**: *m/z* 241.155218 $[M+H]^+$ (valor calculado para $C_{12}H_{21}N_2O_3$, 241.15570, Δ -2.0 ppm); **EM-EI** (70 eV) *m/z* (abundancia relativa): 240 $[M]^{+\cdot}$ (1), 223 $[M\text{-}OH^{\cdot}]^+$ (4), 211 $[M\text{-}29]^+$ (5), 167 $[M\text{-}73]^+$(3), 57 (46), 55 (57), 43 (100); **RMN-^{1}H** (CD_3OD): δ 7.45 (s, H-5); 2.60 (d, *J* = 6.5 Hz, H-1´´); 2.12 (m, H-2´´); 2.01 (m, H-2´$_a$); 1.94 (m, H-2´$_b$); 1.53 (s, H-4'); 0.88 (d, *J* = 5.9 Hz, H-3´´); 0.79 (ta; H-3'); **RMN-^{13}C** (CD_3OD): δ 158.3, C-2; 150.5, C-3; 144.3, C-6; 124.4, C-5; 74.9, C-1´; 42.8, C-1´´; 33.2, C-2´; 28.6, C-2´´; 24.8, C-4´; 22.9, C-3´´; 8.8, C-3´.

Compuesto **10**: aceite amarillo; **$[\alpha]_D^{25}$**: +24˚ (c = 0.2, MeOH); **EM- AR-ESI (+)**: *m/z:* 233.0793 $[M+Na]^+$ (valor calculado para $C_{11}H_{14}NaO_4$, 233.0784, Δ -3.7 ppm); 211.0972 $[M+H]^+$ (valor calculado para $C_{11}H_{15}O_4$, 211.0965, Δ -3.4 ppm); **EM-EI** (70 eV): *m/z* (abundancia relativa): 210 $[M]^{+\cdot}$ (20), 166 $[M\text{-}44]^+$ (22), 138 $[M\text{-}72]^+$ (100), 126 (16), 109 (18), 95 (23); **RMN-^{1}H** (CD_3OD): δ 4.95 (m, H-5´); 4.64 (q, J=

7.5 Hz, H-5$_{II}$); 4.62 (q, J= 7.5 Hz, H-5$_{I}$); 3.62 (ddd, J= 9.3, 4.3, 3.2, H-3´a $_{I}$); 3.58 (ddd, J = 9.6, 4.6, 3.4, H-3´a $_{II}$); 3.30 (m, H-3´b); 2.38 (m, H-6´a); 1.96 (m, H-4'b); 1.89 (m, H-6´b); 1.80 (m, H-4´a); 1.48 (d, J= 7.2 Hz, H-6 $_{II}$); 1.46 (d, J= 7.2 Hz, H-6 $_{I}$); 1.07 (t; *J* = 8.0 Hz, H-7').

I y II representan a los dos isómeros geométricos en equilibrio.

Posición C	Datos experimentales		Datos bibliográficos[2]	
	Isómero *Z* (II)	Isómero *E* (I)	Isómero *Z*	Isómero *E*
2	167.7	170.1	166.9	170.3
3	94.4	94.9	94.3	94.8
4	199.3	195.8	198.8	195.1
5	79.5[i]	79.3[i]	79.3	79.0
6	16.8	16.8	17.0	17.0
2´	187.6	186.9	187.1	186.4
3´	33.6	33.8	33.6	33.9
4´	27.4[ii]	27.5[ii]	27.6	27.6
5´	92.7	93.2	93.0	92.5
6´	26.2	26.2	26.4	26.4
7´	9.1	9.1	9.5	9.5

i y ii pueden intercambiarse

Tabla 6: Comparación de datos de RMN-^{13}C experimentales (CD_3OD) con bibliográficos ($CDCl_3$)

❖ Bibliografía.

1. Anaya Lang, A. L., La alelopatía: Sutil mecanismo de comunicación quimica entre organismos. *UNAM. Hoy* **1996,** Año 5. 23, 61-66.

2. Hostettman, K., Marston, A., Search for new antifungal compounds from higher plants. *Pure and Applied Chemistry* **1994,** 66, 2231-2234.

3. Spiteller, D., Plant defense strategies. en *"Encyclopaedia of Ecology", Jorgensen, S. E., Fath, B. D.,* ed. Elsevier,. **2008**, 2798-2811.

4. Harborne, J. B., Plant Chemical Ecology. *Comprehensive Natural Products Chemistry* **1999,** 8, 137-196.

5. Steglich, W., Some chemical phenomena of mushrooms and toadstools. *Biologically Active Molecules* **1989**, 1-8.

6. Anke, H., Stadler, T., Mayer, A., Sterner, O., Secondary metabolites with nematicidal and antimicrobial activity from nematophagous fungi and Ascomycetes. *Canadian Journal of Botany* **1995,** 73, 932-939.

7. Stadler, M., Sterner, O., Production of bioactive secondary metabolites in the fruit bodies of macrofungi as a response to injury. *Phytochemistry* **1998,** 49, 1013-1019.

8. Anke, T., Thines, E., Fungal metabolites as lead structures for agriculture. *British Mycological Society Symposium* **2007,** 26, 45-58.

9. Yamaguchi, I., Antibiotics as antifungal agents. en *"Modern Selective Fungicides". Properties, Applications, Mechanisms of Action.* Ed. Lyr, H. Semper. **1995,** 20, 415-429.

10. Anke, T., Oberwinkler, F., Steglich, W., Schramm, G., The strobilurins: new antifungal antibiotics from the basidiomycete *Strobilurus tenacellus* (Pers. ex Fr.) Sing. *Journal of Antibiotics* **1977,** 30, 806-810.

11. Ypema, H. L., Gold, R. E., Kresoxim-Methyl. Modification of a naturally occurring compound to produce a new fungicide. *Plant Disease* **1999,** 83, 4-19.

12. Kraiczy, P., Haase, U., Gencic, S., Flindt, S., Anke, T., Brandt, U., Von Jagow, G., The molecular basis for the natural resistance of the cytochrome bc1 complex from strobilurin-producing basidiomycetes to center QP inhibitors. *European Journal of Biochemistry* **1996,** 235, 54-63.

13. Sauter, H., Steglich, W., Anke, T., Strobilurins: Evolution of a new class of active substances. *Angewandte Chemie - International Edition* **1999,** 38, 1328-1349.

14. Kubicek, C. P., Mach, R. L., Peterbauer, C. K., Lorito, M., *Trichoderma*: from gene to biocontrol. *Journal of Plant Pathology* **2001,** 83, 11-23.

15. Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M., *Trichoderma* species- opportunistic, a virulent plant symbionts. *Natural Review Microbiology* **2004,** 2, 43-56.

16. Brewster, J. H., A useful model of optical activity. I. Open chain compounds. *Journal of American Chemical Society* **1959,** 81, 5475-5483.

17. Ayer, W. A., Trifonov, L. S., Metabolites of *Peniophora polygonia*, Part 2. Some aromatic compounds. *Journal of Natural Products* **1993,** 56, 85-89.

18. Honwad, V. K., Rao, A. S., Terpenoids-LX: Absolute configuration of ar-turmerone. *Tetrahedron* **1964,** 20, 2921-2952.

19. Dutcher, J. D., Aspergillic acid: an antibiotic substance produced by *Aspergillus flavus.* The structure of hydroxyaspergillic acid. *Journal of Biological Chemistry* **1958,** 232, 785-795.

20. Nakamura, S., Shiro, T., Studies on growth inhibition of Hiochi-bacteria, Specific saprophytes of Saké. Part IV. Hydroxyaspergillic acid as a growth inhibitant against Hiochi- Bacteria. *Bulletin of the Agrochemical Society of Japan* **1959,** 23, 418-427.

21. Nurchi, V. M., Crisponi, G., Pivetta, T., Tramontano, E., Marincola, F. C., Lachowicz, Interaction between aspergillic acid and iron (III): A potentiometric UV-Vis, ^{1}H NMR and quantum chemical study. *Polyhedron* **2009,** 28, 763-768.

22. Sato, N., Pyrazines and their benzo derivatives, en *"Comprehensive Heterocyclic Chemistry",* Elsevier*,* **2008,** capítulo 8.03, 273-331.

23. Jacobsen, J. P., Reffstrup, T., Cox, R. E., Holker, J. S. E., Boll, P. M., Revision of the structures of the naturally occurring acyl tetronic acids: dehydrocarolic acid, terrestric acid and carlic acid. *Tetrahedron Letters* **1978**, 1081-1084.

24. Boll, P. M., Sorensen, E., Balieu, E., Naturally occurring lactones and lactames. II. The absolute configuration of gamma-methyltetronic acid, carolinic acid, and carolic acid. *Acta Chemica Scandinavica* **1968,** 22, 3251-3255.

25. Bloomer, J. L., Kappler, F. E., Microbial metabolites. Part XI.1 total synthesis and absolute configuration of (S)-carlosic acid (4-butyryl-2,5-dihydro-3-hydroxy-5-oxofuran- 2-acetic acid) and conversion of (R)-5-methyltetronic acid into (R)-carolic acid {3,4-dihydro-8-methylfuro[3,4-b]oxepin-5,6(2H,8H)-di-one}. *Journal of Chemical Society Perkin I* **1976,** 14, 1485-1491.

26. Ravid, U., Silverstein, R. M., General Synthesis of optically active 4-alkyl (or alkenyl)-γ-lactones from glutamic acid enantiomers. *Tetrahedron Letters* **1977,** 18, 423-426.

27. Aoki, T., O'Donnell, K., Homma, Lattanzi, A., Sudden death syndrome of soybean is caused by two morphologically and phylogenetically distinct species within the *Fusarium solani* species complex, *F. virguliforme* in North America and *F. tucumaniae* in South America. *Mycologia* **2003,** 95, 660-684.

28. Clark, C. A., Valverde, R. A., Wilder- Ayers, J. A., Nelson, P. E. , *Fusarium lateritium*, causal agent of sweetpotato chlorotic leaf distortion. *Phytopathology* **1990,** 80, 741-744.

29. Choquer, M., Fournier, E., Kunz, C., Levis, C., Pradier, J. M., Simon, A., Viaud, M., *Botrytis cinerea* virulence factors: new insights into a necrotrophic and polyphageous pathogen *FEMS Microbiology Letters* **2007,** 277, 1-10.

30. Wiese, M. V., Compendium of wheat diseases. *en "Compendium of Plant Disease Series".* American Phytopathological Society **1987**, 124.

31. Nukina, M., Terrestric acid as phytotoxic metabolite from *Pyricularia oryzae* Cavara. *Agriculture and Biological Chemistry* **1988,** 52, 2357-2358.

32. MacDonald, J. C., Biosynthesis of hydroxyaspergillic acid. *The Journal of Biological Chemistry* **1962,** 237, 1977-1981.

33. Woodward, C. R., Production of aspergillic acid by surface cultures of *Aspergillus flavus*. *Journal of Bacteriology* **1947,** 54, 375-379.

34. Beck, H. C., Hansen, A. M., Lauritsen, F. R., Novel pyrazine metabolites found in polymyxin biosynthesis by *Paenibacillus polymyxa*. *FEMS Microbiology Letters* **2003,** 220, 67-73.

35. Uffen, R. L., Canale- Parola, E., Synthesis of pulcherriminic acid by *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **1972,** 111, 86-93.

36. MacDonald, J. C., Biosynthesis of pulcherriminic acid. *Biochemical Journal* **1965,** 96, 533-538.

37. Sammes, P. G., Naturally occurring 2,5-dioxopiperazines and related compounds. *Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe* **1975,** 32, 51-118.

38. Bentley, R., Bhate, D. S., Keil, J. G., Tetronic acid biosynthesis in molds. *The Journal of Biological Chemistry* **1962,** 237, 859-866.

39. Wang, Y., Gloer, J., Terezines A-D: New amino acid-derived bioactive metabolites from the coprophilous fungus *Sporomiella teretispora*. *Journal of Natural Products* **1995,** 58, 93-99.

40. Chinworrungsee, M., Kittakoop, P., Saenboonrueng, J., Kongsaeree, P., Thebtaranonth, Y., Bioactive compounds from the seed fungus *Menisporopsis theobromae* BCC 3975. *Journal of Natural products* **2006,** 69, 1404-1410.

41. Söderström, B., Frisvad, J. C., Separation of closely related asymmetric penicillia by pyrolysis gas chromatography and mycotoxin production. *Mycologia* **1984,** 76, 408-419.

42. Nielsen, F. K., Ostenfeld Larsen, T., Frisvad, J. C., Lightweight expanded clay aggregates (LECA), a new up-scaleable matrix for production of microfungal metabolites. *Journal of Antibiotics* **2004,** 57, 29-36.

43. Huang, Q., Tezuka, Y., Kikuchi, T., Nishi, A., Tubaki, K., Tenaka, K., Studies on metabolites of mycoparasitic fungi II. Metabolites of *Trichoderma koningii*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **1995,** 43, 223-229.

44. Xiao-Yan, S., Qing-Tao, S., Shu-Tao, X., Xiu-Lan, C., Cai-Yun, S., Yu-Zong, Z., Broad- spectrum antimicrobial activity and high stability of trichokonins from *Trichoderma koningii* SMF2 against plant patogens. *FEMS Microbiology Letters* **2006,** 260, 119-125.

45. Mori, K., Bando, M., Abe, K., Determination of the stereochemistry of (-)- Koninginin A by X- ray analysis of its synthetic sample. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **2002,** 66, 1779-1781.

46. Huang, Q., Tezuka, Y., Hatanaka, Y., Kikuchi, T., Nishi, A., Tubaki, K., Studies on metabolites of mycoparasitic fungi. III. Nex sesquiterpene alcohol from *Trichoderma koningii*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **1995,** 43, 1035-1038.

Capítulo 6

Aislamiento y elucidación estructural de metabolitos secundarios producidos por una cepa fúngica endofita septada oscura (DSE 01)

❖ Introducción.

Todas las plantas pertenecientes a ecosistemas naturales establecen diferentes funciones simbióticas con diversos microorganismos endofíticos. Los hongos endofitos son aquellos que infectan plantas vasculares y se desarrollan dentro de ellas sin causarles síntomas patógenos. Se ha demostrado que plantas infectadas con esta clase de hongos son más sanas aún que las no infectadas[1]. Este hecho puede deberse a la producción por parte del hongo de fitohormonas y otros compuestos que promueven el crecimiento del hospedador y generan protección frente a pestes causadas por insectos, a ataques de herbívoros y/o infecciones causadas por diversos microorganismos patógenos[2].

Este tipo de hongos es omnipresente y hasta la fecha no se conoce ninguna especie vegetal en la cual no se haya detectado presencia de esta clase de microorganismos; en algunas especies de plantas incluso se han aislado más de cien cepas endofíticas siendo su diversidad biológica enorme[3].

Debido a la gran diversidad química que poseen, por su enorme biodiversidad, los metabolitos secundarios producidos por este tipo de hongos pueden tener variadas actividades biológicas. Se citan algunos de estos compuestos como ejemplo, clasificándolos según la actividad biológica que poseen:

- Compuestos anticancerígenos: El taxol (figura 89) es una de las drogas anticancerígenas más conocidas a nivel mundial, que se utiliza principalmente para el tratamiento de cáncer de ovario y mamas. La misma fue aislada por primera vez de las partes aéreas del árbol *Taxus brevifolia*[4], el cual es de crecimiento lento y además produce la droga en muy baja concentración en comparación con las dosis necesarias para tratar este tipo de enfermedades. En la búsqueda de nuevas fuentes de producción de Taxol se encontró que era producido por diferentes especies de hongos como *Taxomyces andreanae*[5], *Pestalotiopsis microspora*[6], *Pestalotiopsis guepini* y *Seimatoantlerium tepuiense*, endófitos de los árboles *Taxus brevifolia, Taxus globosa*[7] y *Taxus wallachiana*[6].

  Otros compuestos con propiedades anticancerígenas son las sequoiatonas A y B (figura 89), las cuales se aislaron de *Aspergillus parasiticus* endófito del árbol de madera roja *Sequoia sempervirens*[8]. Ambos compuestos mostraron inhibición moderada y selectiva frente a diversos tumores celulares humanos, principalmente en líneas celulares tumorales mamarias.

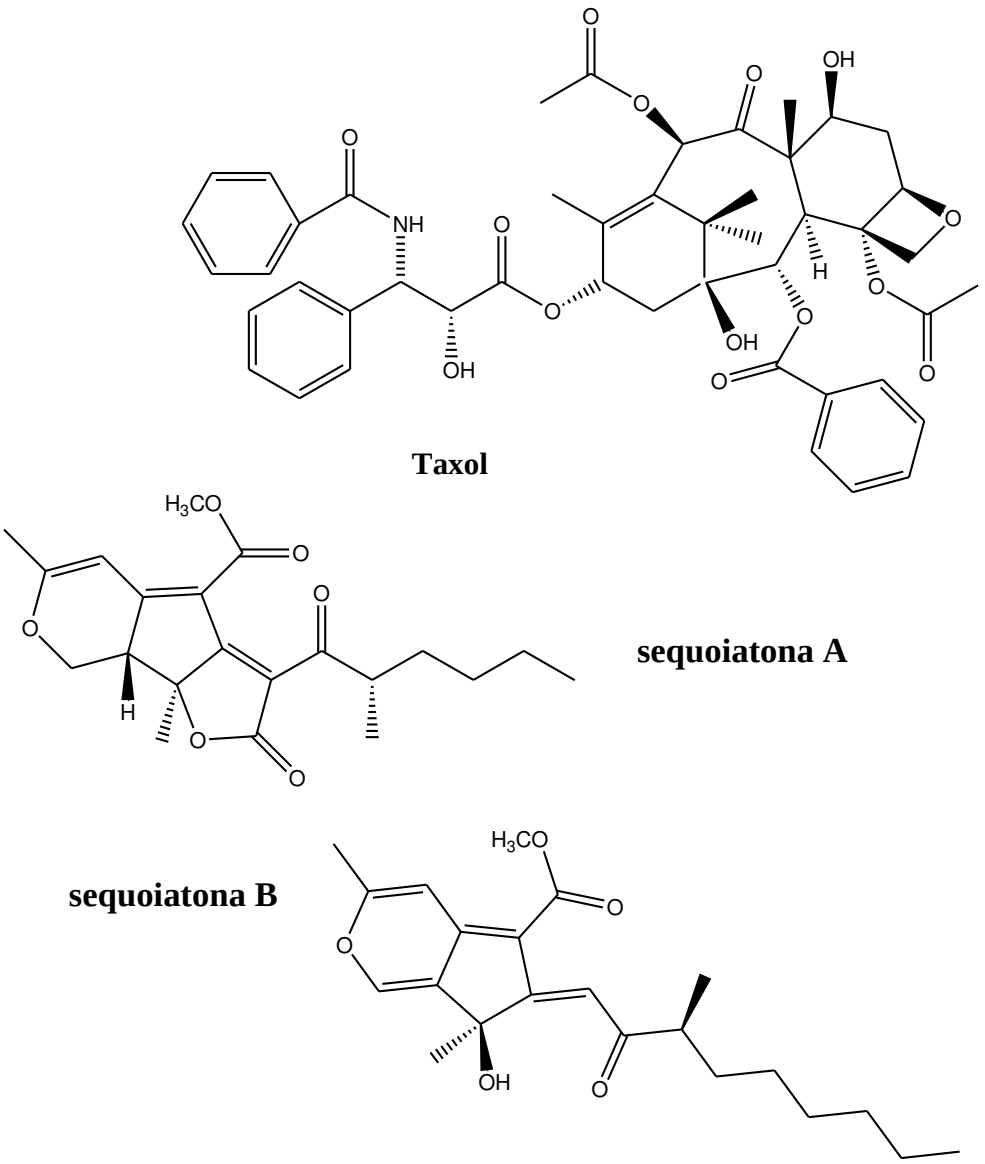
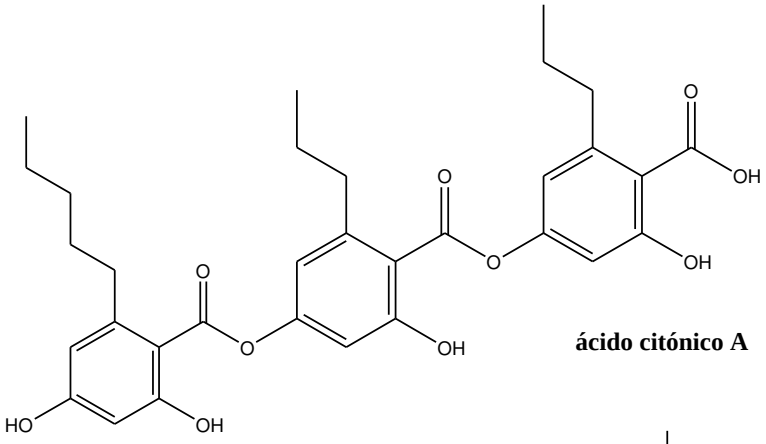


Figura 89: Estructuras de compuestos antitumorales producidos por hongos endofitos[4, 8]

- Compuestos antivirales: Del cultivo del hongo endofito *Cytonaema sp*. se aislaron dos compuestos, los ácidos citónicos A y B (figura 90)[9], ambos inhibidores de proteasas de citomegalovirus (hCMV).



ácido citónico A

ácido citónico B

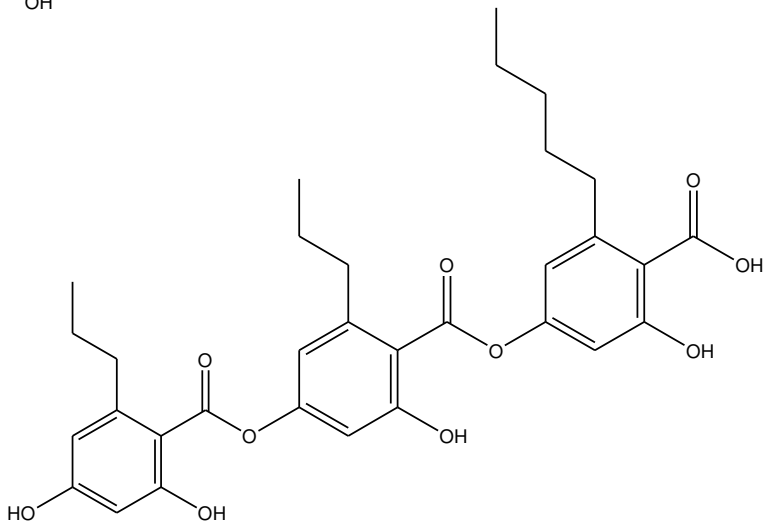


Figura 90: Estructuras de compuestos antivirales producidos por hongos endofitos[9]

- Compuestos antifúngicos: La cryptocandina (figura 91) es un péptido aislado del cultivo del hongo endofítico *Cryptosporiopsis quercina* aislado de las partes aéreas de la planta medicinal *Tripterigeum wilfordii*[10]. Dicho compuesto posee actividad antifúngica frente a hongos patógenos para humanos como por ejemplo *Candida albicans* y *Trycophyton mentagrophytes.* Actualmente es utilizado como droga comercial para tratar enfermedades causadas por hongos en piel y uñas.

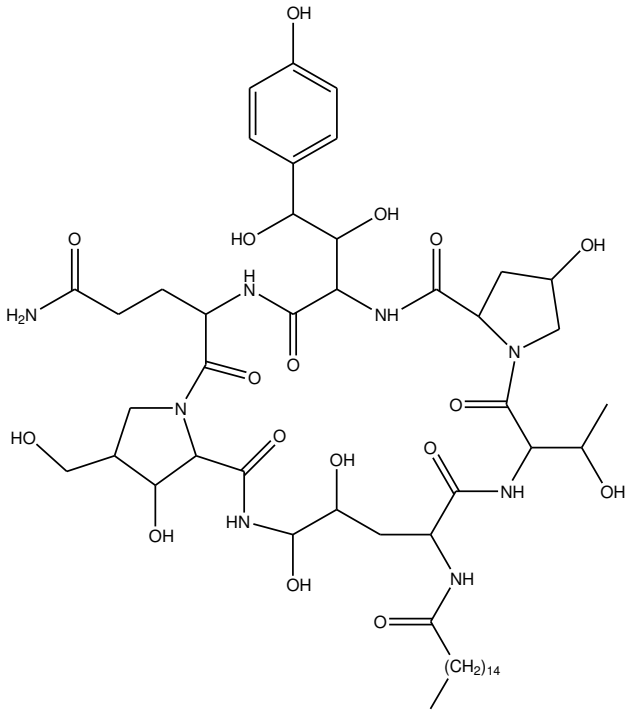


Figura 91: Estructura del compuesto antifúngico criptocandina producido por un hongo endofito[10]

- Compuestos antibacterianos: El guanacastepeno A (figura 92) es un compuesto producido por el cultivo de un hongo endofito no clasificado aislado de las ramas del árbol *Daphnopsis Americana*[11]. Es activo frente a cepas de bacterias resistentes a antibióticos comerciales de amplio espectro como *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis.*

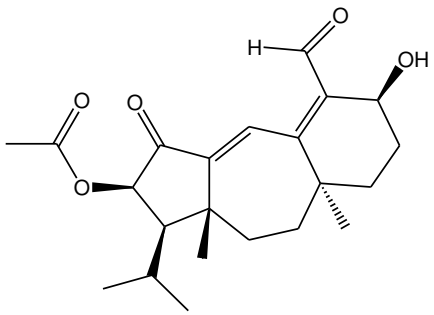
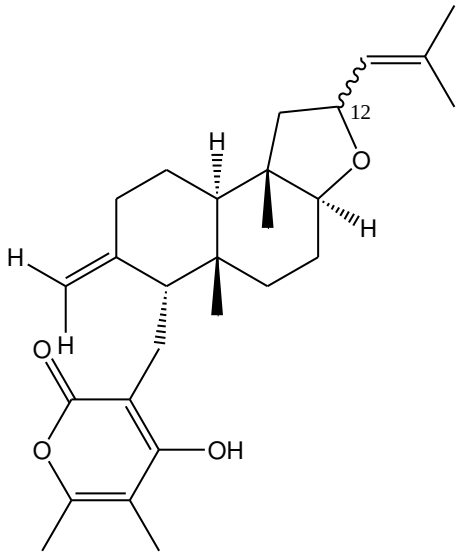


Figura 92: Estructura del compuesto antibacteriano guanacastepeno A aislado de un hongo endofito[11]

- Compuestos inmunosupresores: Subglutinol A y B (figura 93) son compuestos aislados de *Fusarium subglutinans*, hongo endofito de *Tripterigeum wilfordii*[12] con propiedades inmunosupresoras, no citotóxicos.



subglutinol A, 12= S

subglutinol B, 12= R

Figura 93: Estructuras de compuestos inmunosupresores aislados de un hongo endofito[12]

Las raíces de las plantas vasculares también están colonizadas por hongos endofitos que se clasifican en micorrizas arbusculares (AM), ectomicorrizas (EM) y endofitos septados oscuros (DSE)[3].

Estos endofitos de raíz poseen funciones de gran implicancia en el ecosistema. Pueden absorber nutrientes del suelo como nitrógeno[13, 14] y fósforo[15], útiles para el crecimiento de la planta, y protegerla al mismo tiempo al limitar el transporte y acumulación de metales pesados en tejidos vasculares. También son útiles para facilitar la transferencia interna de nutrientes y agua por toda la superficie de la planta[16].

También se ha demostrado que algunas cepas de hongos endofíticos poseen un efecto protector de diversos cultivos agrícolas sobre enfermedades causadas por microorganismos[17].

Se conocen aproximadamente 600 especies de plantas hospedadoras de 320 géneros y más de 110 familias de hongos endofíticos septados oscuros[1, 18-20]. De muchos de ellos no se conocen sus estructuras reproductivas, sexuales, ni asexuales y algunos han esporulado en condiciones particulares y específicas de cultivo y es por ello que resulta difícil su identificación por medio de caracteres

morfológicos[21]. Mediante técnicas moleculares se ha avanzado en la identificación de este grupo[22] y se ha podido establecer tanto su origen polifilético como el hecho de que la mayoría pertenecen a la división Ascomycota[23, 24]. La especie más frecuentemente encontrada y por ende también la más estudiada es *Phialocephala fortinii*[19].

En contraste con el amplio conocimiento que se dispone de las micorrizas arbusculares y de las ectomicorrizas, es muy poco lo que se conoce acerca de los hongos endofitos septados oscuros. En particular, no existe información hasta el momento acerca de los metabolitos producidos por esta clase de hongos ni de sus potenciales actividades biológicas.

Por estos motivos se consideró interesante realizar el estudio de los compuestos bioactivos provenientes de cultivos de un DSE aislado de raíces de plantas de soja, por la Dra. Alejandra Rodríguez (Laboratorio de microbiología del suelo, DBBE, FCEN, UBA).

❖ Aislamiento de los metabolitos secundarios.

Se realizó un cultivo en pequeña escala en medio líquido de una de las cepas DSE, denominada DSE1 (figura 94), aislada de raíces de soja.

Figura 94: Cultivo del hongo endofito septado oscuro DSE1 en medio agarizado

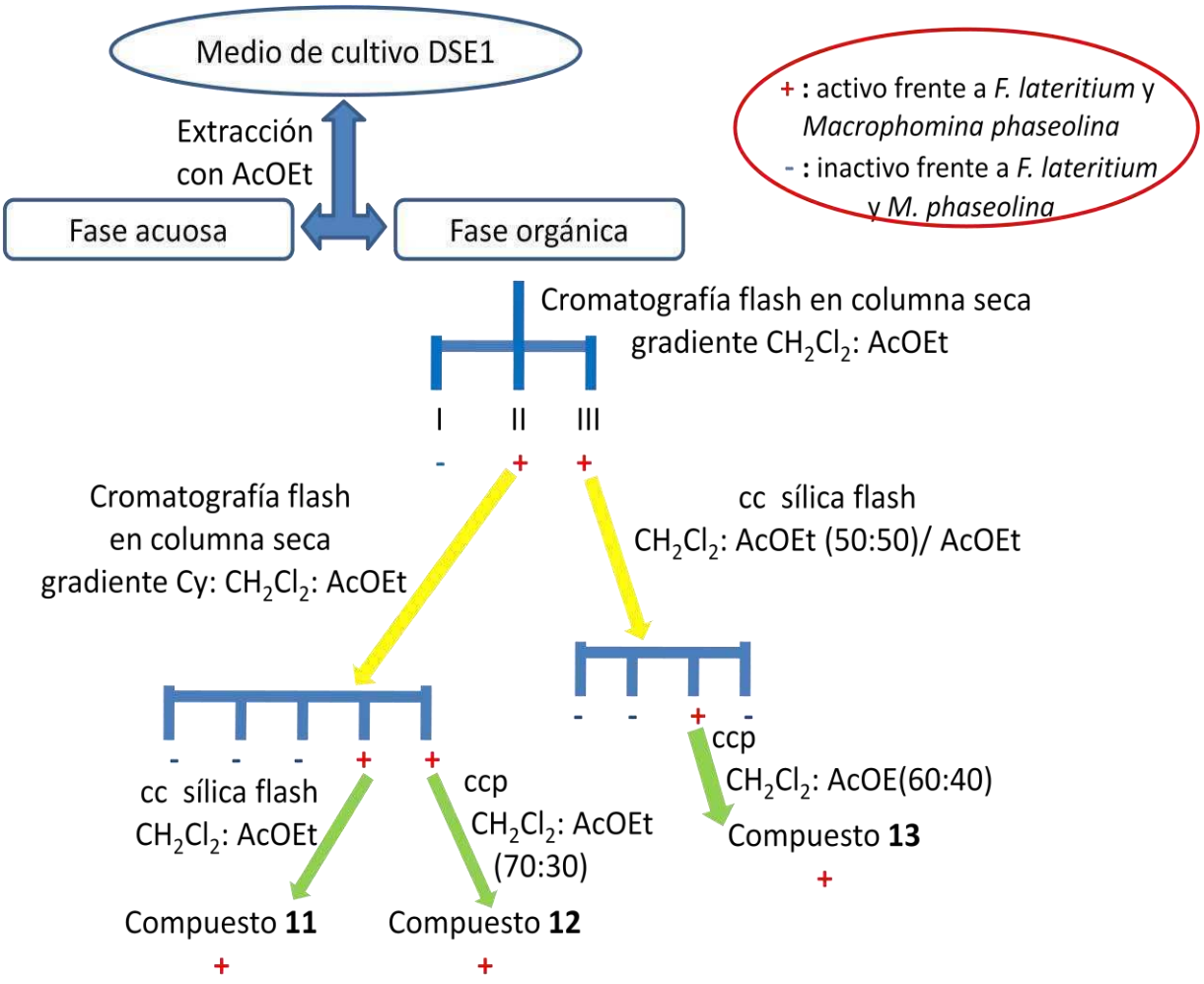
Al analizar el extracto de este minicultivo por ccd y RMN ^{1}H se determinó la presencia de compuestos que podrían poseer estructuras químicamente interesantes. Dicho extracto demostró también tener actividad antifúngica frente a hongos fitopatógenos.

Por tal motivo se decidió cultivar este hongo en mayor escala para obtener mayor cantidad de los metabolitos para realizar la elucidación estructural de los compuestos bioactivos.

Se realizó el cultivo utilizando extracto de malta al 30⁄ , como medio de cultivo líquido. Una vez crecido el cultivo se separó el medio del micelio mediante filtración y se extrajo el medio exhaustivamente con AcOEt. El extracto de la fase orgánica obtenido fue fraccionado mediante el uso de cromatografía flash en columna seca en sílica gel utilizando como eluyente mezclas de polaridad creciente de CH_2Cl_2: AcOEt. De esta separación se obtuvieron tres fracciones (I, II y III) de las cuales solamente dos (II y III) demostraron poseer compuestos de estructura química interesante y/o actividad antifúngica.

La fracción activa II fue purificada primero mediante el uso de cromatografía flash en columna seca en sílica gel utilizando como eluyente mezclas de polaridad creciente de ciclohexano: CH_2Cl_2: AcOEt, obteniéndose cinco fracciones (A, B, C, D y E). La fracción D, eluída con CH_2Cl_2: AcOEt (50/50), fue luego purificada utilizando una columna de sílica flash con mezclas de solventes de polaridad creciente CH_2Cl_2: AcOEt. De esta última separación se obtuvo el compuesto **11** (Esquema 5). La fracción E, eluída con AcOEt, fue luego purificada mediante ccd preparativa de sílica gel utilizando como fase móvil CH_2Cl_2: AcOEt (70/30) obteniéndose el compuesto **12** (Esquema 5).

La fracción activa III fue purificada utilizando una columna de sílica flash con mezclas de solventes de polaridad creciente CH_2Cl_2: AcOEt, (50/50) hasta AcOEt. La fracción eluída con CH_2Cl_2: AcOEt (70/30) fue purificada mediante ccd preparativa de sílica gel utilizando como fase móvil CH_2Cl_2: AcOEt (60/40). Esta separación brindó el compuesto **13** (Esquema 5).



Esquema 5: Diagrama de extracción de DSE1

❖ Elucidación estructural de los compuestos aislados.

Compuesto 11

La fórmula molecular del compuesto **11** fue determinada como $C_{11}H_{12}O_3$ mediante espectrometría de masa de alta resolución utilizando la técnica de ionización ESI. Con este dato se dedujo que el número de insaturaciones que poseía la molécula era 6.

Al analizar el espectro de RMN-H^1 ($CDCl_3$) (figura 95), se observó la presencia de dos señales a δ 5.34 y 5.28 correspondientes a un grupo metileno vinílico, cinco multipletes a δ 6.01, 4.46, 4.44, 3.56 y 3.44 correspondientes a metinos, el primero de un doble enlace y los últimos cuatro a metinos cuyos carbonos están unidos a oxígeno, y un triplete a δ 1.91 (1.3 Hz) característico de un metilo unido a un doble enlace.

Analizando los desplazamientos químicos observados en el espectro de RMN-^{13}C, figura 96, se dedujo que la molécula poseía dos dobles enlaces cuyos carbonos resonaban a δ 132.0, 126.4, 122.8 y 122.5 y un alquino sustituido cuyas señales de carbono se encontraban a δ 92.0 y 85.6.

Teniendo en cuenta las correlaciones observadas entre los protones de los metinos en el experimento RMN 2D-COSY se estableció la presencia de un ciclohexeno polioxigenado con un epóxido, con lo cual teniendo en cuenta la presencia de dos dobles enlaces y un alquino, quedaban determinadas las 6 insaturaciones de la molécula.

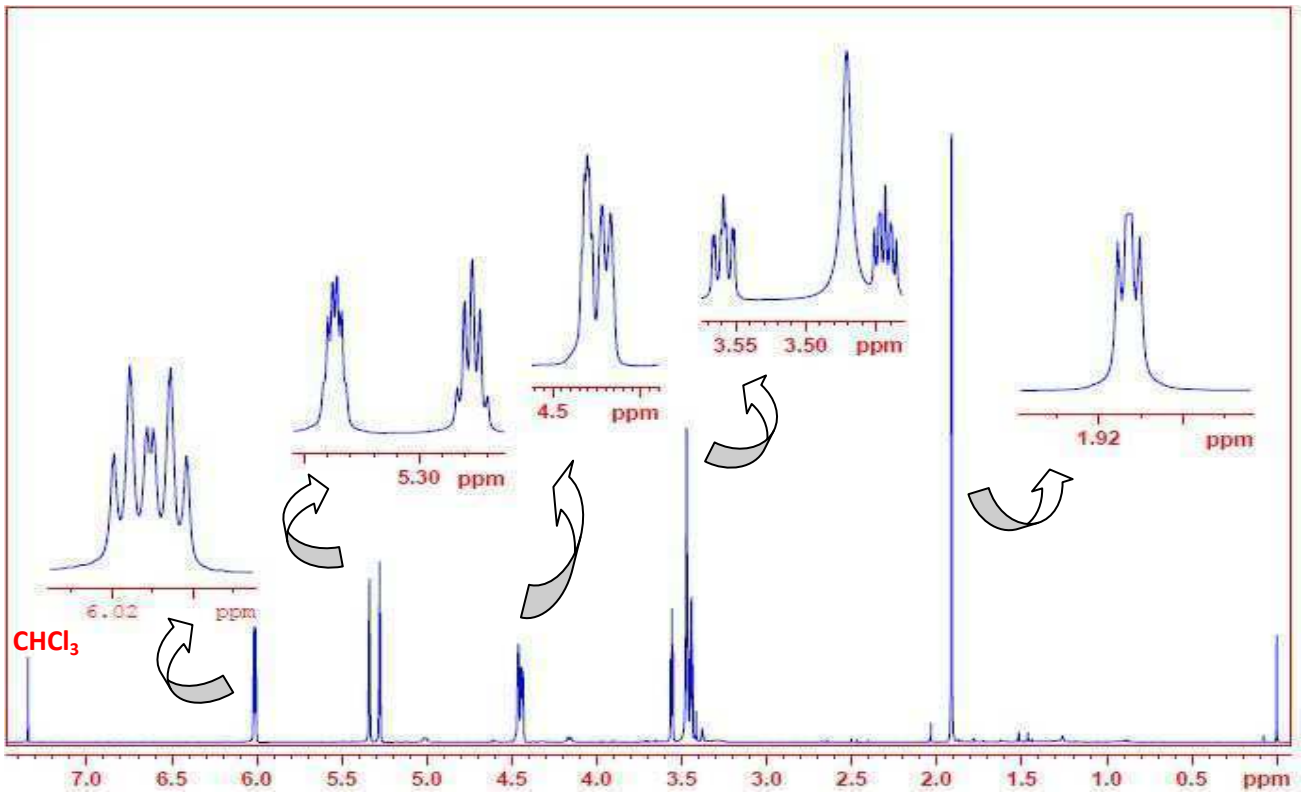


Figura 95: Espectro RMN-^1H del compuesto **11** ($CDCl_3$)

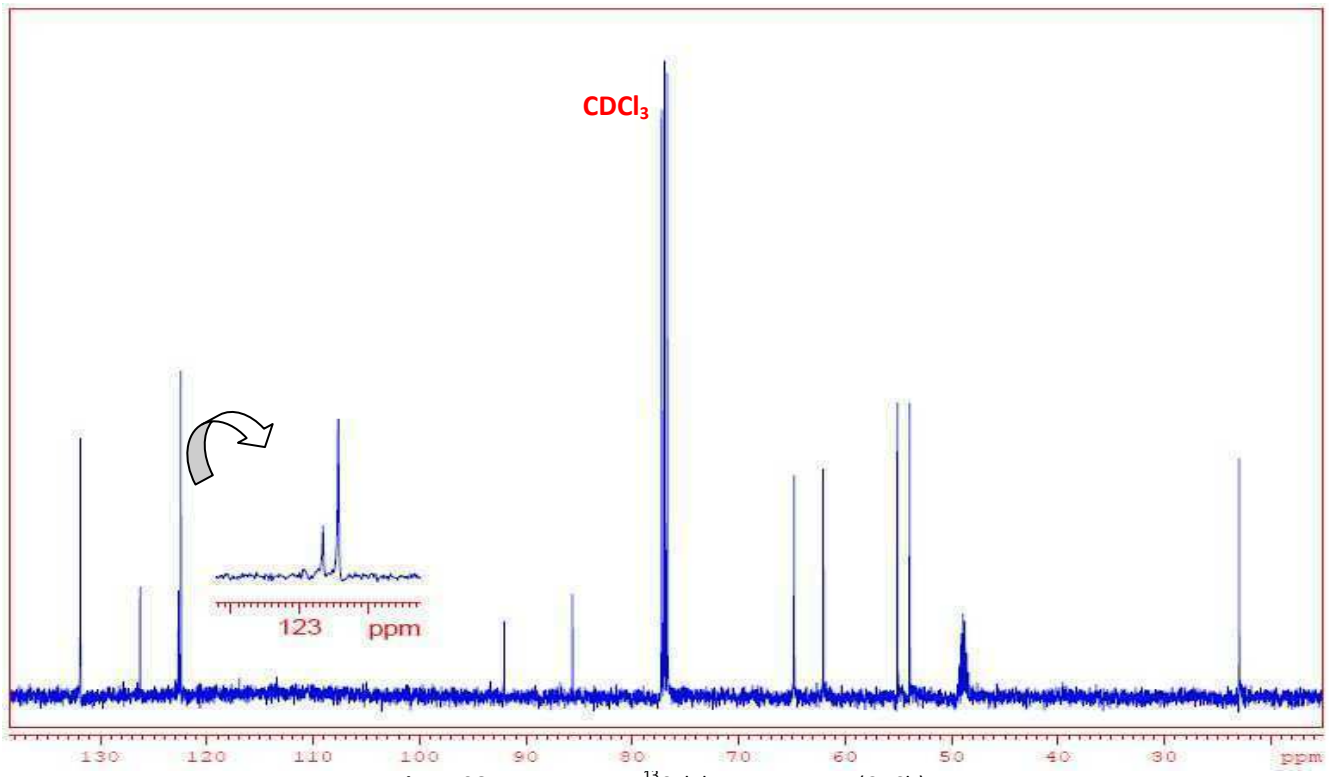


Figura 96: Espectro RMN ^{13}C del compuesto **11** ($CDCl_3$)

Con las correlaciones observadas en el experimento COSY, se dedujeron las siguientes estructuras parciales:

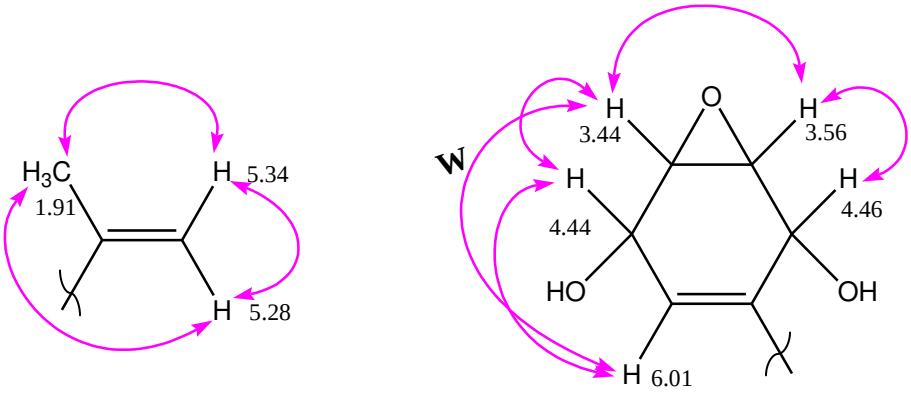


Figura 97: Estructuras parciales del compuesto **11** establecidas mediante el experimento COSY.

El experimento HMBC permitió conectar las estructuras parciales propuestas (figura 97), con lo cual se pudo deducir que el compuesto **11** poseía la estructura de la figura 98, conocida como asperpentina[25].

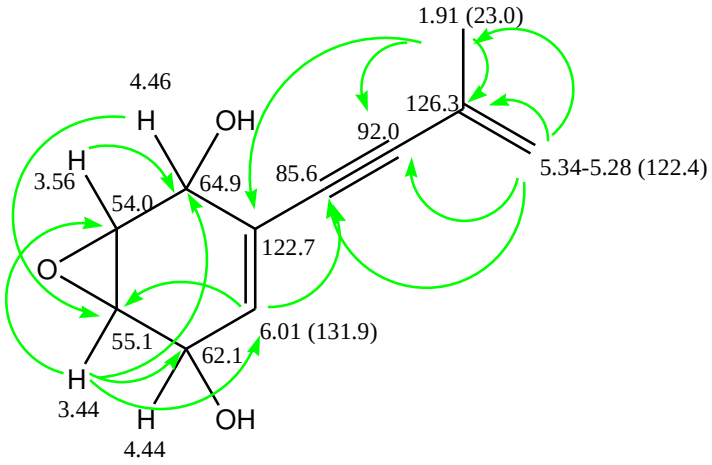


Figura 98: Correlaciones observadas en el espectro HMBC del compuesto **11**

Por comparación de los datos espectroscópicos, incluyendo el poder rotatorio, obtenidos en este trabajo con los bibliográficos se determinó que la estructura del compuesto 11 era idéntica a la aspertentina (figura 99) previamente aislada del cultivo del hongo *Aspergillus duricaulis*[25]. Cabe mencionar que se muestra en la figura la estereoquímica relativa, ya que no se determinó previamente la estereoquímica absoluta.

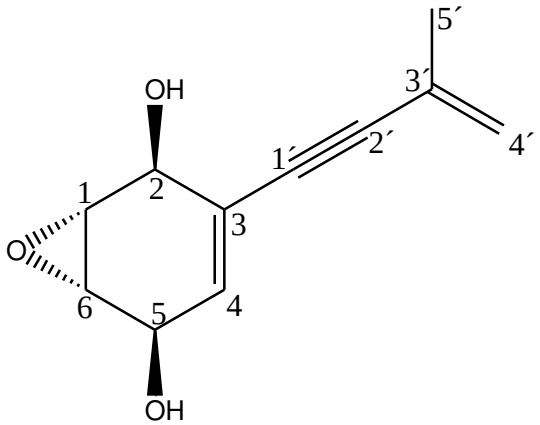


Figura 99: Estructura de la asperpentina, compuesto **11**

Compuesto 12

La fórmula molecular del compuesto **12** fue determinada como $C_{11}H_{14}O_5$ mediante espectrometría de masa de alta resolución utilizando la técnica de ionización ESI. Con este dato se dedujo que la molécula poseía 5 insaturaciones.

Al analizar el espectro de RMN-^{1}H ($CDCl_3$) del compuesto **12** (figura 100) se observó la presencia de seis señales que integraban para un protón cada una, tres de las cuales eran multipletes a δ 4.71, 4.52 y 3.86, otra un doblete ancho a δ 3.55 (J = 3.8 Hz) y dos dobletes a δ 2.68 y 2.51, con una constante de acoplamiento de 16 Hz igual para ambos, sugiriendo que estaban unidos al mismo carbono. Las señales de δ 4.71 y 4.52, pertenecían probablemente a dos grupos metinos oxigenados, mientras que las de δ 3.86 y 3.55 a un grupo epóxido. También se observó la presencia de dos singuletes a δ 1.53 y 1.43, que integraban para tres protones correspondientes a metilos unidos probablemente un carbono cuaternario oxigenado.

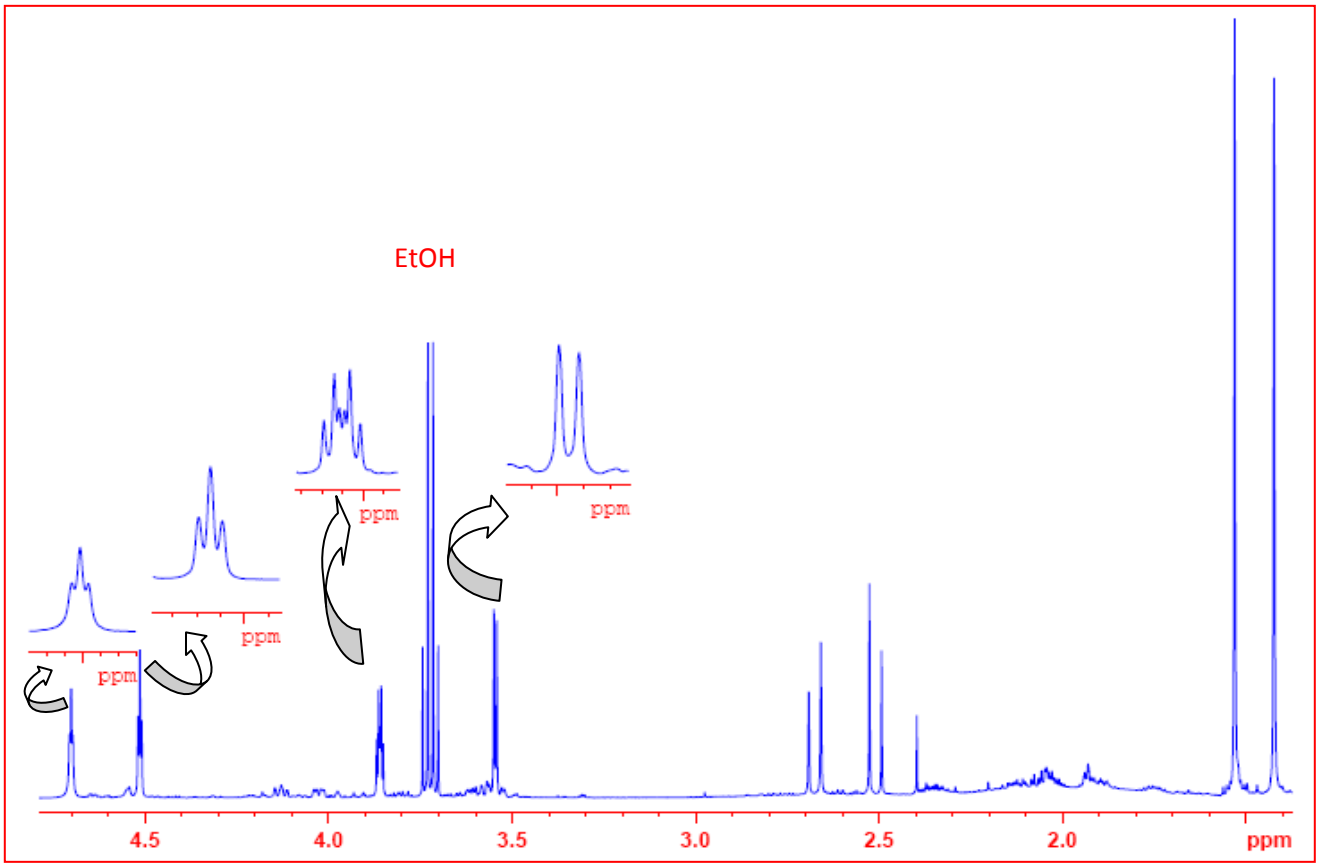


Figura 100: Espectro RMN-H^1 del compuesto **12** ($CDCl_3$)

En el espectro de RMN-^{13}C del compuesto **12** (figura 101), se observó la presencia de once señales de carbonos, cuatro de los cuales pertenecían a carbonos cuaternarios (δ 190.7, 166.4, 110.0 y 83.4), cuatro a grupos metinos (δ 66.8, 64.6, 57.9 y 49.7), una a un grupo metileno (δ 47.2) y las dos restantes a grupos metilo (δ 27.2 y 24.9). La multiplicidad de las señales de RMN-^{13}C se determinó a través del espectro HSQC-DEPT (figura 102).

El valor de desplazamiento químico de la señal de δ 190.7 indicaba la presencia de un grupo carbonilo α,β – insaturado y en ese caso las señales de δ 166.4 y 110.0 debían corresponder al doble enlace conjugado con el carbonilo, debiendo estar el carbono de δ 166.4 unido a un átomo de oxígeno. El carbono cuaternario de δ 83.4 y los metinos de δ 66.8, 64.6, 57.9 y 49.7 parecían corresponder a carbonos oxigenados, los dos últimos de un epóxido.

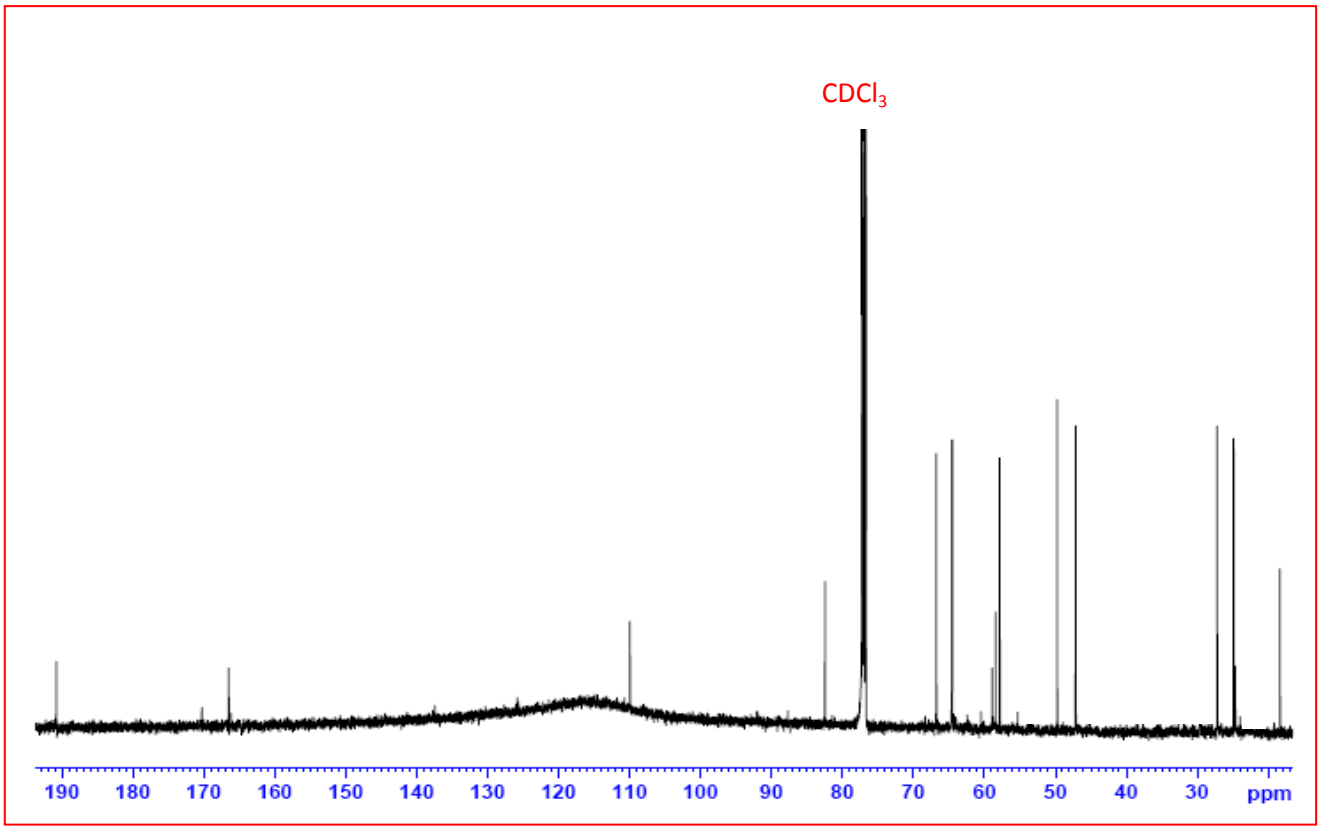


Figura 101: Espectro RMN-^{13}C del compuesto **12** ($CDCl_3$)

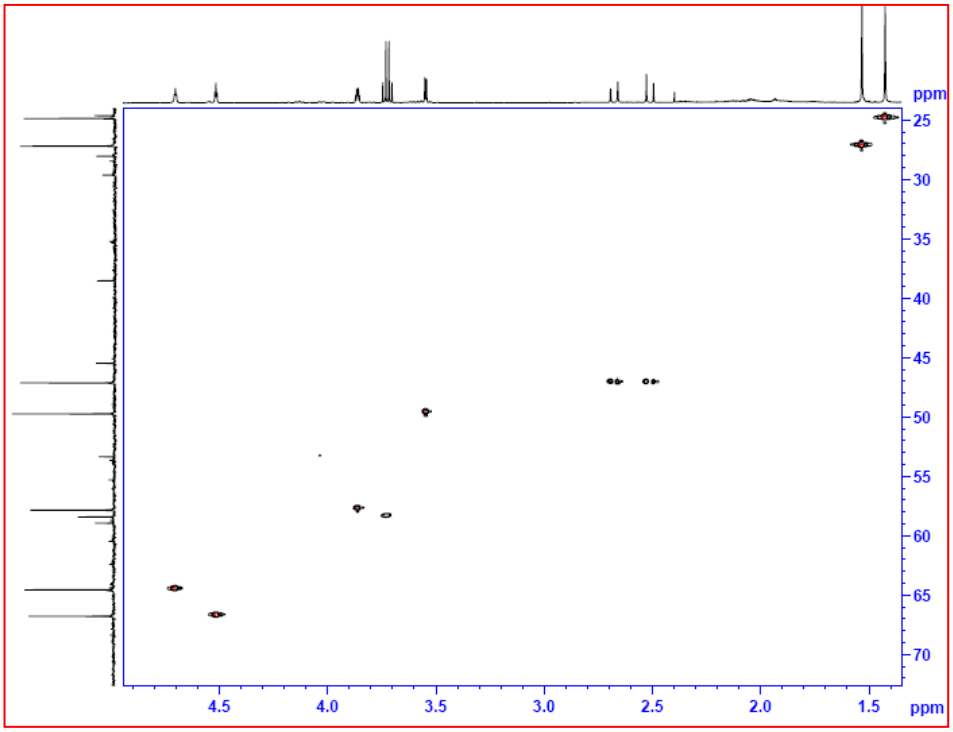


Figura 102: Ampliación del espectro HSQC del compuesto **12**

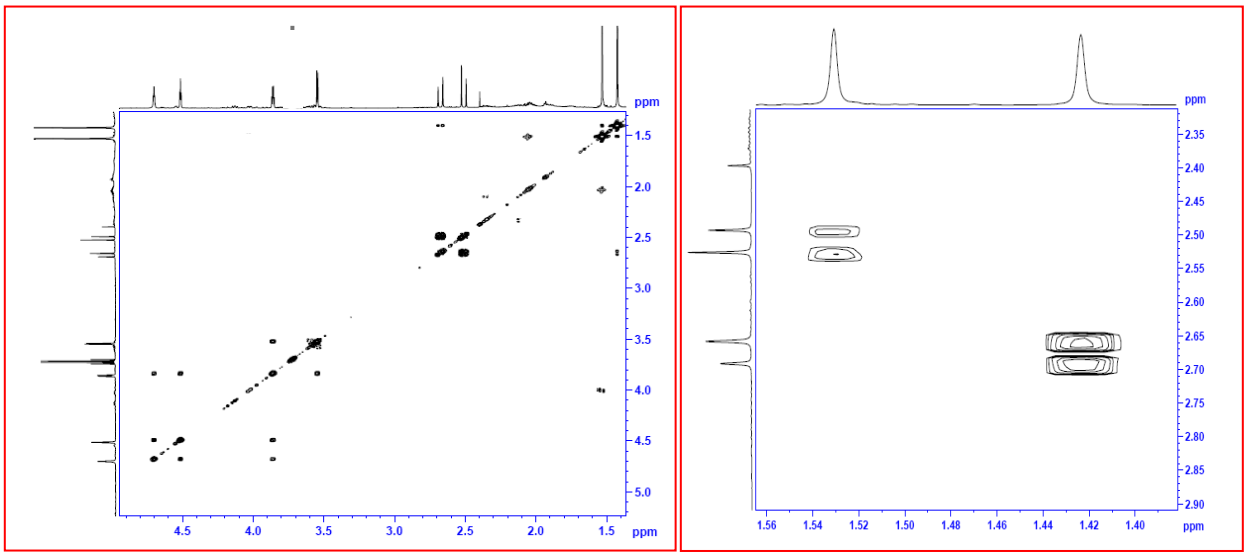


Figura 103: Ampliaciones del espectro COSY del compuesto **12**

Al analizar esta información en conjunto con la obtenida en el experimento COSY (figura 103), se pudieron proponer las siguientes estructuras parciales (figura 104):

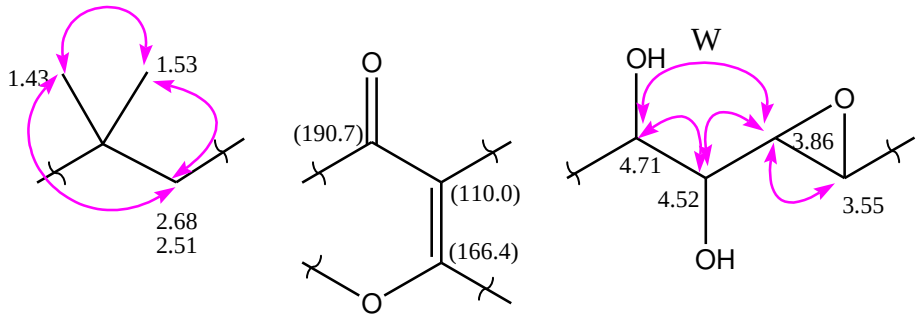
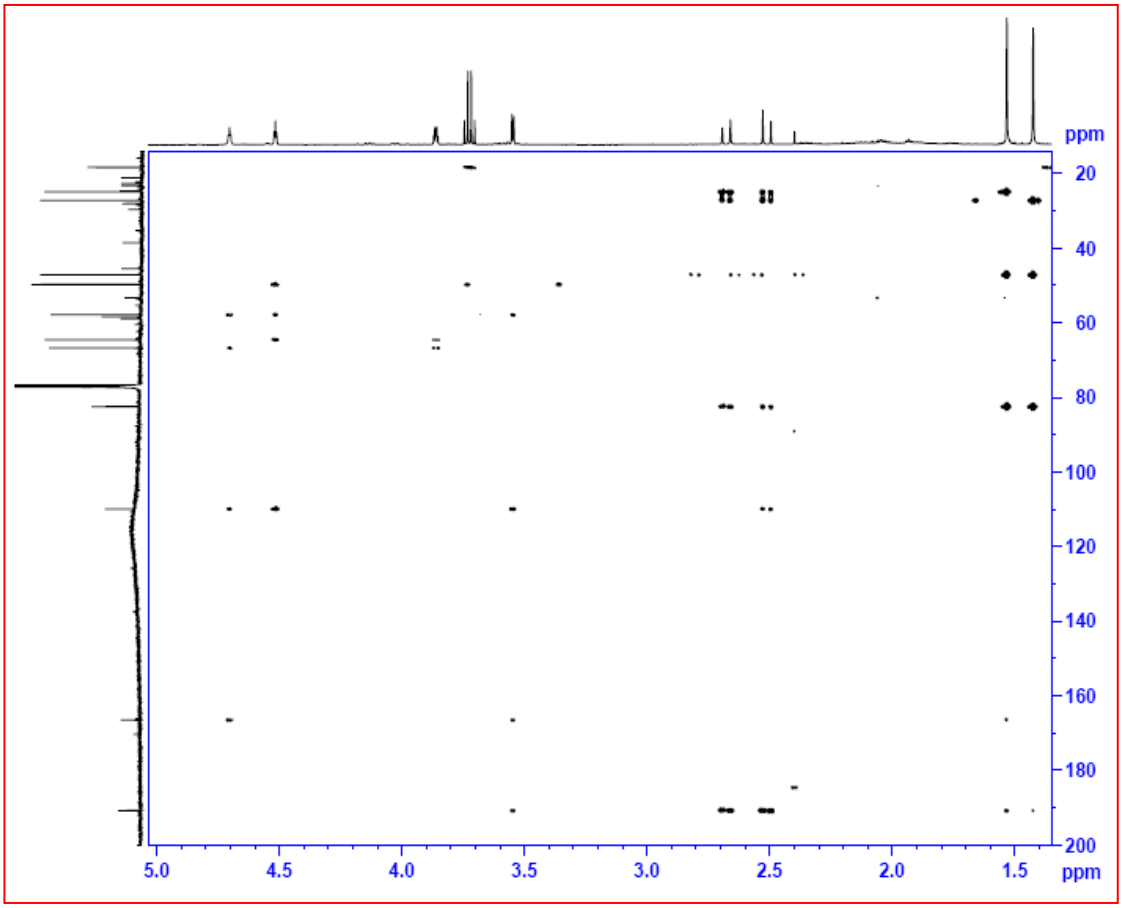


Figura 104: Estructuras parciales propuestas para el compuesto **12**

El experimento HMBC (figura 105) fue utilizado para confirmar y conectar las estructuras parciales propuestas y permitió proponer una estructura para el compuesto **12**. Esta estructura y algunas de las correlaciones observadas en el espectro HMBC se muestran en la figura 106.

Por un lado se observó que los dos grupos metilos de δ 1.53 y 1.43 correlacionaban con el carbono cuaternario de δ 83.4, con el metileno de δ 47.2 y entre ellos, mientras que los protones del grupo metileno de δ 2.68 y 2.51 correlacionaban con el carbono cuaternario oxigenado de δ 83.4, con los dos metilos y con el carbonilo de δ 190.7. Los protones de δ 4.71 y 2.51 correlacionaban con el carbono de doble enlace de δ 110.0 y el protón de δ 4.71 correlacionaba además con los carbonos de δ 190.7 y 166.4 y con el metino de δ 57.9. El protón de δ 4.52 correlacionaba con las señales de δ 110.0 y 57.9, el protón de δ 3.86 correlacionaba con las señales de δ 66.8 y 64.6 y por último el protón de δ 3.55 correlacionaba con los carbonos de 190.7, 166.4, 110.0 y 57.9.



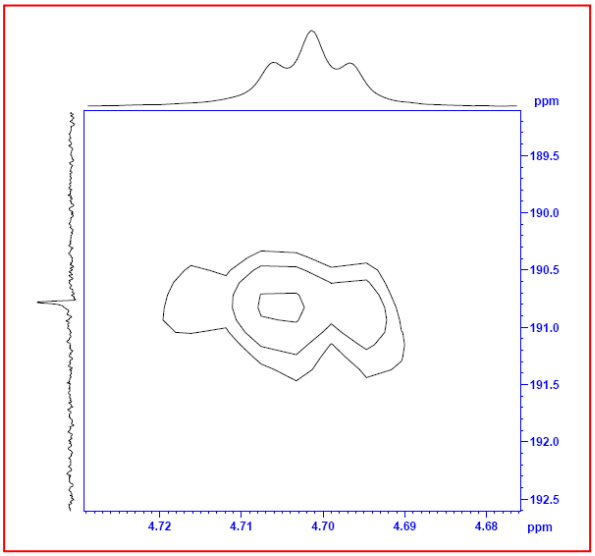


Figura 105: Espectro HMBC del compuesto **12** y una ampliación

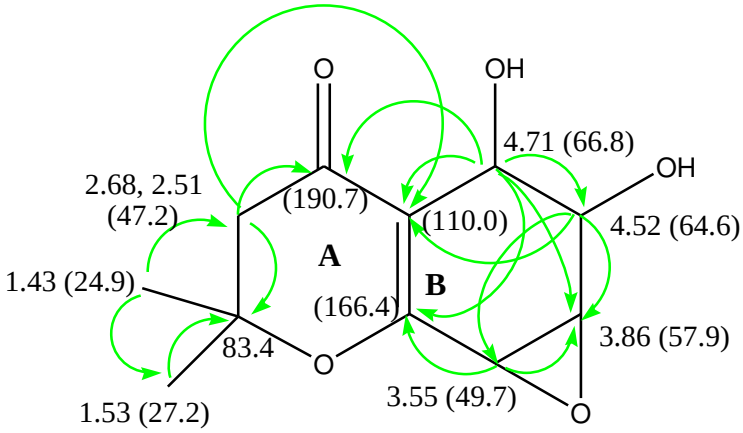


Figura 106: Algunas correlaciones observadas en el espectro HMBC para el compuesto **12**

Las bajas constantes de acoplamiento observadas para los protones del anillo B del compuesto **12** sugerirían que los protones se encuentran en posiciones pseudoecuatoriales. Esto indicaría la esteroquímica relativa mostrada en la figura 107.

Este hecho quedaría sustentado también con el acoplamiento W que se observa en el espectro RMN-^{1}H y la correlación entre los protones de δ 4.71 y 3.86 en el experimento COSY.

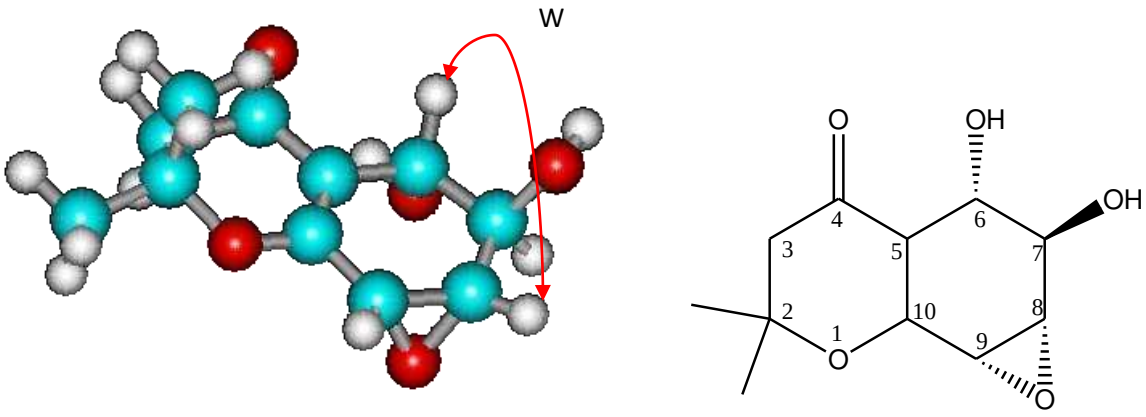


Figura 107: Estructura propuesta para el compuesto **12**

El espectro NOESY no mostró correlaciones lo cual es coherente con la estructura propuesta aunque por tratarse de un resultado por la negativa, no puede confirmarse la estructura propuesta.

Este compuesto no había sido previamente informado en la literatura.

Compuesto 13

La fórmula molecular del compuesto **13** fue determinada como $C_{12}H_{16}O_5$ mediante espectrometría de masa de alta resolución utilizando la técnica de ionización ESI.

Tanto el espectro de RMN-^{1}H (figura 108), como el de RMN-^{13}C del compuesto **13** eran similares a los obtenidos para el compuesto **12**, diferenciándose únicamente en la presencia de una señal a δ 3.42 (3H, s) en el espectro RMN-^{1}H y una a 58.3 ppm en el espectro de RMN-^{13}C.

Estos datos indicaban que el compuesto **13** poseía una estructura similar a la del compuesto **12** en la cual algún hidroxilo se encontraba metilado. Analizando las correlaciones observadas en el espectro de HMBC, se pudo deducir que el hidroxilo metilado era el de la posición 6, tal como se muestra en la figura 109, quedando determinada su estructura.

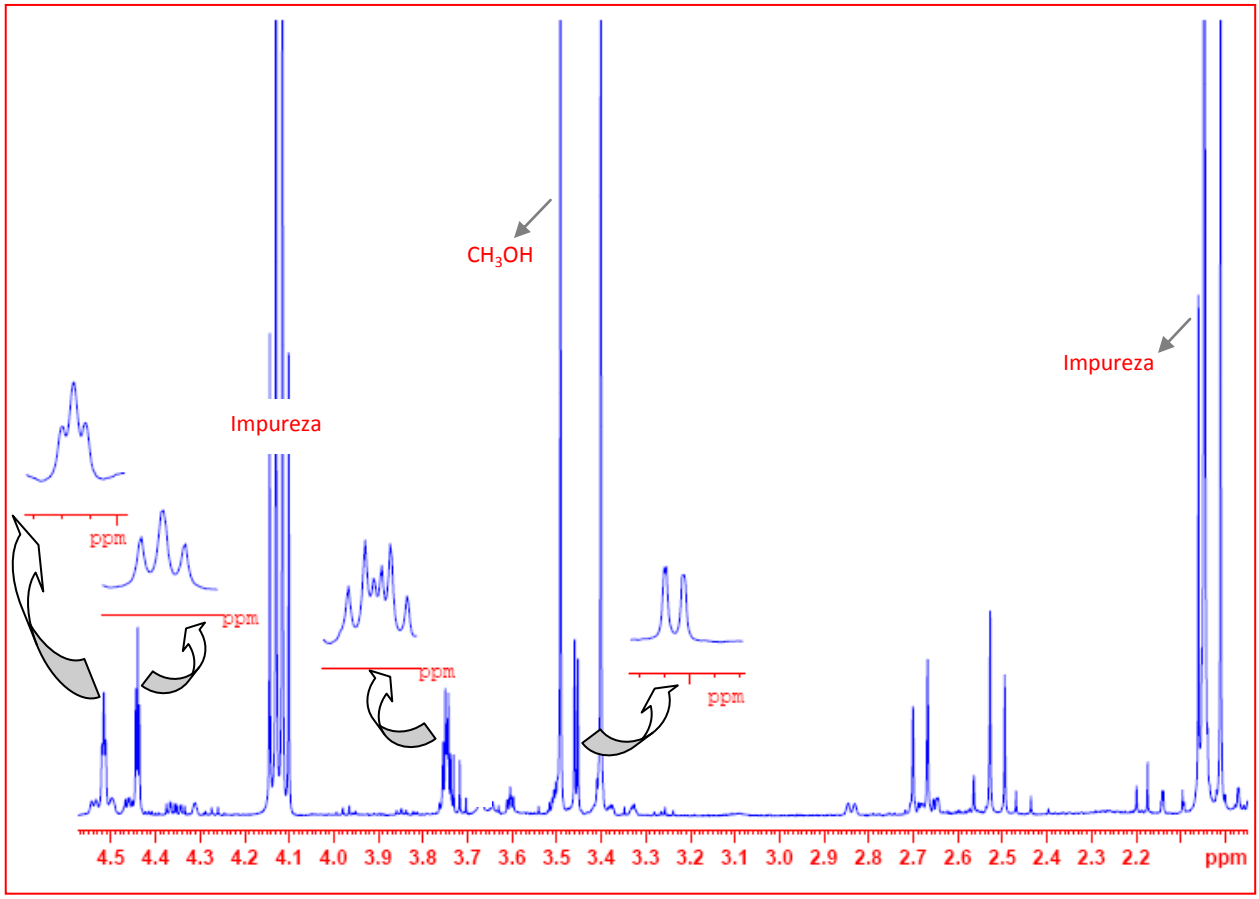


Figura 108: Espectro RMN-^{1}H ($CDCl_3$) del compuesto **13**

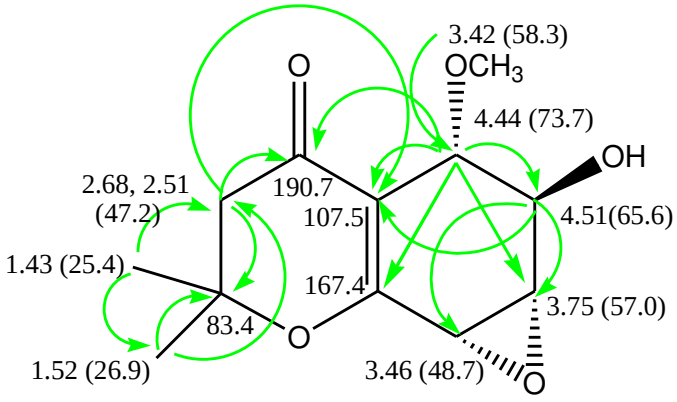


Figura 109: Estructura propuesta para el compuesto **13** junto con algunas correlaciones observadas en el espectro HMBC

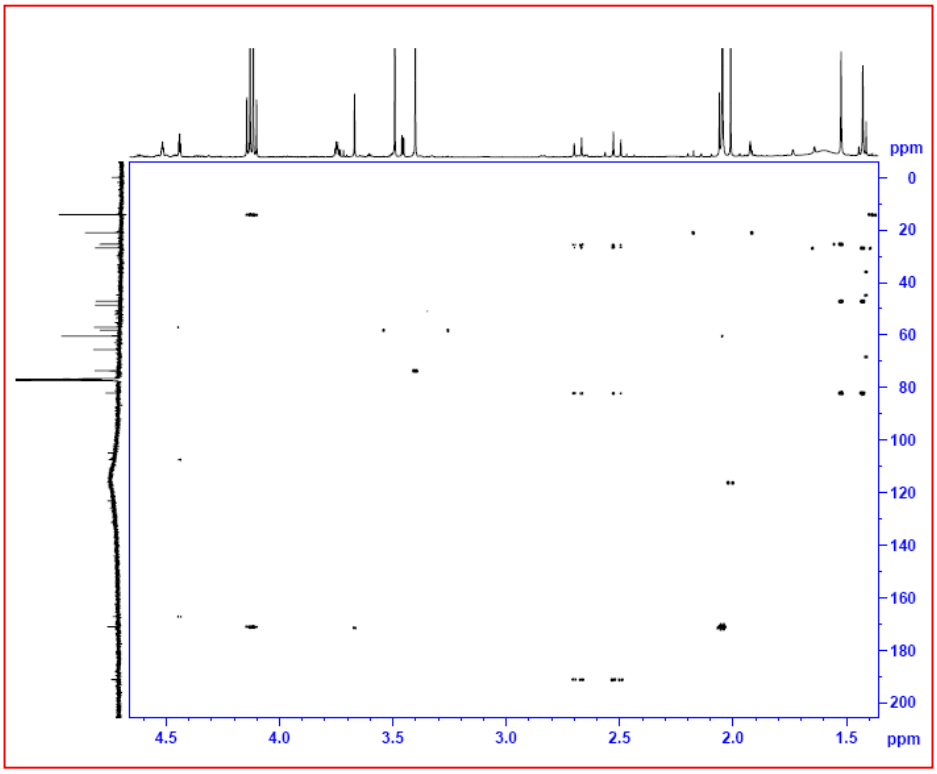


Figura 110: Ampliación del espectro HMBC del compuesto **13**

Por los motivos expuestos anteriormente para el compuesto **12**, se asume que la estereoquímica relativa del compuesto **13** es la que se muestra en la figura 109 y es similar a la del compuesto **12.**

Debido a la escasa cantidad de masa que se obtuvo del compuesto **13**, aún después de realizar tres cultivos de 5 litros cada uno, no fue posible realizar experimentos para deducir su esteroquímica absoluta. Para optimizar la producción de los compuestos **12** y **13** para poder completar la elucidación estructural se planea realizar próximamente un estudio del medio de cultivo para encontrar tanto la composición del medio así como características del cultivo, (temperatura, agitación, tiempo, etc.) más adecuadas.

La estructura del compuesto **13** tampoco ha sido informada previamente.

❖ Actividad biológica.

Para evaluar la actividad antifúngica se empleó el método de bioautografía directa sobre placas de ccd[26]. Los hongos fitopatógenos que se utilizaron para realizar los ensayos de bioactividad fueron *Fusarium virguliforme*[27], *Fusarium lateritium*[28], *Botrytis cinerea*[29], *Macrophomina phaseolina*[30] y *Rhizoctonia solani*[31].

El compuesto **11** presentó resultados positivos únicamente frente a las dos especies de *Fusarium* ensayadas con halos de inhibición de 10 mm y 5 mm contra *F. virguliforme* y *F. lateritium* respectivamente, mientras que los compuestos **12** y **13** fueron activos únicamente frente a *F. virguliforme* con halos de inhibición de 17 y 5 mm respectivamente.

Los compuestos **11**, **12** y **13** no presentaron actividad antibiótica frente a las especies bacterianas ensayadas (*B. subtillis, S. aureus* y *E. coli*).

Se ha informado que el espectro de actividades biológicas que presentan la asperpentina, (compuesto **11**) y compuestos de estructura similar es muy amplio, como actividad antifúngica, antitumoral y fitotóxica entre otras[25], aunque no hay detalles publicados sobre los resultados de los bioensayos.

❖ Biosíntesis.

Compuesto 11

La ruta biosintética de la asperpentina no ha sido determinada aún. Su estructura parecería provenir de una biogénesis mixta con la incorporación de una unidad de isopreno a un anillo aromático[32].

Compuestos 12 y 13

A partir del cultivo del hongo patógeno *Eutypa lata* se aislaron diferentes metabolitos relacionados con los compuestos **11**, **12** y **13**[33]. En ese trabajo se propuso una ruta biosintética para la obtención de los metabolitos aislados que podría aplicarse a los compuestos encontrados en este trabajo. Esta ruta se muestra en la figura 111.

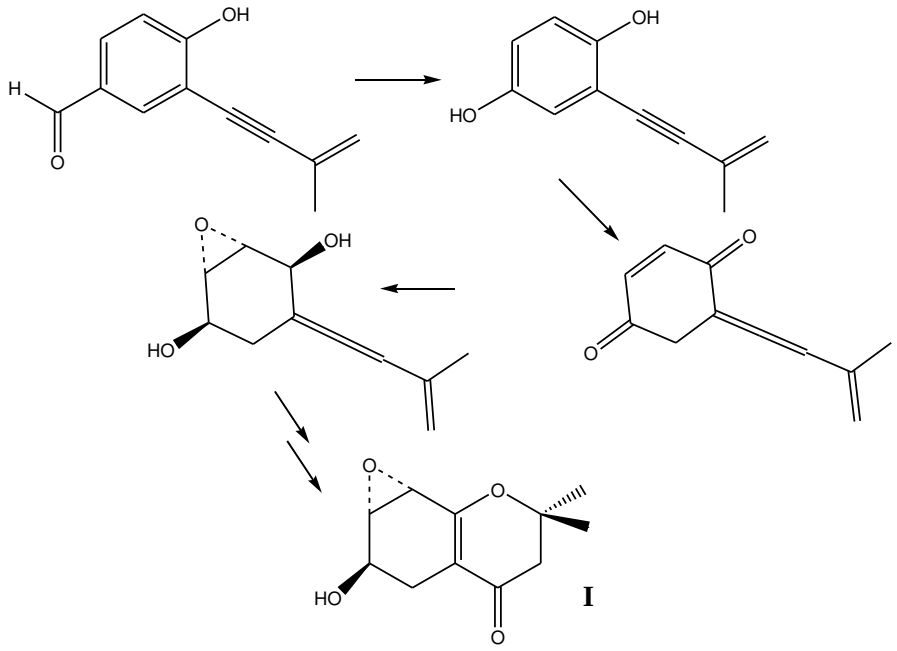


Figura 111: Ruta biosintética propuesta para el compuesto **I** relacionado estructuralmente con **12** y **13**[33]

Como puede observarse ,el precursor de esta ruta biosintética está relacionado estructuralmente con la asperpentina (compuesto **11**) sugiriendo que podría ser el precursor de los compuestos **12** y **13** aislados.

❖ Antecedentes de compuestos con estructura similar.

Como ejemplos de compuestos estructuralmente similares al compuesto **11**: se pueden citar el compuesto A, antibiótico obtenido del cultivo del deuteromycete *Beauveria felinase*[35] y el compuesto B proveniente de otro deuteromycete, *Helminthosporium siccans*[36] (figura 112).

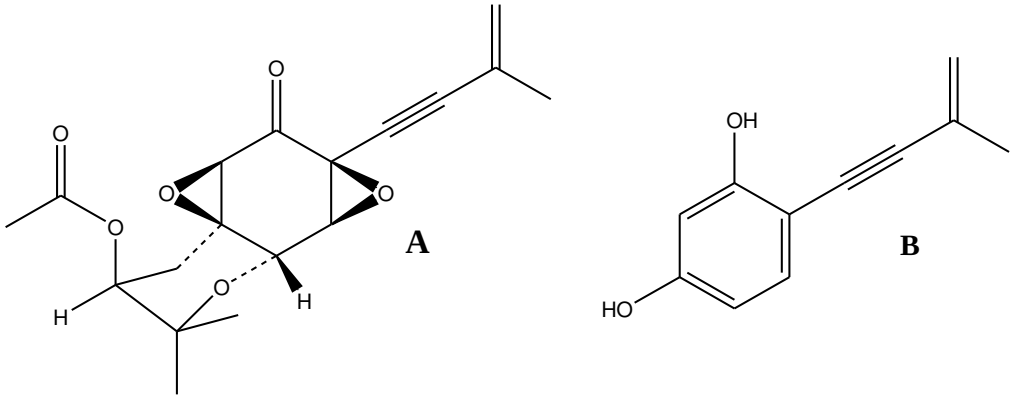


Figura 112: Compuestos de estructura química similar a la Asperpentina[35-36]

También se han aislado compuestos de estructura química semejante a la de los compuestos **11-13** del cultivo del hongo *Eutypa lata*, patógeno de varias clases de árboles y cultivos de vid[33] (figura 113).

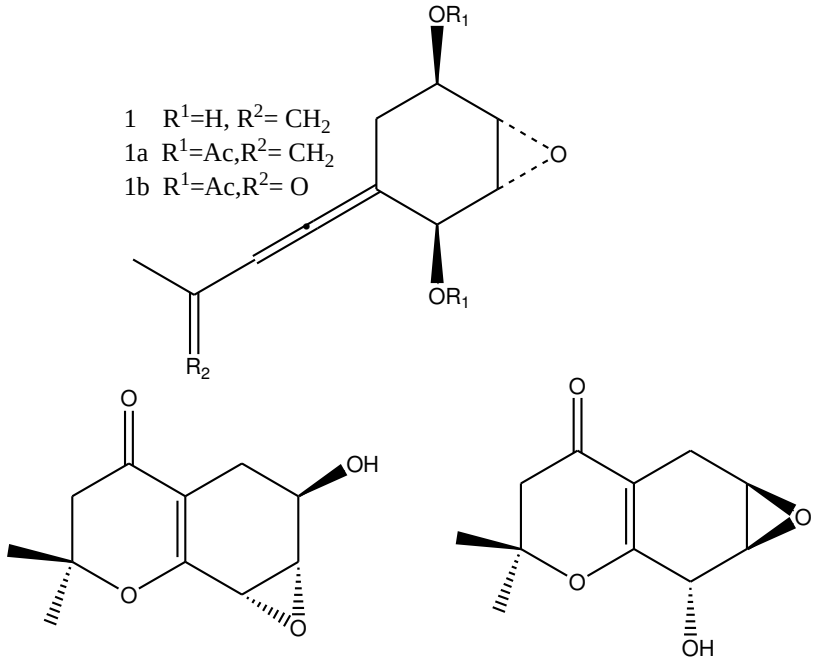


Figura 113: Compuestos aislados de *Eutypa lata*[33]

Lamentablemente en el trabajo mencionado no se informan todos los datos espectroscópicos de estos compuestos, por lo que no ha sido posible su comparación.

❖ Antecedentes de compuestos aislados de cultivos de hongos endofitos septados oscuros.

Como se mencionó en la introducción de este capítulo, si bien existen numerosos DSE descriptos, siendo las especies encontradas con mayor frecuencia en las raíces de plantas *Chloridium paucisporum, Leptodontidium orchidicola, Phialocephala dimorfospora, Phialocephala fortinii, Phialocephala finlandia*[18] y *Acephala applanata*[37], hasta el momento no existen publicaciones referidas al aislamiento y elucidación estructural de metabolitos secundarios, ya sean bioactivos o no, de ninguna especie DSE. Únicamente se describe en las publicaciones el importante rol de los DSE y las diferentes funciones que cumplen en la simbiosis planta hospedadora-hongo endofito[38, 39].

❖ Conclusión.

El escaso conocimiento que existe sobre los compuestos naturales aislados de hongos endofitos y en particular de hongos endofitos septados oscuros[40], hace de éstos una potencial fuente de metabolitos bioactivos por descubrir, ya que se sabe que alrededor del 80⁄ de las cepas de hongos DSE poseen tanto propiedades antibacterianas, antifúngicas, alguicidas y/o herbicidas[39], como inhibitorias de depredación frente a animales o insectos herbívoros[41].

Este sería el primer estudio realizado sobre los metabolitos secundarios bioactivos producidos por el cultivo de una cepa DSE. En este trabajo se obtuvo el compuesto conocido como asperpentina y otros dos compuestos no descriptos anteriormente como productos naturales.

En particular, los tres compuestos aislados presentaron actividad antifúngica importante frente a *F. virguliforme*, responsable de la enfermedad de soja síndrome de muerte súbita.

Debido a que las estructuras de los compuestos **12** y **13** no fueron aisladas hasta el momento de ninguna fuente natural, se planea continuar con el cultivo del hongo, optimizando la producción de **12** y **13** para obtener masa suficiente como para poder determinar la estereoquímica absoluta de sus centros quirales por métodos químicos. Así mismo, aprovechando la obtención de **11**, se planea determinar su estereoquímica absoluta, debido a que en literatura solamente se encuentra informada su esteroquímica relativa.

❖ Detalles experimentales.

La cepa del hongo DSE1 estudiada fue aislada por la Dra M. Alejandra Rodríguez (Laboratorio de Microbiología del suelo, DBBE, FCEN, UBA). La misma se aisló de raíces de cultivos de soja utilizando un método novedoso para el aislamiento de microorganismos endofitos[42]. En particular, la cepa estudiada fue cultivada y aislada en cajas de Petri con agar malta (MEA) como medio de cultivo, compuesto por extracto de malta (3⁄), peptona (0.5⁄) y agar (1.5⁄).

Cultivo de la cepa fúngica DSE1.

La cepa DSE1 estudiada fue cultivada en caja de Petri con MEA como medio de cultivo. La fermentación líquida fue llevada a cabo utilizando como medio de cultivo extracto de malta. Los cultivos en medio sólido se cortaron en porciones pequeñas de 1 cm por 1 cm aproximadamente para inocular 3 erlenmeyers de 250 ml conteniendo 75 ml de medio líquido cada uno. A la semana, estos cultivos líquidos fueron utilizados como inóculo de 6 cultivos de 1 litro cada uno con el mismo medio, contenidos en erlenmeyers de 4 litros. La fermentación fue llevada a cabo a 25°C por 7 días bajo condiciones estáticas. Las condiciones óptimas de crecimiento fueron determinadas previamente en experimentos de escala menor.

Extracción y fraccionamiento.

Los 5 litros de cultivo se filtraron separándose el medio de cultivo del micelio del hongo. Este último fue descartado, ya que en estudios previos se había determinado que era inactivo en los bioensayos testeados. El medio de cultivo fue extraído con acetato de etilo (3 x 1000ml), siendo la masa de extracto obtenida de 1.5 g, luego de ser evaporado en rotavapor. Como paso siguiente se particionó el extracto mediante cromatografía flash en columna seca en sílica gel, utilizando como eluyente mezclas de polaridad creciente de CH_2Cl_2:AcOEt.

Se recogieron 3 fracciones de 300 ml cada una. Dos de estas fracciones demostraron poseer compuestos de estructura química interesante por RMN-^{1}H y/o presentaron actividad antifúngica frente a los hongos fitopatógenos testeados.

La fracción II (386.5 mg, eluída con CH_2Cl_2-AcOEt (50:50)) fue fraccionada mediante el uso de cromatografía flash en columna seca en sílica gel utilizando como eluyente mezclas de polaridad creciente de cy: CH_2Cl_2: AcOEt, obteniéndose cinco fracciones, A, B, C, D y E, de 200 ml cada una. La fracción D, eluída con CH_2Cl_2: AcOEt (50/50), fue luego purificada utilizando una columna de sílica flash (50 cm de largo y 3.0 cm de diámetro interno) con mezclas de solventes de polaridad creciente CH_2Cl_2: AcOEt. De esta última separación se obtuvieron 45 mg del compuesto **11** (3⁄ del extracto original). La fracción E (55 mg), eluída con AcOEt, fue purificada mediante ccp utilizando como fase móvil CH_2Cl_2: AcOEt (70/30) obteniéndose 3 mg del compuesto **12** (0.2⁄ del extracto original).

La fracción activa III (141.9 mg, eluída con AcOEt) fue purificada utilizando una columna de sílica flash con un sistema CH_2Cl_2: AcOEt de polaridad creciente, desde 50:50 (v/v) hasta AcOEt puro. De esta separación se obtuvieron 4 fracciones de 100 ml cada una. La fracción II (64 mg, eluída con CH_2Cl_2: AcOEt, 70:30), fue purificada mediante ccp de sílica gel utilizando como fase móvil CH_2Cl_2: AcOEt 60:40. Esta separación brindó finalmente 1 mg del compuesto **13** (0.07／ del extracto original).

Propiedades físicas de los compuestos aislados.

Compuesto **11** (Asperpentina, (-)-(1R*,2S*,5R*,6S*)-3-(3-metilbut-3-en-1-inil)-7-oxabiciclo[4.1.0]hept-3-ene-2,5-diol)**:** sólido amarillo; **$[\alpha]_D^{25}$** -24° (c = 0.1, MeOH); **EM- AR-ESI/APCI** *m/z* $[M+Na]^+$ 215.06787, (valor calculado para $C_{11}H_{12}NaO_3$, 215.06766, Δ 2.0 ppm); **EM-EI** (70 eV) *m/z* (abundancia relativa): 192 $[M]^{+\cdot}$ (25), 175 $[M\text{-}OH^{\cdot}]^+$ (4), 163 $[M\text{-}C_3H_5^{\cdot}]^+$ (19), 145 (33), 131 (34), 117 (44), 91 (100), 77 (73), 65 (53); **RMN-^{1}H** ($CDCl_3$): δ 6.01 (dt, *J*= 4.9, 2.0 Hz, H-4); 5.34 (m, H-4´a); 5.28 (m, H-4´b); 4.46 (m, H-2); 4.44 (da, *J*= 4.9 Hz, H-5); 3.56 (m, H-1); 3.44 (m, H-6); 1.91 (t; *J*= 1.3 Hz, H-5´); **RMN-^{13}C** ($CDCl_3$) tabla 7.

Compuesto **12**: sólido amarillo; **EM- AR-ESI (+)** *m/z:* 249.0799 $[M+Na]^+$, (valor calculado para $C_{11}H_{14}NaO_5$, 249.07334, Δ 1.4 ppm); **EM-EI** (70 eV) *m/z* (abundancia relativa): 226 $[M]^{+\cdot}$ (4), 209 $[M\text{-}OH^{\cdot}]^+$ (32), 211 $[M\text{-}CH_3]^+$ (8), 154 (85), 83 (48); **RMN-^{1}H** ($CDCl_3$): δ 4.71 (ta, *J* = 2.5 Hz, H-6); 4.52 (ta, *J* = 2.5 Hz, H-7); 3.86 (dt, *J* = 3.8, 2.5 Hz, H-8); 3.55 (da, *J* = 3.8 Hz, H-9); 2.68 (d, *J* = 16.5 Hz, H-3a); 2.51 (d, *J* = 16.5, H-3b); 1.53 (s, C_2-C*H*$_3$); 1.43 (s, C_2-C*H*$_3$); **RMN-^{13}C** ($CDCl_3$): δ 190. 7, C-4; 166.4, C-10; 110.0, C-5; 83.4, C-2; 64.6, C-6; 66.8, C-7; 57.9, C-8; 49.7, C-9; 47.2, C-3; 27.2, C_2-*C*H$_3$; 24.9, C_2-*C*H$_3$.

Compuesto **13**: sólido amarillo; **EM- AR-ESI (+)** *m/z:* 263.0890 $[M+Na]^+$, (valor calculado para $C_{12}H_{16}NaO_5$, 263.0890, Δ 0 ppm); **EM-EI** (70 eV) *m/z* (abundancia relativa): 240 $[M]^{+\cdot}$ (5), 225 $[M\text{-}CH_3^{\cdot}]^+$ (1), 182 (54), 83 (58); **RMN-^{1}H** ($CDCl_3$): δ 4.51 (ta, *J* = 2.1 Hz, H-7); 4.44 (ta, *J* = 2.1 Hz, H-6); 3.75 (dt, *J* = 3.7, 2.5 Hz, H-8); 3.46 (da, *J* = 3.7 Hz, H-9); 3.42 (s, OC*H*$_3$); 2.68 (d, *J* = 16.5 Hz, H-3a); 2.51 (d, *J* = 16.5 Hz, H-3b); 1.53 (s, C_2-C*H*$_3$); 1.43 (s, C_2-C*H*$_3$); **RMN-^{13}C** ($CDCl_3$): δ 190. 7, C-4; 167.4, C-10; 107.5, C-5; 83.4, C-2; 73.7, C-6; 65.6, C-7; 58.3, O*C*H$_3$; 57.0, C-8; 48.7, C-9; 47.2, C-3; 26.9, C_2-*C*H$_3$; 25.4, C_2-*C*H$_3$.

Posición C	δ (ppm)	δ (ppm)[25]
1	54.0	54.1[a]
2	64.9	65.8[b]
3	122.7	127.8
4	131.9	133.0
5	62.1	63.3[b]
6	55.1	52.9[a]
1´	92.0	91.0[c]
2´	85.6	89.3[c]
3´	126.3	123.0
4´	122.4	122.3
5´	23.0	23.4

Tabla 7: Comparación de los datos de RMN-^{13}C ($CDCl_3$) experimentales con bibliográficos (CD_3COCD_3)[25] para el compuesto **11**

a, b, c indican que esos carbonos pueden ser intercambiados

❖ Bibliografía.

1. Jumpponen, A., Trape, J. M., Dark septate endophytes: a review of facultative biotrophic root-colonizing fungi. *New Phytologist* **1998,** 140, 295-310.
2. Maheshwari, R., What is an endophytic fungi? *Current Science* **2006,** 90, 1309.
3. Mandyam, K., Jumpponen, A., Seeking the elusive function of the root-colonising dark septate endophytic fungi. *Studies in Mycology* **2005,** 53, 173-189.
4. Wani, M. C., Taylor, H. L., Wall, M. E., Coggon, P., Mc Phail, A. T. , Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus breviflolia*. *Journal of the American Chemical Society* **1971,** 93, 2325-2327.
5. Stierle, A., Strobel, G., Stierle, D., Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science* **1993,** 260, 214-216.
6. Strobel, G., Xianshu Y., Sears, J., Kramer, R., Sidhu, R. S., Hess, W. M., Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. *Microbiology* **1996,** 142, 435-440.
7. Soto, M., Sanjurjo, M., González M. T., Cruz, D., Giral, F., El tejo mexicano (*Taxus globosa* sch.). Potencial de su aprovechamiento en taxol. *Ciencia Ergo Sum* **2000,** 7, 277-279.
8. Stierle, A. A., Stierle, D. B., Bungi, T., Sequoiatones A and B: Novel antitumor metabolites isolated from a redwood endophyte. *Journal of Organic Chemistry* **1999,** 64, 5479-5484.
9. Guo, B., Dai, J. R., Ng, S., Huang, Y., Ong, W., Carte, B. K., Cytonic acids A and B: Novel tridepside inhibitors of hCMV protease from the endophytic fungus *Cytonaema Species*. *Journal of Natural Products* **2000,** 63, 602-604.
10. Strobel, G. A., Miller, R. V., Martinez-Miller, C., Condron, M. M., Teplow, D. B., Hess, W. M., Cryptocandin, a potent antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis cf. quercina. Microbiology* **1999,** 145, 1919-1926.
11. Brady, S. F., Singh, M. P., Janso, J. E., Clardy, J., Cytoskyrins A and B, new BIA active bisanthraquinones isolated from an endophytic fungus. *Journal of the American Chemical Society* **2000,** 122, 2116-2117.
12. Lee, J. C., Lobkovsky, E., Pliam, N. B., Strobel, G., Clardy, J., Subglutinols A and B: Immunosuppressive compounds from the endophytic fungus *Fusarium subglutinans*. *Journal of Organic Chemistry* **1995,** 60, 7076-7077.
13. Lyons, P. C., Effects of the fungal endophyte *Acremonium coenophialum* on nitrogen accumulation and metabolism in tall fescue. *Plant Physiology* **1990,** 92, 726-732.
14. Reis, V. M., Baldani, J. I., Baldani, V. L. D., Dobereiner, J., Biological dinitrogen fixation in *Graminae* and palm trees. *Critical Reviews in Plant Sciences* **2000,** 19, 227-247.
15. Guo, L. D., Hyde, K. D., Liew, C. Y., Identification of endophytic fungi from *Livistona chinensis* based on morphology and rDNA sequences. *New Phytologist* **2000,** 147, 617-630.
16. Smith, S. E., Read, D. J., Mycorrhizal symbiosis. *2 nd edn. Academic Press, London* **1997**.
17. Diene, O., Narisawa, K., The use of simbiotic fungal associations with crops in sustainable agriculture. *Journal of Developments in Sustainable Agriculture* **2009,** 4, 50-56.
18. Rodriguez, R. J., White Jr., F. J., Arnold, A. E., Redman, R. S. , Fungal endophytes: diversity and funtional roles. *New Phytologist, Tansley review* **2009**, 1-17.
19. Sieber, T. N., Grünig, C. R., Biodiversity of fungal root endophyte communities and populations, in particular of the dark septate endophyte *Phialocephala fortinii* en Microbial Root Endophytes. Schulz BJE, Boyle, CJC & Sieber TN Eds. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Germany **2006**.

20. Fuchs, B., Haselwandter, K., Red list plants: colonization by arbuscular mycorrhizal fungi and dark septate endophytes. *Mycorrhiza* **2004,** 14, 277-281.
21. Ahlich, K., Sieber, T. N., The profusion of dark septate endophytic fungi in non-mycorrhizal fine roots of forest trees and shrubs. *New Phytologist* **1996,** 132, 259-270.
22. Menkis, A., Allmer. J., Vasiliauskas, R., Lygis, V., Stenlid, J., Finlat, R. , Ecology and molecular characterization of dark septate fungi from roots, living stems, coarse and fine woody debris. *Mycological Research* **2004,** 108, 965-973.
23. Vandenkoornhuyse, P., Baldauf, S. L., Leyval, C., Atraczek, J., Young, J. P. W., Extensive fungal diversity in plant roots. *Science* **2002,** 259, 2051.
24. Jumpponen, A., Dark septate endophytes - are they mycorrhizal? *Mycorrhiza* **2001,** 11, 207-211.
25. Mühlenfeld, A., Achenbach, H., Asperpentyn, a novel acetylenic cyclohexene epoxide from *Aspergillus duricaulis*. *Phytochemistry* **1988,** 27, 3853-3855.
26. Homans, A. F., Fuchs, A., Direct bioautography on thin-layer chromatography as a method for detecting fungitoxic substances. *Journal of Chromatography* **1970,** 51, 325-328.
27. Aoki, T., O'Donnell, K., Homma, Lattanzi, A., Sudden death syndrome of soybean is caused by two morphologically and phylogenetically distinct species within the *Fusarium solani* species complex, *F. virguliforme* in North America and *F. tucumaniae* in South America. *Mycologia* **2003,** 95, 660-684.
28. Clark, C. A., Valverde, R. A., Wilder- Ayers, J. A., Nelson, P. E., *Fusarium lateritium*, causal agent of sweetpotato chlorotic leaf distortion. *Phytopathology* **1990,** 80, 741-744.
29. Choquer, M., Fournier, E., Kunz, C., Levis, C., Pradier, J. M., Simon, A., Viaud, M., *Botrytis cinerea* virulence factors: new insights into a necrotrophic and polyphageous pathogen. *FEMS Microbiology Letters* **2007,** 277, 1-10.
30. Pineda, J. B., Avila, J. M. , Alternativas para el control de *Macrophomina phaseolina* y *Fusarium oxysporum* patógenos del ajonjoli (*Sesamum indicum L.*) *Agronomía Tropical* **1988,** 38, 79-84.
31. Wiese, M. V., Compendium of wheat diseases. *American Phytopathological Society* **1987,** 124.
32. Dewick, P. M., Medicinal natural products. A biosynthetic approach. John Wiley & Sons Ltd. Baffins Lane, Chichester, England. **1997**.
33. Renaud, J. M., Tsoupras, G., Stoeckli-Evans, H., Tabacchi, R., A novel allenic epoxycyclohexane and related compounds from *Eutypa lata*. *Helvetica Chimica Acta* **1989,** 72, 1262-1267.
34. Duke, R. K., Richards, R. W., Stereoespecific total synthesis of the cyclohexene oxide antibiotic Eupenoxide. *Journal of Organic Chemistry* **1984,** 49, 1898-1904.
35. Seto, H., Furihata, K., Otake, N., Itoha, Y., Takahashia, S., Haneishia, T., Ohuchib, M., Application of long range $J_{C\text{-}H}$ resolved 2D spectroscopy in structural elucidation of natural products. The structure of oxirapentyn. *Tetrahedron Letters* **1984,** 25, 337-340.
36. Ichihara, A., Kimura, R., Sakamura, S., Synthesis of 7- desoxypanepoxydol. *Agricultural and Biological Chemistry* **1975,** 39, 555-556.
37. Grünig, C. R., Duò, A., Sieber, T. N., Holdenrieder, O., Assignment of species rank to six reproductively isolated cryptic species of the *Phialocephala fortinii* s.1.-*Acephala applanata* species complex. *Mycologia* **2008,** 100, 47-67.
38. Schulz, B., Boyle, C., Draeger, A., Rösmmert, A. K., Krohn, K., Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological Research* **2002,** 106, 996-1004.
39. Schulz, B., Rösmmert, A. K., Dammann, U., Aust, H. J., Strack, D., The endophyte-host interaction: a balanced antagonism. *Mycological Research* **1999,** 103, 1275-1283.
40. Tan, R. X., Zou, W. X., Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural Products Reports* **2001,** 18, 448-459.
41. Clay, K., Fungal endophytes of grasses: a defensive mutualism between plants and fungi. *Ecology* **1988,** 69, 10-16.

42. Silvani, V. A., Fracchia, S., Fernández, L., Pérgola, M., Godeas, A., A simple method to obtain endophytic microorganisms from field-collected roots. *Soil Biology & Biochemistry* **2008,** 40, 1259-1263.

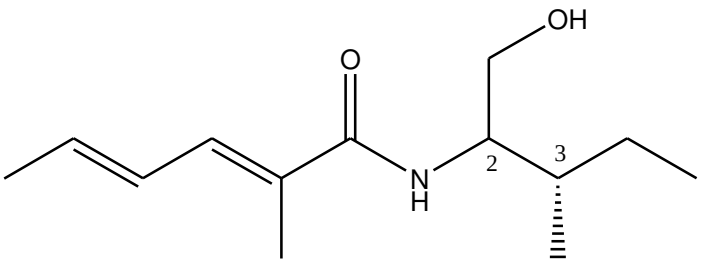
Capítulo 7

Síntesis de metabolitos antimicrobianos producidos por el hongo intermareal *Acremonium furcatum*

❖ Introducción.

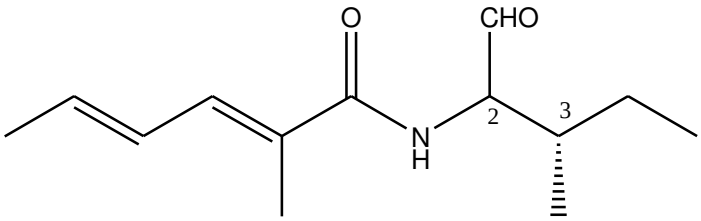
En estudios previos realizados en el laboratorio se aislaron e identificaron nuevos aminoalcoholes epímericos **14** y **15** (1:3) y aminoaldehídos epiméricos **16** y **17** (1:1) derivados de isoleucina, del cultivo del hongo intermareal *Acremonium furcatum*, con actividad antimicrobiana frente a bacterias y hongos fitopatogénos (figura 114).

Debido a que no fue posible la separación de los epímeros, ni empleando HPLC con una columna quiral, ni por métodos químicos y enzimáticos, se decidió sintetizar a cada uno de los componentes de la mezcla para poder evaluar la bioactividad de cada compuesto por separado y poder determinar además las constantes físicas.



Compuesto **14** (2S, 3S)

Compuesto **15** (2R, 3S)



Compuesto **16** (2S, 3S)

Compuesto **17** (2R, 3S)

Figura 114: Compuestos aislados del hongo marino *Acremonium furcatum*

❖ Síntesis de los compuestos 14 y 15.

Como estrategia sintética se decidió realizar el acoplamiento entre el correspondiente ácido e isoleucina en forma tradicional empleando diciclohexilcarbodiimida (DCC)[1] y posteriormente reducir el ácido carboxílico de la isoleucina con la metodología publicada por Hamada y colaboradores[2].

Esta metodología permitía además la posibilidad de obtener los diferentes epímeros y otros compuestos análogos con el fin de analizar la relación estructura actividad variando el aminoácido de partida.

Por tal motivo el primer paso de síntesis fue la obtención del ácido insaturado **22**, para lo cual se utilizó el procedimiento propuesto por Ceroni y Séquin[3], que se muestra en la figura 115.

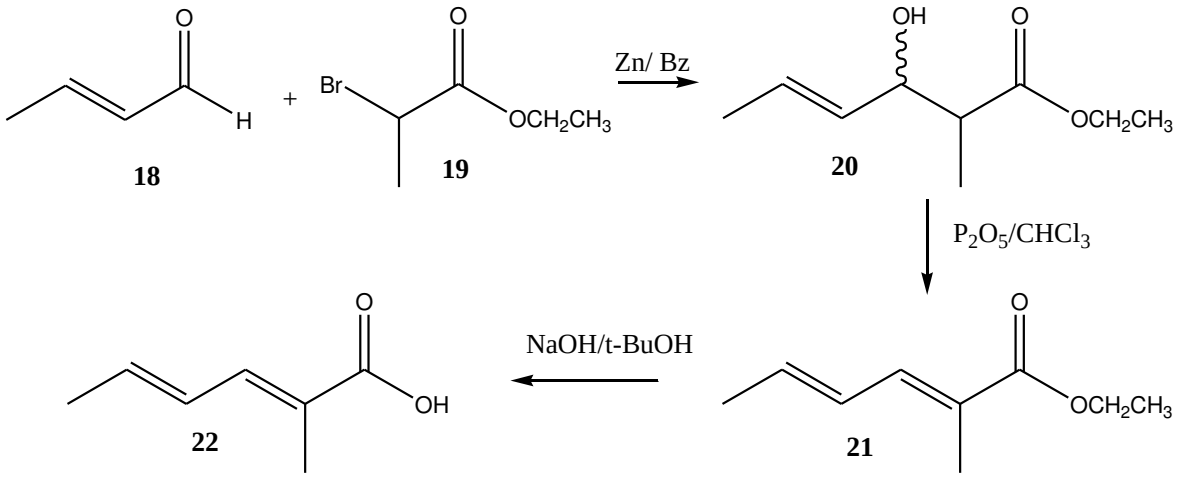


Figura 115: Ruta sintética para la obtención del ácido **22**

La condensación de Reformatsky de crotonaldehído (compuesto **18**) con 2-bromopropionato de etilo racémico (compuesto **19**) brindó como producto una mezcla diasteromérica de los hidroxiésteres **20**. Esta mezcla se trató con P_2O_5 sobre sílica gel Kieselgel 60 G- Merck (1:2) en lugar del agente Sicapent[3], utilizada en el trabajo de Ceroni, para obtener el compuesto **21**. Dicho compuesto fue hidrolizado al ácido **22** con NaOH en *t*-butanol a reflujo. Fue necesario el uso de *t*-butanol ya que en presencia de otros alcoholes primarios, se producían numerosos subproductos de adición a los dobles enlaces, tanto en medio básico como ácido.

Como paso siguiente se obtuvo el clorhidrato correspondiente a L-isoleucina y D-*allo*-isoleucina metilados, tal como se muestra en la figura 116. Se emplearon estos aminoácidos ya que eran los precursores de los compuestos naturales aislados.

Este paso consistió en primer lugar en la protección del grupo amino presente en el aminoácido utilizando di-*t*-butilcarbonato en TEA, posteriormente en la metilación del grupo carboxilo con ioduro de metilo en DMF y finalmente en la formación del clorhidrato, haciendo reaccionar a los aminoácidos protegidos con una solución saturada de cloruro de hidrógeno en acetato de etilo seco[2, 4].

Se utilizaron los clorhidratos correspondientes en lugar de los aminoácidos libres, ya que su uso mejora el rendimiento en el paso de acoplamiento posterior[4].

Partiendo del aminoácido L-Ile se obtuvo como producto el compuesto **23** y a partir de D-*allo*-Ile se obtuvo **24**.

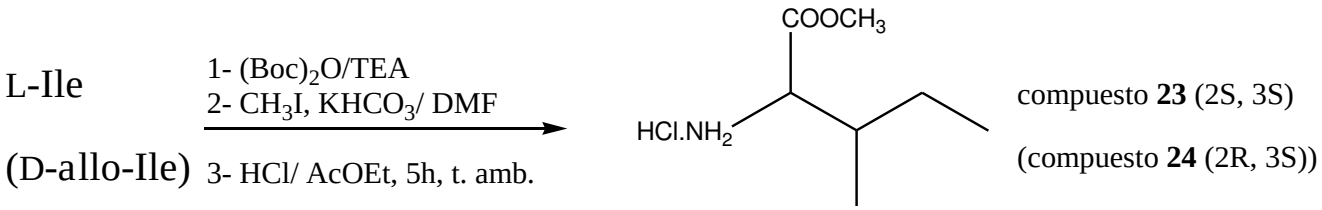


Figura 116: Ruta de obtención de los compuestos **23** y **24**

Una vez obtenidos los compuestos **22**, **23** y **24** se procedió al paso de acoplamiento empleando DCC en THF, con previo agregado de 1 equivalente de base[1]. Este paso brindó como productos el compuesto **25**, para L-Ile, y el **26** para D-*allo*-Ile (figura 117).

Como base se empleó Py ya que se obtuvo un mejor rendimiento que con Et_3N.

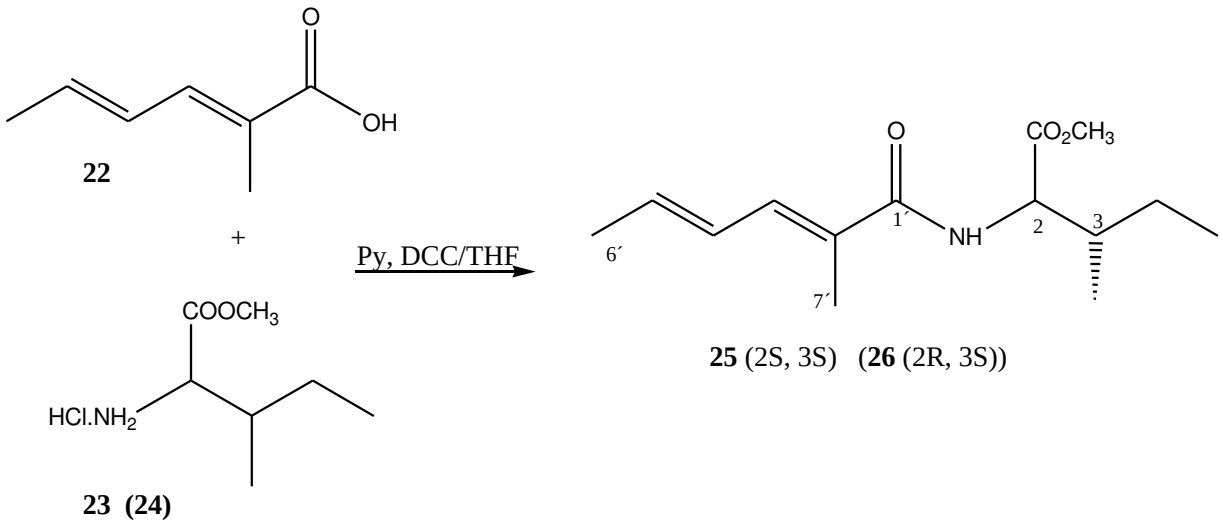


Figura 117: Acoplamiento entre el ácido **22** y el aminoácido **23** (**24**) [1]

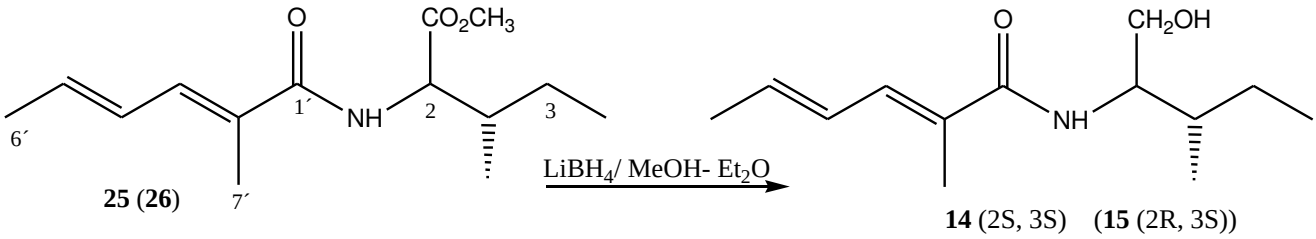


Figura 118: Preparación del compuesto **14** (o **15**)

Como paso final para la obtención de los productos naturales **14** y **15** se redujeron los compuestos **25** y **26** con $LiBH_4$/MeOH/Et_2O[5] para dar los correspondientes alcoholes (figura 118).

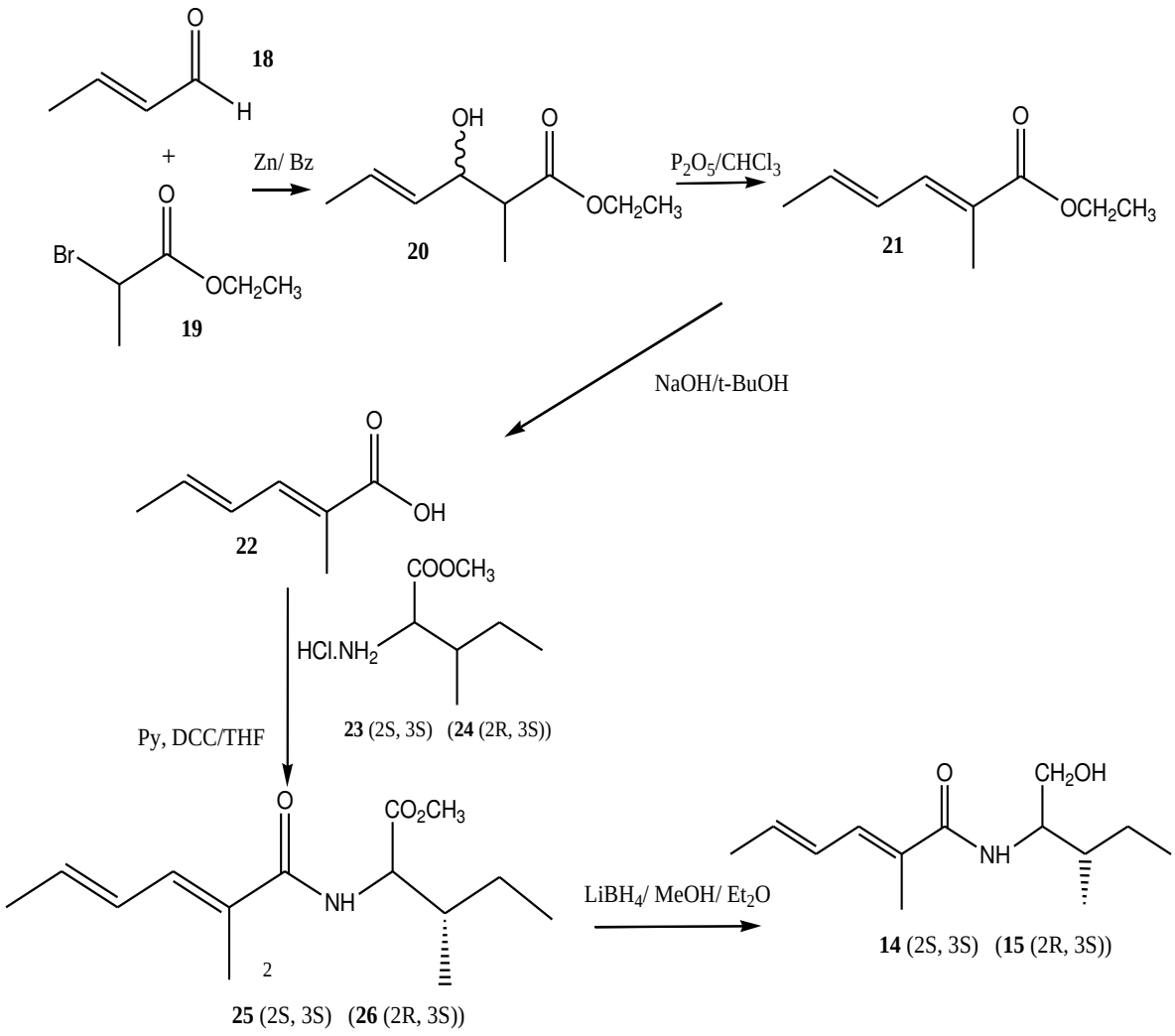


Figura 119: Esquema general de la síntesis realizada

Los datos espectroscópicos de los compuestos **14** y **15** sintetizados (figura 119), coincidieron con los de los compuestos naturales aislados previamente y los valores medidos de los poderes rotatorios molares $([\alpha]_D)^6$ para la mezcla de los compuestos naturales coincidió con la suma relativa de los obtenidos para los epímeros sintéticos.

En el caso de los compuestos **16** y **17** que habían sido obtenidos naturalmente como compuestos minoritarios en relación 1:1 y que se descomponían con facilidad, restaba determinar la estereoquímica absoluta.

Si bien podía asumirse que la mezcla epimérica estaba formada por D-*allo* y L-isoleucinaldehído, de igual forma que los compuestos **14** y **15** presentes en el mismo extracto, se decidió confirmarlo a través de la síntesis del compuesto **28** (*N-Boc*-L - isoleucinaldehído), figura 120.

El aminoácido L-isoleucina protegido en el N con Boc y metilado, obtenido como se detalló anteriormente, se redujo con borohidruro de litio dando como producto *N-Boc*-L-isoleucinol, compuesto **27**. Dicho compuesto fue luego oxidado con clorocromato de piridinio (PCC)[7] para dar el producto **28**.

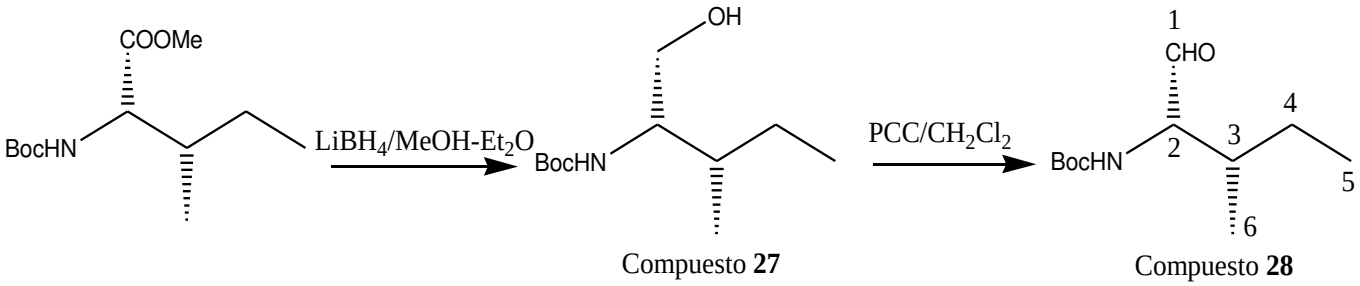


Figura 120: Esquema de obtención del compuesto **28**

Los datos espectroscópicos de RMN-^{1}H y RMN-^{13}C obtenidos para el compuesto **28** coinciden con los observados para las señales correspondientes a uno de los aldehídos naturales compuesto **16**, confirmando así su identidad y permitiendo la completa asignación de la mezcla natural.

Los datos espectroscópicos determinados en este trabajo para el éster **21**[8] y para el ácido **22**[9] son coincidentes con los hallados en la literatura.

❖ Actividad biológica.

Se determinaron las actividades antibacterianas y antifúngicas de los compuestos naturales sintetizados y de los intermediarios sintéticos obtenidos.

La actividad antibiótica fue determinada mediante el método de difusión en agar frente a cepas de *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y *Escherichia coli* (ATCC 25922). Gentamicina que exhibe halos de inhibición de 25-30 mm frente a estas cepas, fue el compuesto comercial utilizado como testigo positivo.

Para evaluar la actividad antifúngica se empleó el método de bioautografía directa sobre placas de ccd[10]. Se utilizó Benomyl como compuesto comercial testigo que presenta halos de inhibición entre 20 y 28 mm por esta técnica. Cuando se consideró apropiado se determinaron las concentraciones mínimas de inhibición mediante el mismo método.

Las cepas fúngicas contra las que se probó bioactividad fueron las siguientes: *Fusarium virguliforme*, responsable del síndrome de muerte súbita de la soja; *Colletotrichum truncatum*, causante de la enfermedad antracnosis; *Macrophomina phaseolina*, que causa la enfermedad conocida como podredumbre carbonosa; *Botrytis cinerea*, patógeno de vid y *Aspergillus fumigatus.*

Los resultados obtenidos se detallan en la tabla 8 (y las estructuras de los compuestos se resumen en las figuras 119 y 120).

En línea general puede observarse que en los ensayos de actividad antibiótica los compuestos **14** y **25**, que poseen la misma esteroquímica en sus centros quirales, resultaron activos frente a *B. subtilis* y *E. coli*, mientras que los compuestos epiméricos **15** y **26** resultaron inactivos. Salvo el compuesto **15**, que resultó levemente activo frente a *S. aureus,* los demás compuestos mencionados resultaron inactivos.

Los intermediarios **21** y **22** en cambio resultaron poseer buena- moderada actividad antibiótica frente a las bacterias Gram – positivas, sobre todo el compuesto **21** que presentó halos de inhibición de 15 mm frente a ambas cepas.

	14	15	21	22	25	26	28	B	Mn
E. coli[a]	7	_	_	_	7	_	_	nd	9
B. subtilis[a]	9	_	15	9	10	_	_	nd	10
S. aureus[a]	_	7	15	9	_	_	_	nd	8
F. virguliforme[b]	10[c]	15	15 (5μg)	25 (1μg)	12[c]	15	_	20	12
A. ***fumigatus***[b]	10[c]	15	24 (1μg)	29 (1μg)	_	10	14	20	10
B. cinerea[b]	_	15	12 (5μg)	15 (1μg)	_	_	_	28	12
C. truncatum[b]	5	10	10 (10μg)	12 (1μg)	_	8	11	25	nd
M. phaseolina[b]	nd	Nd	10 (25μg)	20 (1μg)	nd	nd	nd	22	nd

Halos de inhibición en mm (MIC μg/pt); nd no determinado; [a] concentración utilizada: 50 μg/6 mm disco; [b] concentración utilizada: 50 μg/punto; B benomyl (25 μg/punto); Mn muestra natural de epímeros **14**/**15** (1:3); [c] halos difusos.

Tabla 8: Actividades antimicrobianas de los compuestos naturales y sintéticos

Con respecto a los ensayos de actividad antifúngica se observó que el compuesto **15** era activo frente a *F. virguliforme*, *A. fumigatus*, *B. cinerea* y *C. truncatum*, con halos de inhibición de 15 mm frente a las tres primeras cepas y 10 mm frente a la última, mientras que su epímero, el compuesto **14**, demostró poseer una pobre actividad antifúngica, con halos de inhibición difusos de 10 mm frente a *F. virguliforme* y *A. fumigatus* y 5 mm frente a *C. truncatum.*

Los compuestos **21** y **22** demostraron poseer muy buena actividad antifúngica, comparable con la del producto comercial benomyl y por tal motivo se determinaron los valores de los MIC para cada compuesto frente a las especies fúngicas ensayadas. Los MIC observados para **21** fueron entre 1 y 25 μg/pt, mientras que para **22** resultaron de 1 μg frente a todas las cepas ensayadas.

Es interesante observar que la mezcla natural que contiene a los compuestos **14** y **15** en relación 1:3 refleja este hecho en los ensayos realizados, ya que resultó tanto antibiótica como antifúngica y en los ensayos de actividad antifúngica con halos de inhibición inferiores a los del componente con mayor actividad.

Es notable que a partir de los resultados observados en los ensayos puede concluirse que los compuestos derivados de L-Ile (**14** y **25**) resultaron antibióticos pero poco antifúngicos, mientras que los derivados de D-allo-Ile (**15** y **26**), mostraron tener buena actividad antifúngica pero no antibiótica.

❖ Conclusión.

Se sintetizaron nuevos agentes antimicrobianos que habían sido previamente aislados del cultivo del hongo intermareal *Acremonium furcatum* pudiendo así confirmar las estructuras propuestas incluyendo la estereoquímica absoluta, y evaluar las actividades biológicas que posee cada compuesto en forma individual.

Debido a la muy buena actividad de los intermediarios **21** y **22** comparada con los productos naturales se decidió no realizar la síntesis de otros análogos a partir de diferentes aminoácidos como se había planeado inicialmente al comentar la síntesis de **14** y **15**.

Este trabajo dio origen a una publicación[11].

❖ Detalles experimentales.

- Síntesis del éster etílico del ácido (4*E*)-3-hidroxi-2-metil-hex-4-enoico (Compuesto **20,** figura 119, pág. 166).

Se adicionó gota a gota una mezcla de crotonaldehído **18**, (37 ml, 0.45 mol) y 2-bromopropionato de etilo **19**, (46 ml, 0.41 mol) a una suspensión de zinc (31 g, 0.47 mol) en 150 ml de benceno seco. El zinc fue previamente activado sumergiéndolo por 5 minutos en HCl 2 N, lavándolo luego con 2 porciones de agua, acetona y benceno sucesivamente.

La reacción comenzó espontáneamente cuando se había agregado aproximadamente un tercio de los reactivos, y la ebullición se mantuvo constante mediante la regulación del flujo de la adición de la mezcla de reactivos y/o por enfriamiento del balón de reacción. El reflujo se mantuvo por 30 minutos y luego de este lapso se enfrió y se adicionaron 120 ml de H_2SO_4 2 N. Se extrajo la fase orgánica, la que se lavó con una solución de $NaHCO_3$ (ss) y agua y se secó finalmente sobre Na_2SO_4 anhidro y se evaporó en rotavapor a presión reducida.

- Síntesis del éster etílico del ácido (2*E*, 4*E*)-2-metil-hexa-2,4-dienoico (Compuesto **21,** figura 119, pág. 166).

El crudo de reacción obtenido en el paso anterior fue reflujado con 35 g de P_2O_5 en sílica gel Kieselgel 60 G- Merck (1:2)[3] en $CHCl_3$ durante 30 minutos. La mezcla fue entonces filtrada y el filtrado lavado con agua y secado sobre Na_2SO_4 anhidro. La fase orgánica fue evaporada a presión reducida brindando 25 g del compuesto **21** con un rendimiento total del 36% .

- Hidrólisis del compuesto **21** para dar el ácido (2*E*, 4*E*)-2-metil-hexa-2,4-dienoico, compuesto **22,** (figura 119, pág. 166).

A una suspensión del compuesto **21** (18 g, 0.11 mol) en *t*-butanol (200 ml) se le adicionaron 1.2 equivalentes de NaOH (4.8 g, 0.13 mol), calentando a reflujo por 1 hora. Al producto crudo obtenido se le realizó una cromatografía flash en columna seca utilizando como solventes de elución un gradiente de polaridad creciente cy/cy:AcOEt (50:50), obteniéndose 10.1 g del compuesto **22** puro en la fracción cy/cy:AcOEt 90:10, con un rendimiento del 73% .

- Obtención de los ésteres metílicos de *N*-Boc-L isoleucina y *N*-Boc-D-a*llo*-isoleucina.

Estos compuestos fueron preparados de acuerdo al procedimiento descripto por Hamada y colaboradores[2] de la siguiente forma: a una suspensión de L-isoleucina (0.50 g) en acetonitrilo seco (33 ml) se le agregó di-*t*-butilcarbonato (0.9 g) y TEA (0.56 ml). La mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante 24 hs y concentrada a presión reducida, dando como producto de reacción 0.850 g de un aceite incoloro, correspondiente al aminoácido *N*-protegido, el cual se utilizó en el siguiente paso sin mayor purificación.

El aminoácido protegido (0.850 g) se disolvió en 5.0 ml de DMF y se agregaron luego 0.70 g de K_2CO_3 pulverizado, seguido de 0.30 ml de ioduro de metilo. La mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante 4-5 hs, después de lo cual se adicionaron 10 ml de agua y se extrajo con acetato de etilo: ciclohexano (1:1) (10 ml x 3). La fase orgánica fue lavada con agua (5 ml x 2), con solución de sulfito de sodio 5% (5 ml x 2) y finalmente con una solución saturada de cloruro de sodio (5 ml). Se secó

la solución con sulfato de sodio anhidro y se evaporó el solvente a presión reducida. Se obtuvieron 0.750 g (82⁄) de producto, que fue utilizado en el siguiente paso sin purificación previa.

Para preparar el éster metílico de *N*-Boc-D-a*llo*-isoleucina, se procedió de igual forma que para *N*-Boc-L-isoleucina, partiendo de 0.50 g de aminoácido D-a*llo*-isoleucina, obteniéndose 0.730 g de producto *N*-protegido. Con toda la masa obtenida se procedió a realizar la metilación obteniéndose finalmente 0.640 g (82⁄) del correspondiente éster.

- Síntesis de los clorhidratos de los ésteres metílicos de L-isoleucina y D-a*llo*-isoleucina (compuestos **23** y **24**) (figura 119, pág. 166).

A una solución de 0.40 g del éster metílico de *N*-Boc-L isoleucina en 5 ml de acetato de etilo seco, se le agregaron 5 ml de una solución saturada de cloruro de hidrógeno en acetato de etilo seco. Luego de 5 hs. de agitación a temperatura ambiente, el producto crudo fue concentrado a presión reducida, obteniéndose 0.30 g (83⁄) del compuesto **23**. Dicho producto fue utilizado tal cual en el siguiente paso.

Para obtener el compuesto **24** se partió de 0.34 g del éster metílico *N*-Boc-D-*allo*-isoleucina y se repitió el procedimiento utilizado en el caso anterior, obteniéndose 0.250 g (98⁄) de producto.

- Síntesis del éster metílico del ácido (2S, 3S)-3 metil-2-[(2'*E*, 4'*E*)-2'-metil-hexa-2',4'-dienoilamino] pentanoico, compuesto **25**, (figura 119, pág. 166).

El producto obtenido **23** fue disuelto en 10 ml de THF junto con 0.19 g del compuesto **22** y 1 equivalente de Py (0.1ml). La mezcla de reacción fue luego enfriada a 0 ºC en un baño de hielo y se le agregaron 0.33 g de DCC. Luego de 30 minutos se dejó que la reacción procediera a temperatura ambiente durante 4 hs. La N,N´-diciclohexilurea formada fue removida por filtración y el filtrado fue evaporado a presión reducida. El producto crudo obtenido fue purificado por medio de cromatografía flash en columna seca utilizando como solventes de elución un gradiente de polaridad creciente ciclohexano/CH_2Cl_2 (1:1) hasta CH_2Cl_2/AcOEt (1:1) obteniéndose 0.20 g (53⁄) del compuesto **25** puro en la fracción eluída con CH_2Cl_2.

- Síntesis del éster metílico del ácido (2R, 3S)-3-metil-2-[(2'*E*, 4'*E*)-2'-metil-hexa-2',4'-dienoilamino] pentanoico, compuesto **26** (figura 119, pág. 166).

El procedimiento empleado para obtener el compuesto **26** fue similar al detallado anteriormente. Se hizo reaccionar el producto **24** con 173 mg de **22**, 1 equivalente de Py (0.1 ml) y 0.30 g de DCC. El producto de reacción fue purificado según la metodología previamente descripta para **25**, obteniéndose 0.15 g (43⁄) del compuesto **26**, en la fracción eluída con CH_2Cl_2

- Síntesis de 2-metil-hexa-2,4-dienamida de L-isoleucinol, compuesto **14** (figura 119, pág. 166).

A una solución del compuesto **25** (0.15 g) disuelto en éter etílico (4 ml) se le agregaron borohidruro de litio (0.030 g) y MeOH (0.05 ml). La mezcla de reacción se reflujó durante 15 minutos. Luego la reacción fue terminada con el agregado de HCl 1 N. El producto obtenido fue extraído con CH_2Cl_2 (3 x 25 ml) y evaporado a presión reducida. El producto crudo fue purificado finalmente por medio de cromatografía flash en columna seca utilizando como solventes de elución una mezcla de polaridad creciente CH_2Cl_2/CH_2Cl_2:AcOEt (1:1), obteniéndose 0.080 g (59⁄) del compuesto **14** puro en la fracción CH_2Cl_2:AcOEt (70/30).

- Síntesis del (2*E*, 4*E*)-2-metil-hexa-2,4-dienamida de D-*allo*-isoleucinol, compuesto **15** (figura 119, pág. 166).

El procedimiento realizado fue similar al del caso anterior, pero partiendo de 0.07 g del compuesto **26**. Luego de purificar el producto crudo por la misma técnica se obtuvieron 0.030 g (44⁄) del compuesto **15** en la fracción CH_2Cl_2:AcOEt (70/30).

- Síntesis de *N-Boc*-L-isoleucinaldehído, compuesto **28** (figura 120, pág. 167).

Se reflujó durante 15 min una solución del aminoácido L-isoleucina protegido con Boc y metilado (0.20 g) en Et_2O (3.5 ml) con $LiBH_4$ (0.028 g) y MeOH (0.05ml). Se volcó el producto obtenido en un baño de hielo con HCl 1 N, obteniéndose después de extraer y evaporar al vacío 0.172 g (99⁄) de

N-Boc-L-isoleucinol, compuesto **27**. Dicho producto se disolvió en CH_2Cl_2 anhidro y fue tratado con 0.242 g de PCC[7] también disuelto en CH_2Cl_2 anhidro durante dos horas a temperatura ambiente. Luego se diluyó la mezcla de reacción con Et_2O anhidro, se filtró y lavó el residuo sólido con el mismo solvente. El filtrado fue evaporado a presión reducida, brindando 0.152 g (88%) de crudo de reacción. Parte del producto obtenido (0.050 g) fue purificado mediante cromatografía en capa delgada preparativa utilizando como solvente de elución una mezcla de CH_2Cl_2/AcOEt (95:5). El compuesto **28** presentó un Rf de 0.6 en este sistema.

- ## Propiedades físicas de los compuestos sintetizados.

Compuesto **20**[3]**:** aceite amarillo; **RMN-^{1}H** ($CDCl_3$): δ 5.72 (m, H-4); 5.47 (m, H-5); 4.16 (m, H-3, C*H*$_2$CH$_3$, señales superpuestas); 3.08 (sa, OH); 2.57, 2.51 (m, H-2$_{a\ y\ b}$); 1.70 (m, H-6); 1.25, 1.26 (t, *J*= 7.0 Hz, CH$_2$*CH*$_{3\ a\ y\ b}$); 1.17, 1.11 (d, *J*= 7.0 Hz, H-7$_{a\ y\ b}$); **RMN-^{13}C**, ver tabla 9.

Posición C	isómero a	isómero b
1	175.3	175.0
2	45.5	45.1
3	74.4	73.1
4	130.5	131.0
5	128.4	127.6
6	17.3	17.3
7	11.6	11.6
C*H*$_2$CH$_3$	60.2	60.2
CH$_2$*CH*$_3$	13.5	13.9

Tabla 9: Datos de RMN- ^{13}C ($CDCl_3$) del compuesto **20**

Compuesto **21:** aceite amarillo; **UV**(CH_2Cl_2) $\lambda_{máx}$ nm (log ε): 236 (3.4); **FTIR:** (KBr) $\nu_{máx}$ cm^{-1}**:** 2981 (CH), 2931 (CH), 1740 (CO), 1455, 1376, 1241, 1177, 1099, 950**; EM- EI** (70 eV) *m/z* (abundancia

relativa): 155 $[M+1]^{+\cdot}$ (30), 154 ($M^{+\cdot}$) (21), 127 (21), 126 (8), 99 (45), 81 (50), 55 (100); **RMN-^{1}H** ($CDCl_3$): δ 7.15 (da, *J*= 11.4 Hz, H-3); 6.36 (ddq, *J* = 15.0, 11.4, 1.6 Hz, H-4); 6.08 (dq, *J*=15.0, 6.8 Hz, H-5); 4.20 (q, *J*= 7.0 Hz, CH_2CH_3); 1.92 (sa, H-7); 1.86 (da, *J* = 6.8 Hz, H-6); 1.29 (t, *J*= 7.0 Hz, CH_2CH_3); **RMN-^{13}C** ($CDCl_3$): δ 168.4 (C-1), 138.2, (C-3), 137.3 (C-5), 127.3 (C-4), 124.8 (C-2), 60.2 (CH_2CH_3), 18.6 (C-6), 14.1 (CH_2CH_3), 12.3 (C-7).

Compuesto **22:** sólido amorfo; **UV**(CH_2Cl_2) $\lambda_{máx}$ nm (log ε): 265 (4.3); **FTIR:** (KBr) $\nu_{máx}$ cm^{-1}**:** 2935 (CH), 2656, 2595, 1689 (CO), 1640, 1612, 1441, 1303, 1270, 969, 940**; EM- EI** (70 eV) *m/z* (abundancia relativa): 126 [$M^{+\cdot}$] (37), 111 (81), 79 (44), 55 (47), 43 (80), 41 (100); **RMN-^{1}H** ($CDCl_3$): δ 7.27 (da, *J*= 11.4 Hz, H-3), 6.38 (ddq, *J* = 15.1, 11.4, 1.8 Hz, H-4), 6.15 (dq, *J*=15.1, 6.7 Hz, H-5), 1.91 (sa, H-7), 1.89 (da, *J* = 6.7 Hz, H-6); **RMN-^{13}C** ($CDCl_3$): δ 173.9 (C-1), 140.9 (C-3), 139.1 (C-5), 127.4 (C-4), 123.9 (C-2), 18.9 (C-6), 12.1 (C-7).

Compuesto **25:** aceite amarillo; **$[\alpha]_D^{25}$**=+9 (c = 2.72, $CHCl_3$); **UV**(CH_2Cl_2) $\lambda_{máx}$ nm (log ε): 244 (4.4); **FTIR:** (KBr) $\nu_{máx}$ cm^{-1}**:** 3320 (NH), 2970 (CH), 2929 (CH), 2860 (CH), 1750 (CO), 1631, 1372, 697**; EM-AR-EI** *m/z:* 253.16899 ($M^{+\cdot}$), (valor calculado para $C_{14}H_{23}NO_3$, 253.16779, Δ 4.7 ppm), 254.17115 ($[M+1]^{+\cdot}$), (valor calculado para $^{13}CC_{13}H_{23}NO_3$, 254.17118, Δ 1.1 ppm); **EM- EI** (70 eV) *m/z* (abundancia relativa): 253 ($M^{+\cdot}$) (9), 238 (4), 224 (4), 144 (14), 128 (12), 109 $[RCO]^+$ (100), 81 (25); **RMN-^{1}H** ($CDCl_3$): δ 6.88 (da, *J*= 11.1 Hz, H-3'), 6.33 (ddq, *J* = 14.9, 11.1, 1.6 Hz, H-4´), 6.24 (da, *J* = 8.4 HZ, N*H*), 6.04 (dq, *J* = 14.9, 7.0 Hz, H-5´), 4.68 (dd, *J* = 8.4, 5.0 Hz, H-2), 3.75 (s, CO_2CH_3), 1.96 (sa, H-7'), 1.94 (m, H-3), 1.86 (da, *J* = 7.0 Hz, H-6´), 1.48 y 1.21 (m, H-4), 0.94 (t, *J* = 7.4 Hz, H-5), 0.92 (d, *J* = 7.0 Hz, H-6); **RMN-^{13}C** ($CDCl_3$): δ 172.8 (C-1), 168.9 (C-1'), 136.4 (C-5'), 134.3 (C-3'), 127.3 (C-2'), 127.0 (C-4'); 56.5 (C-2), 52.0 (CO_2CH_3), 38.2 (C-3), 25.4 (C-4), 18.8 (C-6'), 15.4 (C-6), 12.8 (C-7´), 11.6 (C-5).

Compuesto **26:** aceite amarillo **$[\alpha]_D^{25}$**:-50 (c = 0.49, CH_2Cl_2); **UV**(CH_2Cl_2) $\lambda_{máx}$ nm (log ε): 240 (4.7); **FTIR:** (KBr) $\nu_{máx}$ cm^{-1}**:** 3408 (NH), 2968 (CH), 2920 (CH), 2860 (CH), 1763 (CO), 1669, 1520, 1467**; EM-AR-EI** *m/z* 253.16753 ($M^{+\cdot}$), (valor calculado para $C_{14}H_{23}NO_3$, 253.16779, Δ 1.0 ppm); **EM- EI** (70 eV) *m/z*

(abundancia relativa): 253 ($M^{+\cdot}$) (24), 238 (15), 144 (17), 130 (37), 128 (7), 109 $[RCO]^+$ (100), 86 (50), 81 (24); **RMN-^{1}H** ($CDCl_3$): δ 6.88 (da, *J*= 11.1 Hz, H-3'), 6.33 (ddq, *J* = 14.9, 11.1, 1.6 Hz, H-4´), 6.18 (da, *J* = 8.7 HZ, N*H*), 6.04 (dq, *J* = 14.9, 6.9 Hz, H-5´), 4.80 (dd, *J* = 8.7, 4.1 Hz, H-2), 3.75 (s, CO_2CH_3), 1.96 (sa, H-7'), 1.97 (m, H-3), 1.86 (da, *J* = 6.9 Hz, H-6´), 1.45 y 1.19 (m, H-4), 0.96 (t, *J* = 7.3 Hz, H-5), 0.90 (d, *J* = 6.8 Hz, H-6); **RMN-^{13}C** ($CDCl_3$): δ 173.1 (C-1), 169.1 (C-1'), 136.4 (C-5'), 134.3 (C-3'), 127.3 (C-2'), 127.0 (C-4'), 55.5 (C-2), 52.1 (CO_2CH_3), 38.0 (C-3), 26.3 (C-4), 18.7 (C-6'), 14.7 (C-6), 12.8 (C-7´), 11.7 (C-5).

Compuesto **14:** aceite amarillo; **$[\alpha]_D^{25}$**: +72 (c = 0.37, CH_2Cl_2); **UV**(CH_2Cl_2) $\lambda_{máx}$ nm (log ε): 240 (4.0); **FTIR:** (KBr) $\nu_{máx}$ cm^{-1}**:** 3390 (NH), 2968 (CH), 2939 (CH), 1662, 1539, 1467, 1388, 1085**; EM-AR-EI** *m/z:* 225.17197 ($M^{+\cdot}$), (valor calculado para $C_{13}H_{23}NO_2$, 225.17288, Δ 4.0 ppm); **EM- EI** (70 eV) *m/z* (abundancia relativa): 225 ($M^{+\cdot}$) (5), 210 (1), 195 (3), 194 (12), 126 (11), 109 $[RCO]^+$ (100), 86 (20), 81 (28); **RMN-^{1}H** ($CDCl_3$): δ 6.88 (da, *J*= 10.8 Hz, H-3), 6.33 (ddq, *J* = 14.8, 10.8, 1.5 Hz, H-4), 6.03 (dq, *J* = 14.8, 6.9 Hz, H-5), 6.00 (N*H*), 3.88 (m, H-2´), 3.73 (m, H-1'), 1.95 (sa, H-7), 1.86 (da, *J* = 6.9 Hz, H-6), 1.70 (m, H-3´), 1.50 y 1.22 (m, H-4'), 0.95 (d, *J* = 6.8 Hz, H-6'), 0.91 (t, *J* = 7. Hz, H-5'); **RMN-^{13}C** ($CDCl_3$): δ 170.0 (C-1), 136.4 (C-5), 134.2 (C-3), 127.2 (C-2), 127.0 (C-4), 63.7 (C-1'), 56.2 (C-2'), 35.7 (C-3'), 25.4 (C-4´), 18.7 (C-6), 15.5 (C-6'), 12.7 (C-7), 11.6 (C-5').

Compuesto **15**: aceite amarillo; $[\alpha]_D^{25}$: -45 (c = 0.1, $CHCl_3$); **UV**(CH_2Cl_2) $\lambda_{máx}$ nm (log ε): 236 (3.0); **FTIR:** (KBr) $\nu_{máx}$ cm^{-1}: 3321 (NH), 2932 (CH), 2846 (CH), 1742, 1489, 1380, 1193 **; EM-AR-EI** *m/z* 225.17263 ($M^{+\cdot}$), (valor calculado para $C_{13}H_{23}NO_2$, 225.17288, Δ 1.1 ppm); **EM- EI** (70 eV) *m/z* (abundancia relativa): 225 ($M^{+\cdot}$) (8), 194 (22), 109 $[RCO]^+$ (100), 86 (62); **RMN-^{1}H** ($CDCl_3$): δ 6.90 (da, *J*= 10.8 Hz, H-3), 6.33 (ddq, *J* = 14.8, 10.8, 1.6 Hz, H-4), 6.04 (dq, *J* = 14.8, 6.9 Hz, H-5), 5.90 (da, *J*= 8.0 Hz, N*H*), 4.00 (m, H-2'), 3.69 (m, H-1'), 1.96 (sa, H-7), 1.86 (da, *J* = 6.9 Hz, H-6), 1.70 (m, H-3'), 1.44 y 1.25 (m, H-4'), 0.93 (t, *J* = 7.3 Hz, H-5'), 0.93 (d, *J* = 6.9 Hz, H-6'), **RMN-^{13}C** ($CDCl_3$): δ 170.3 (C-1), 136.3 (C-5), 134.2 (C-3), 127.3 (C-2), 126.9 (C-4), 64.3 (C-1'), 55.3 (C-2'), 35.5 (C-3'), 26.3 (C-4'), 18.7 (C-6), 14.8 (C-6'), 12.8 (C-7), 11.3 (C-5').

Compuesto **28:** aceite amarillo; **$[\alpha]_D^{25}$**: +71 (c = 0.12, CH_2Cl_2); **UV**(CH_2Cl_2) $\lambda_{máx}$ nm (log ε): 234 (3.5); **EM-AR-EI** *m/z*: 215.15258 ($M^{+\cdot}$), (valor calculado para $C_{11}H_{21}NO_3$, 215.15159, Δ -4.6 ppm); **EM- EI**

(70 eV) *m/z* (AR): 215 ($M^{+\cdot}$).(50), 186 (27), 130 (88), 86 (79), 57 (100); **RMN-^{1}H** ($CDCl_3$): δ 9.66 (s, H-1), 5.13 (da, *J* = 8.0 Hz, N*H*), 4.29 (m, H-2), 1.70 (m, H-3), 1.47 (m, H-4), 1.45 (s, $C(CH_3)_3$) ,1.27 (m, H-4), 0.99 (d, *J* = 6.9 Hz, H-6), 0.96 (t, *J* = 7.3 Hz, H-5); **RMN-^{13}C** ($CDCl_3$): δ 200.6 (C-1), 156.9 (N*C*OO), 79.6 $C(CH_3)_3$, 64.2 (C-2), 36.4 (C-3), 28.3 ($C(CH_3)_3$), 25.3 (C-4), 15.6 (C- 6), 11.9 (C-5).

❖ Bibliografía.

1. Klausner, Y., Bodanski, M., Coupling reagents in peptide synthesis. *Synthesis* **1972**, 453-463.
2. Hamada, Y., Shibata, M., Sugiura, T., Kato, S., Shioiri, T., New methods and reagents in organic synthesis. 67. A general synthesis of derivatives of optically pure 2-(1-aminoalkyl)thiazole-4-carboxylic acids. *Journal of Organic Chemistry* **1987,** 52, 1252-1255.
3. Ceroni, M., Séquin, U., Determination of the relative configurations in the side chains of the antibiotics hedamycin and pluramycin A: synthesis and NMR. Data of suitable model compounds. *Helvetica Chimica Acta* **1982,** 65, 302-316.
4. Orgueira, H., Tesis doctoral. Obtención de monómeros asimétricos a partir de productos naturales bifuncionales. Su uso para la síntesis de poliamidas quirales. *Universidad de Buenos Aires,* **1998**.
5. Soai, K., Ookawa, A., Mixed solvents containing methanol as useful reaction media for unique chemoselective reductions with lithium borohydride. *Journal of Organic Chemistry* **1986,** 51, 4000-4005.
6. Klages, F., Fundamentos físicos de la actividad óptica. *Tratado de Química Orgánica.* **1969,** II, 85-87.
7. Corey, E. J., Suggs, J. W., Pyridinium chlorochromate. An efficient reagent for oxidation of primary and secondary alcohols to carbonyl compounds. *Tetrahedron Letters* **1975,** 31, 2647-2650.
8. Kennedy, T. C., Webb, G., Cannell, R., J. P., Kinsman, O. S., Middletton, R. F., Sidebottom, P. J., Taylor, N. L., Dawson, M. J., Buss, A. D., Novel inhibitors of fungal protein synthesis produced by a strain of *Graphium putredinis*. Isolation, characterization and biological properties. *Journal of Antibiotics* **1998,** 51, 1012-1018.
9. Proksa, B., Adamcová, J., Fuska, J., 2- Methilsorbic acid, an antifungal metabolite of *Penicillium vermiculatum. Applied Microbiology and Biotechnology* **1992,** 37, 443-445.
10. Homans, A. F., Fuchs, A., Direct bioautography on thin-layer chromatography as a method for detecting fungitoxic substances. *Journal of Chromatography* **1970,** 51, 325-328.
11. Gallardo, G. L., Butler, M., Gallo, M. L., Rodríguez, M. A., Eberlin, M. N., Cabrera, G. M., Antimicrobial metabolites produced by an intertidal *Acremonium furcatum*. *Phytochemistry* **2006,** 67, 2403-2410.

Capítulo 8

Detalles experimentales generales

❖ 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 con arreglo de diodos Hewlett-Packard 8451A (FOMEC) para los compuestos aislados de *Alternaria brassicicola* y *Alternaria raphani* y con un espectrofotómetro Hewlett-Packard 8453 (UMYMFOR-DQO) con arreglo de diodos para el resto de los compuestos presentados, utilizando los solventes y concentraciones que se señalan en cada caso.

EL espectro de dicroísmo circular del compuesto **5** fue medido utilizando un espectropolarímetro J-815 de Jasco (UMYMFOR-DQO), con una celda de 0.3 ml.

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 CI (NH_3)-EM de alta precisión fueron realizados con un equipo de doble enfoque VG 7070, UCR Mass Spectrometry Facility, Universidad de California Riverside, EE. UU.

Los espectros de EM de alta precisión con fuente dual ESI-APCI fueron realizados en un equipo Micromass Ultima Global QTOF high resolution mass spectrometer, Universidad de California Riverside, EE. UU, y con fuente ESI dedicada en un equipo Bruker MicroTOF QII, (Billerica, USA), (UMYMFOR FCEN, UBA).

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), (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}).
- Alúmina 60 neutra preparadas sobre hojas de aluminio (Merck), espesor 0.2 mm, 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 con $FeCl_3$/H_2SO_4 (c) y posterior calentamiento en estufa a 110˚C[4].

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[5]

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 flash en columna

Se usó como adsorbente sílicagel 60 (Merck, 230-400 mesh). Fueron realizadas aplicando presión utilizando aire comprimido.

e) Cromatografía en geles de Sephadex

Se utilizó Sephadex LH-20 (Sigma, Inc), en columnas de diferentes tamaños, de acuerdo con la cantidad de muestra a sembrar, con MeOH como solvente de armado y eluyente.

f) 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.

g) Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Se utilizaron dos cromatógrafos líquidos, el primero 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 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) acoplada a una precolumna YMC RP C-18 (50 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 Riedel de Haën) 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)

h) Extracción en fase sólida

Se utilizaron cartuchos SPE-RP C-18 de 6 ml (Silicycle), y de 3 ml (Supelco).

Se utilizó Amberlite XAD-16 (Sigma).

❖ Aislamiento de los hongos provenientes de polen de colmenas.

Las cepas fúngicas con las que se trabajó en los capítulos 2 a 5 fueron aisladas de polen colectado de colmenas del apiario de la unidad integrada INTA de la ciudad de Balcarce, provincia de Buenos Aires, perteneciente a la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de Mar del Plata, Argentina. El polen fue diluido con solución fisiológica estéril y sembrado sobre cajas de Petri con medio agar malta, aislándose luego colonias individuales de las diferentes especies. Las cepas fueron aisladas y clasificadas por la Dra. Nora Peña.

La cepa del hongo DSE estudiada fue aislada por la Dra. Alejandra Rodríguez (Laboratorio de Microbiología del suelo, DBBE, FCEN, UBA) de raíces de cultivos de soja[6].

Todas las cepas se mantuvieron por repique cada 45 días aproximadamente y fueron preservadas en tubos con agar malta con glicerol[7]. 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[8].
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 los métodos de dilución y difusión en agar[8].
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.
El método de dilución[8] fue realizado en los laboratorios del INTA Balcarce.

c) Para determinar la actividad antifúngica se empleó el método de bioautografía directa sobre placas de ccd[9], 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 25μg/punto.

❖ 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).