

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



“Hemisíntesis de compuestos híbridos, tipo ergosta-[2,3;b]-1H-indol, a partir de metabolitos secundarios esteroidales provenientes de macrohongos y su potencial actividad antimicrobiana”

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de
Doctor en Química por:

MITCHELL ENRIQUE BACHO LEMUS

Directores de Tesis: Dr. Aurelio San Martín B.
Dr. José Becerra A.

Santiago-CHILE

Agosto-2021

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Dirección de la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

MITCHELL ENRIQUE BACHO LEMUS

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Doctorado en Química, en el examen público rendido el día

Director de Tesis:

Dr. Aurelio San-Martín B.

Co-director de Tesis:

Dr. José Becerra A.

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dra. Cecilia Rojas G.

Dra. Carla Delporte V.

Dr. Víctor Fajardo M.

**Dedicado a mis padres, a mi familia,
mis amigos y colegas, especialmente,
a los que ya no están.**

Agradecimientos

A mi querido y estimado director de tesis Dr. Aurelio San-Martín Barrientos. Por todos los momentos, conversaciones y aprendizajes durante su tutela. Gracias por creer en mis locuras.

A mi segundo director de tesis, Dr. José Becerra Allende. Por los momentos, conversaciones y con el cálido recibimiento durante los múltiples viajes a Concepción.

A la comisión examinadora, por sus sabios consejos, cooperación y, por sobre todo, apoyo en esta tesis. Gracias Dra. Cecilia Rojas, Dra. Carla Delporte y Dr. Víctor Fajardo por cada consejo brindado.

A los colegas y amigos que conocí en UNAB, agradezco a ustedes su amistad y confianza brindada.

A mis padres, por el apoyo brindado durante estos años a pesar de la distancia en la que nos encontramos. A mi familia por todo lo que han hecho por mí y a los que ya no están con nosotros, a mi viejo y la lala. Los amo mucho a todos.

A mi compañera de aventuras como también en la química, Dra. Vania Artigas. Agradezco el apoyo incondicional entregado hacia mí. Te amo mucho.

A mi segunda familia, Artigas Salinas, que de muchas formas me ha apoyado durante este tiempo. Siempre estaré agradecidos con ustedes.

A mi pequeña Constanza, que ha sido mi pilar fundamental y me ha motivado a seguir adelante.

A todos los que han impactado mi vida de una manera. A mis amigos de Copiapó, a Patricio Romero, Raúl Chavez, María Inés Polanco y todas las personas que conocí durante mi paso por la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

Financiamiento:

Esta tesis de doctorado se realizó en el laboratorio de productos naturales, departamento de química, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile y contó con el financiamiento de los siguientes proyectos y becas:

Beca de Formación de Capital Humano Avanzado de CONICYT para la realización de estudios de doctorado nacional N° 21110474

Investigador responsable: Mitchell Bacho Lemus.

Proyecto FONDECYT N° 1110656

Investigador responsable: Dr. José Becerra Allende.

Proyecto FONDECYT N° 1120199

Investigador responsable: Dr. Aurelio San-Martín Barrientos.

Índice

Índice de figuras.	4
Índice de tablas.	9
Glosario de términos y abreviaturas usadas.	10
RESUMEN.	14
SUMMARY.	17
1 Introducción.	20
1.1 Organismos como fuente de compuestos bioactivos.	23
1.2 Características físicas de los hongos estudiados.	25
1.2.1 <i>Cortinarius magellanicus</i> Speg.	25
1.2.2 <i>Suillus granulatus</i> Roussel.	25
1.3 Metabolismo involucrado en la generación de metabolitos secundarios.	26
1.3.1 Metabolismo primario.	27
1.3.2 Metabolismo secundario.	28
1.4 Rutas biosintéticas involucradas en la generación de metabolitos secundarios.	30
1.4.1 Ruta biosintética involucrada en la formación de esteroides en hongos.	32
1.5 Estudios fitoquímicos asociados a los macrohongos estudiados: Metabolitos secundarios aislados desde la familia Cortinariaceae.	35
1.6 Metabolitos secundarios aislados desde la familia Suillaceae y Boletaceae.	36
1.7 Propiedades farmacológicas de los metabolitos secundarios descritos.	37
1.8 El problema de la resistencia antimicrobiana.	39
1.9 Metabolitos secundarios como fuente de medicamentos.	40
1.10 Anatomía básica de la célula bacteriana.	42
1.11 Mecanismo de acción de los antibióticos.	43
1.11.1 Inhibidores de la síntesis de la pared celular.	44
1.11.2 Inhibidores de la síntesis de proteínas.	47
1.11.3 Inhibidores de la replicación del ADN.	48
1.12 Metabolitos esteroidales como compuestos antimicrobianos.	49
Hipótesis de la investigación.	60
Objetivos de la investigación.	60
Objetivo general.	60
Objetivos específicos.	60
2 Parte experimental.	61

2.1	Aislamiento de metabolitos secundarios provenientes del cuerpo fructífero de <i>Cortinarius magellanicus</i> .	62
2.2	Acetilación de metabolitos secundarios polares.	64
2.3	Aislamiento de metabolitos secundarios provenientes del cuerpo fructífero de <i>Suillus granulatus</i> .	68
2.4	Oxidación de ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol utilizando clorocromato de piridinio.	71
2.5	Síntesis de 6-alcoxi ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-onas.	74
2.6	Reducción de nitroarenos a sus respectivas anilinas.	76
2.7	Síntesis de clorhidratos de hidracina a partir de las respectivas anilinas sustituidas.	77
2.8	Síntesis de ergosta-[2,3; <i>b</i>]-1 <i>H</i> -indol mediante la síntesis de Fischer.	77
2.9	Síntesis de 3-metil-1 <i>H</i> -indol.	77
2.10	Síntesis de ergosta-[2,3; <i>b</i>]-1 <i>H</i> -indol utilizando la síntesis de Fischer.	78
2.11	Evaluación de la actividad antimicrobiana de los compuestos frente a bacterias Gram positivas y negativas.	80
2.11.1	Preparación y cultivo de los microorganismos.	81
2.11.1.1	Preparación de estándares de turbidez de McFarland.	81
2.11.1.2	Cultivo de los microorganismos.	81
2.11.1.3	Inoculación de los microorganismos.	82
2.11.1.3.1	Preparación del medio sólido de cultivo.	82
2.11.1.3.2	Inoculación de las placas.	82
2.11.1.3.3	Aplicación de los compuestos con potencial actividad antimicrobiana.	84
2.11.4	Ensayo de difusión en disco.	84
2.11.5	Determinación de la concentración mínima inhibitoria.	85
2.12	Análisis estadístico.	85
3	Resultados y discusión.	86
3.1	Obtención de metabolitos secundarios de macrohongos estudiados.	86
3.1.1	Recolección de los especímenes a estudiar.	86
3.1.2	Obtención de los extractos.	86
3.1.3	Purificación de metabolitos secundarios principales desde el cuerpo fructífero de <i>S. granulatus</i> .	87
3.1.3.1	Caracterización estructural de los metabolitos secundarios aislados desde <i>S. granulatus</i> .	88
3.1.4	Purificación de metabolitos secundarios mayoritarios desde el cuerpo fructífero de <i>S. granulatus</i> y <i>C. magellanicus</i> .	91

3.1.4.1	Caracterización estructural de CM 1, CM 2 y CM 3 aislados desde <i>C. magellanicus</i> .	93
3.2	Hemisíntesis de ergosta-3-onas derivados a partir de ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol.	102
3.3	Oxidación de ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol en condiciones no severas.	104
3.3.1	Elucidación estructural de ergosta-3-onas.	105
3.3.2	Mecanismo propuesto para la oxidación de CM 1 a sus respectivas ergosta-3-onas.	110
3.4	Formación de enoletes a partir de 5 α -hidroxiergosta-7,22-dien-3,6-diona.	111
3.4.1	Caracterización estructural de 6-alcoxiergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona.	112
3.4.2	Mecanismo propuesto para la obtención de 6-alcoxiergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-onas derivados a partir de 5 α -hidroxiergosta-7,22-dien-3,6-diona.	115
3.5	Reducción de nitro arenos a sus correspondientes anilinas.	118
3.5.1	Caracterización de las anilinas obtenidas.	119
3.5.2	Obtención de clorhidratos de hidracina	120
3.5.3	Caracterización de los clorhidratos de arilhidracina obtenidos.	120
3.5.4	Obtención de ergosta-1 <i>H</i> -indoles utilizando la síntesis de Fischer.	121
3.5.4.1	Caracterización estructural de ergosta-[2,3; <i>b</i>]-1 <i>H</i> -indol.	122
3.5.4.2	Mecanismo propuesto para la síntesis de ergosta-4,6,8(14),22-tetraen[2,3; <i>b</i>]-1 <i>H</i> -indol.	125
3.5.4.3	Caracterización estructural de 3-metil-1 <i>H</i> -indol.	127
3.6	Evaluación de la actividad antimicrobiana de los compuestos frente a bacterias Gram positivas y negativas.	128
3.6.1	Ensayo de difusión en disco.	128
3.6.2	Susceptibilidad antimicrobiana para CM 1 y OX 1-3.	128
3.6.3	Susceptibilidad antimicrobiana para OX 2 e In 0-3.	132
3.6.4	Susceptibilidad antimicrobiana para OX 4 y OX 6-7.	137
3.6.5	Comparación y discusión de la susceptibilidad antimicrobiana de CM 1, OX 1-7 e In 0-3 frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.	140
3.7	Determinación de la concentración mínima inhibitoria para OX 7.	149
3.8	Relación estructura/actividad de los derivados esteroidales.	150
4	Conclusiones.	153
	REFERENCIAS.	155
	ANEXOS.	163

Índice de figuras.

Figura 1. Aspirina (A), digitoxina (B), morfina (C), quinina (D), pilocarpina (E), eritromicina (F), estreptomicina (G), cloranfenicol (H), clortetraciclina (I) y cefalosporina (J) como compuestos bioactivos aislados desde distintas fuentes naturales.

Figura 2. Secciones principales que componen un hongo filamentoso.

Figura 3. Beneficios y efectos desfavorables que poseen los hongos.

Figura 4. Imágenes del carpóforo de *C. magellanicus* y *S. granulatus*.

Figura 5. Curva de crecimiento o fases del crecimiento en hongos.

Figura 6. Rutas biosintéticas centrales en hongos.

Figura 7. Penicilina (K), cefalosporina (L), griseofulvina (M), ácido giberélico (N), y ciclosporina (Ñ) como MS.

Figura 8. Biosíntesis general para la generación de ácidos orgánicos por la ruta de policétidos

Figura 9. Zearalenona (O), aflatoxina G1 (P), ocratoxina A (Q) y patulina (R) como MS producidos por la ruta de los policétidos

Figura 10. Formación de pirofosfato de isopentilo (IPP) mediante la formación de mevalonato-PP.

Figura 11. Tricotecenos (S) y T-2 (T) aisladas desde *Fusarium sp.*

Figura 12. Reacción de la preniltransferasa y formación de pirofosfato de farnesilo (FPP).

Figura 13. Mecanismo biosintético de formación de escualeno mediante acoplamiento de FPP.

Figura 14. Etapas biosintéticas para la producción de ergosterol a partir de escualeno.

Figura 15. 1*H*-indol (U), β -carbolinas (V), quinolinas (W) e isoquinolinas (Y) aisladas desde el cuerpo fructífero de hongos pertenecientes al género *Cortinarius*.

Figura 16. Antraquinonas monoméricas (X), diméricas (Z) y tetraméricas (AA) aisladas desde hongos pertenecientes al género *Cortinarius*.

Figura 17. Ergosterol (AB), cerevisterol (AC), peróxido de ergosterol (AD) y ergona (AE) como MS aislados desde el cuerpo fructífero de algunos *Cortinarius*.

Figura 18. Meroterpenoides aislados desde el cuerpo fructífero de hongos del género *Suillus*.

Figura 19. Compuestos fenólicos aislados desde miembros de Suillaceae.

Figura 20. β -carbolinas aisladas desde miembros pertenecientes a la familia Suillaceae.

Figura 21. Estimación de las muertes por RAM al 2050

Figura 22. A) Porcentaje de medicamentos antimicrobianos según estructura. B) Porcentaje de medicamentos antimicrobianos según fuente de obtención.

Figura 23. Morfología de las distintas bacterias.

Figura 24. Constituyentes de la estructura de la pared celular para bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.

Figura 25. Mecanismos de acción de compuestos antibióticos.

Figura 26. Monómero de la subunidad pentapéptida del disacárido N-acetilmurámico- β -1 \rightarrow 4-N-acetilglucosamina (AF) que compone el peptidoglicano.

Figura 27. Tienamicina (AF), aztreonam (AG) y cefalosporina C (AH) como β -lactamas inhibidoras de la síntesis de la pared celular.

Figura 28. Mecanismo de inhibición para β -lactamas.

Figura 29. Complejo PBP-vancomicina.

Figura 30. Ribosoma 70S de *E. coli* mostrando la síntesis de proteínas.

Figura 31. Anfenicoles (AI), macrólidos (AJ) y oxazolidinas (AK) como inhibidores de la síntesis de proteínas.

Figura 32. Etapas en la inhibición de la replicación del ADN.

Figura 33. Levofloxacino (AL) y metronitrazole (AM) como inhibidores de la replicación del ADN.

Figura 34. 7-aminocolesterol (AN), ácido fusídico (AO) y escualamina (AP) como agentes antimicrobianos

Figura 35. Cambios morfológicos de las cepas de referencia de *S. aureus* ATCC 25923 (a) y *P. aeruginosa* ATCC 27853 (b) después de la exposición a colistina o escualamina. TA, ácido teicoico; LA, ácido lipoteicoico; LPS, Lipopolisacárido; PG, peptidoglicano; CM, membrana citoplasmática; OM, membrana externa.

Figura 36. Estructuras para colesterol (AQ), ergosterol (AR) y colecalciferol (AS).

Figura 37. A) Estructura básica de un glicerofosfolípido (AT), compuestos por dos ácidos grasos, R₂ y R₃, una unidad de glicerol central, un grupo fosfato y una cabeza polar variable, R₁. B) Estructura de la fosfatidiletanolamina (AU) como fosfolípido en su forma zwitteriónica.

Figura 38. Comportamiento de fase de las membranas lipídicas y efecto del colesterol.

Figura 39. Proceso de aplicación del inóculo sobre la placa Petri para el ensayo de susceptibilidad antimicrobiana.

Figura 40. Etapas desarrolladas para determinar la susceptibilidad antimicrobiana de los compuestos sintetizados.

Figura 41. Etapas de la purificación de los MS de *S. granulatus*.

Figura 42. A) Estructura de SG-3. B) Acoplamientos observados: H-H COSY, en azul, y NOESY en rojo.

Figura 43. Diagrama de purificación de los principales MS proveniente de *C. magellanicus*.

Figura 44. Esteroide tetracíclico común que contiene el esqueleto del anillo 1,2 ciclopentanoperhidrofenantreno.

Figura 45. A) Principales correlaciones H-C HMBC observadas para CM 1. B) Estructura propuesta para CM 1.

Figura 46. Síntesis espontánea de ergosta-5,8-epidioxi-6,22-dien-3 β -ol a partir de ergosterol.

Figura 47. Fragmentación observada para CM 3 utilizando TOF-MS a 7,4 eV.

Figura 48. Fragmentación observada para CM 4 utilizando EM-IE.

Figura 49. Efecto NOE percibido para CM 5.

Figura 50. Patrón de fragmentación observado para CM 5.

Figura 51. Patrón de fragmentación observado para CM 7.

Figura 52. Patrón de fragmentación observado para CM 8.

Figura 53. Esquema sintético general para la obtención de híbridos ergosta-[2,3;*b*]-1*H*-indol a partir de ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol.

Figura 54. Condiciones de reacción empleadas para la oxidación de ergosterol utilizando PCC a 0°C.

Figura 55. Estructura propuesta para OX 1.

Figura 56. Estructura propuesta para OX 2.

Figura 57. Estructura propuesta para OX 3.

Figura 58. Formación de *A*-norergosta-2,5,7,22-tetraen-2-carbaldehído mediante condensación aldólica en medio ácido.

Figura 59. Estructura propuesta para OX 4.

Figura 60. Estructura propuesta para OX 5.

Figura 61. Mecanismo propuesto para la formación de ergosta-3-onas utilizando PCC.

Figura 62. Síntesis de enoléteres mediante catálisis ácida alcohólica.

Figura 63. A) Estructura propuesta para OX 6. B) Acoplamientos H-C HMBC observados para los alquenos presentes en OX 6.

Figura 64. Estructura propuesta para OX 7.

Figura 65. Diagrama ORTEP para **OX 7** con elipsoides térmicos dibujados al 30% de probabilidad.

Figura 66. Mecanismo de reacción propuesto para la formación de 6-alcoxi-ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-onas.

Figura 67. Reducción de nitrobenzeno derivados utilizando Zn/NH₄Cl en medio acuoso.

Figura 68. Etapas sintéticas involucradas en la formación de los clorhidratos de hidracina.

Figura 69. Esquema sintético general para la obtención de ergosta-5,7,22-trien[2,3;*b*]-1*H*-indol utilizando la indolización de Fischer.

Figura 70. Numeración asignada para los ergosta-[2,3;*b*]-1*H*-indol derivados.

Figura 71. Estructura propuesta para ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-[2,3;*b*]-1*H*-indol (In 1).

Figura 72. Estructura propuesta para ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-[2,3;*b*]-5-ciano-1*H*-indol (In 2).

Figura 73. Estructura propuesta para ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-[2,3;*b*]-5-bromo-1*H*-indol (In 3).

Figura 74. Mecanismo propuesto para la formación de los ergosta-1*H*-indol.

Figura 75. Esquema sintético para la obtención de 3-metil-1*H*-indol a partir de 2-propanona/etanal utilizando la indolización de Fischer.

Figura 76. Halo de inhibición promedio observado para **CM 1** y **OX 1-3** frente a las bacterias estudiadas.

Figura 77. Diferencias significativas observadas, para **CM 1** y **OX 1-3**, mediante el análisis ANOVA en una vía.

Figura 78. Halo de inhibición promedio observado, para **OX 2** e **In 0-3**, frente a las bacterias estudiadas.

Figura 79. Diferencias significativas observadas, para **OX 2** e **In 0-3**, mediante el análisis ANOVA en una vía para las bacterias estudiadas.

Figura 80. Halo de inhibición promedio observado, para **OX 5-7**, frente a las bacterias estudiadas.

Figura 81. Diferencias significativas observadas, para **OX 4 - 7**, mediante el análisis ANOVA en una vía para las bacterias estudiadas.

Figura 82. Cuatro dominios asociados al anillo ciclopentanoperhidrofenantreno.

Figura 83. 4-aminocolesterol, ácido fusídico y escualamina como agentes antimicrobianos.

Figura 84. A) Estructura de la amfotericina B (**AmB**). **B)** Modelo de canales iónicos en que la amfotericina B se une, por interacciones de vdW, con ergosterol.

Figura 85. Colesterol y colestalciferol como agentes sinérgicos antimicrobianos.

Figura 86. Interacciones lípido-colesterol. En la membrana plasmática, el colesterol (Chol) puede interactuar con la fosfatidilcolina, por ejemplo, palmitoil-oleil-fosfatidilcolina (POPC) o esfingolípidos como la esfingomielina (SM).

Figura 87. A) Identificación de la zona hidrofílica e hidrofóbica encontradas en las principales ergosta-3-onas como las ergosta-[2,3;*b*]-1*H*-indol. B) Principal interacción propuesta para bacterias Gram-positivas. C) Principal interacción propuesta para los compuestos hemisintetizados frente a bacterias Gram-positivas.

Figura 88. Relaciones estructurales observadas, al modificar sintéticamente ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol, en términos de la actividad antimicrobiana obtenida.

Índice de tablas.

Tabla 1. gIC₅₀ para distintas bacterias, en presencia de 7-aminocolesterol.

Tabla 2. Actividad antibacterial de ácido fusídico y su análogo hidrogenado expresado como zona de inhibición.

Tabla 3. Actividad antimicrobiana expresada como CMI y CMB.

Tabla 4. Espectro antimicrobiano de la escualamina y moléculas relacionadas.

Tabla 5. Actividad moduladora de antibióticos aminoglucósidos asociados con colesterol, colecalciferol y ergosterol.

Tabla 6. Cantidad de extracto obtenido para los hongos estudiados.

Tabla 7. Porcentaje de rendimiento asociado a la formación de ergosta-3-onas y 6-alcoxi-ergosta-3-ona.

Tabla 8. Rendimiento porcentual de las anilinas obtenidas a partir de la reducción.

Tabla 9. Rendimientos porcentuales obtenidos al generar los clorhidratos de hidracina empleadas.

Tabla 10. Halo de inhibición observado, en términos del $\bar{X} \pm DS$, para los compuestos **CM-1** y **OX 1-3** mediante el uso del método de difusión en disco.

Tabla 11. Halo de inhibición observado, en términos del $\bar{X} \pm DS$, para los compuestos **OX 2** e **In 0-3** mediante el uso del método de difusión en disco.

Tabla 12. Halo de inhibición observado, en términos del $\bar{X} \pm DS$, para los compuestos **OX 4-6-7** mediante el uso del método de difusión en disco.

Tabla 13. Concentración mínima inhibitoria para 6-etoxi-ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona sobre bacterias Gram-positivas.

Glosario de términos y abreviaturas usadas.

Abreviación	Significado
$(\text{CH}_3)_2\text{CO}$	Acetona
1D	Una dimensión
2D	Dos dimensiones
ac.	Antes de Cristo
Acetil-CoA	Acetil co enzima A
AChE	Acetilcolinesterasa
ACI	Aislamiento cromatográfico acelerado
AcOEt	Acetato de etilo
AcOH	Ácido acético
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATCC	American Type Culture Collection
C	Carbono cuaternario
C_6H_{14}	Hexanos
CDCl_3	Deuterocloroformo
CH	Metino
CH_2	Metileno
CH_2Cl_2	Diclorometano
CH_3	Metilo
COSY	Espectroscopía de correlación
<i>d</i>	Doblete
Δ^2 IPP	Pirofosfato de dimetilalilo
D_2O	Óxido de deuterio
Δ^3 IPP	Pirofosfato de isopentilo
δ	Desplazamiento químico de carbono
<i>dd</i>	Doble de dobletes
Dept	Mejoramiento sin distorsión por transferencia de polarización
δ_{H}	Desplazamiento químico de hidrogeno

DMSO	Dimetilsulfóxido
DOXP	1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato
E1	Eliminación unimolecular
FPP	Pirofosfato de farnesilo
FT	Transformada de fourier
GPP	Pirofosfato de geranilo
HCl	Ácido clorhídrico
HMBC	Correlación de enlace múltiple heteronuclear
HSQC	Coherencia heteronuclear cuántica simple
ID ₅₀	Dosis infecciosa del 50%.
I+D	Investigación y desarrollo
IC ₅₀	Concentración inhibitoria media máxima
IPP	Pirofosfato de isopentilo
IR	Infrarojo
J	Constante de acoplamiento
L	Litro
LH	Lipofílico e hidrofílico
<i>m</i>	Multiplete
m/z	Relación masa carga
M ⁺	Ión molecular
MALDI	Desorción/ionización mediante láser asistida por matriz
malonil-CoA	Malonil co-enzima A
ME	Membrana externa
MeOH	Metanol
MEP	2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato
mevalonato-PP	Pirofosfato de mevalonatoilo
mL	Mililitro
Mo-K α	Unidad X del molibdeno
MP	Metabolito primario
MS	Metabolito secundario
MS	Espectroscopía de masas

MVA	Ácido mevalónico
NaHCO ₃	Bicarbonato de sodio
NaOAc	Acetato de sodio
NIST	Instituto Nacional de Estándares y Tecnología
nm	Nanometro
NMO	N-óxido de la N-metilmorfolina
NOESY	Espectroscopia de mejoramiento nuclear de Overhauser
OC	Oxidoescualeno ciclasa
ORTEP	Oak ridge thermal ellipsoid plot
PBP	Proteínas fijadoras de penicilina
PCC	Clorocromato de piridinio
PDC	Dicromato de Piridinio
PN	Producto natural
PPi	Anión pirofosfato
ppm	Partes por millón
PSPP	Pirofosfato de precualeno
p-TsOH	Ácido p-toluensulfónico
Py	Piridina
RAM	Resistencia a los antimicrobianos
RMN	Resonancia magnética nuclear
RMN ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
RMN ¹ H	Resonancia magnética nuclear de protones
RNP	Ribonucleoproteína
RP-18	Fase reversa C-18
s	Singlete
sa	Singlete ancho
SM	Escualeno monooxigenasa
SnCl ₂ •2H ₂ O	Cloruro de estaño dihidratado
sp.	Species
<i>t</i>	Triplete
TEMPO	N-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina

TLC	Cromatografía en capa fina
TM	Tamiz molecular
TOF	Tiempo de vuelo
TPAP	Perrutenato de tetrapropilamonio
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
WHO	World health organization

RESUMEN.

En la presente tesis se describe el estudio fitoquímico, de hongos encontrados en nuestro país, y que se encuentra directamente relacionado con el aislamiento, caracterización, derivatización de metabolitos secundarios esteroidales a compuestos híbridos tipo ergosta-[2,3;*b*]-1*H*-indol como moléculas bioactivas con potenciales propiedades antimicrobianas sobre bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.

A partir de la presente, se obtuvieron tres series de compuestos, donde las primeras dos familias corresponden a esteroides del tipo ergostano y derivados de este funcionalizados como cetonas en el carbono 3, mientras que la última corresponde a la generación de híbridos del tipo ergosta-[2,3;*b*]-1*H*-indol. El aislamiento y caracterización, desde los extractos de *Cortinarius magellanicus* y *Suillus granulatus*, posibilitó la identificación de tres grupos de compuestos: sacáridos, meroterpenoides y esteroides del tipo ergostano. Siendo ergosterol, ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol, el metabolito secundario mayoritario, se procedió a generar una ruta sintética capaz de generar moléculas que contengan, en su estructura, la sección esteroideal como el fragmento 1*H*-indol. La primera serie contempla la utilización de agentes oxidantes suaves para la derivatización de ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol a sus respectivas ergosta-3-ona mediante la utilización de clorocromato de piridinio. Del proceso se obtuvieron cinco derivados esteroidales: Ergosta-5,22-dien-3-ona, ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona, *A*-Norergosta-2,5,7,22-tetraen-2-carbaldehído, 5 α -hidroxi-ergosta-7,22-dien-3,6-diona y ergosta-4,7,22-dien-3,6-diona, de los cuales, *A*-Norergosta-2,5,7,22-tetraen-2-carbaldehído no ha sido aislado previamente. A partir del compuesto hemisintetizado con mayor rendimiento, 5 α -hidroxi-ergosta-7,22-dien-3,6-diona, se procedió a generar derivados utilizando, como condiciones de reacción, catálisis ácida alcohólica variando la cadena de los alcoholes. A través de ello, fue posible la formación de dos nuevos compuestos semi-

sintéticos: 6-metoxi-ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona y 6-etoxi-ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona. La derivatización de estos esteroides, a su estructura fundamental ergosta-3-ona, permitió la construcción de la unidad heterocíclica 1*H*-indol utilizando la reacción de Fischer a partir de fenilhidrazinas C4 sustituidas. Esta derivatización generó tres nuevos compuestos semisintéticos: ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-[2,3;*b*]-1*H*-indol, ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-[2,3;*b*]-5-ciano-1*H*-indol y ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-[2,3;*b*]-5-bromo-1*H*-indol.

La generación de estos análogos semi-naturales permitió la realización de ensayos *in vitro* que relacionaron la susceptibilidad o resistencia antimicrobiana, sobre bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. De la primera serie, ergosta-5,22-dien-3-ona presentó el mayor halo de inhibición promedio, en un rango de $13,33 \pm 0,58$ mm, frente a las otras ergosta-3-onas. Esta diferencia se atribuyó a la rigidez que presentan los anillos A-B de estos últimos compuestos, que en ergosta-5,22-dien-3-ona no se observa. La selectividad observada, sobre bacterias Gram-positivas, se explica por la naturaleza de la pared celular que presentan dichos organismos, y que, debido a la naturaleza anfipática de las ergosta-3-onas, genera un incremento en la actividad antimicrobiana respecto a la nula actividad que se ha descrito para ergosterol. La introducción de grupos dadores de electrones, en el anillo B, permitió que 6-metoxi-ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona y 6-etoxi-ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona ampliarán su rango de acción, es decir, actuar sobre bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, con valores de inhibición superiores que los análogos de la primera serie. Respecto a esto último, siendo 6-etoxi-ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona el análogo que mostró el mayor halo de inhibición, la evaluación de la concentración inhibitoria mínima de frente a *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus mutans* arrojó valores de 200 y 160 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Estos valores representan una concentración inhibitoria mínima 4 a 5 veces menores que el informado para ergosterol, el cual, no tuvo efecto con las bacterias ensayadas a una

concentración de 300 $\mu\text{g/mL}$. Esta diferencia muestra un mayor efecto anfipático respecto al metabolito secundario precursor. Para los híbridos, se obtuvieron valores de halo de inhibición entre un 30 a un 75% mayores sobre lo percibido a su precursor ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona. Al igual que la serie uno, solo fueron selectivos sobre bacterias Gram-positivas.

En términos generales, el incremento de la inhibición bacteriana, sobre los análogos de ergosterol, depende principalmente de la posición que adquieren los sustituyentes sobre el anillo A y B. La introducción del grupo 1*H*-indol en C2-C3, la construcción de enoleteres en C6 y la variación en el número de alquenos en C4-C6-C8(C14), en los anillos A y B, posibilitó el incremento de la magnitud del halo de inhibición observada respecto a ergosterol como precursor.

SUMMARY.

This thesis describes the phytochemical study of fungi found in our country and which is directly related to the isolation, characterization, derivatization of steroidal secondary metabolites to ergosta-type hybrid compounds like ergosta-[2,3;*b*]-1*H*-indole such as bioactive molecules with potential antimicrobial properties on Gram-positive and Gram-negative bacteria.

From the present, three series of compounds were obtained, where the first two families correspond to steroids of the ergostane type and derivatives thereof functionalized as ketones in C3, while the last one corresponds to the generation of hybrids of the ergosta-[2,3;*b*]-1*H*-indole type. The isolation and characterization, from the extracts of *Cortinarius magellanicus* and *Suillus granulatus*, allowed the identification of three groups of compounds: saccharides, meroterpenoids and sterols of the ergostane type. Being ergosterol, ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol, the major secondary metabolite, we proceeded to generate a synthetic route capable of generating molecules that contain, in their structure, the steroid section as the 1*H*-indole fragment. The first series contemplates the use of mild oxidizing agents, for the derivatization of ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol to their respective ergosta-3-one, through the use of pyridinium chlorochromate. Five steroidal derivatives were obtained from the process: ergosta-5,22-dien-3-one (OX 1), ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one (OX 2), *A*-norergosta-2,5,7,22-tetraen-2-carbaldehyde (OX 3), 5 α -hydroxy-ergosta-7,22-dien-3,6-dione (OX 4) and ergosta-4,7,22-dien-3,6-dione (OX 5), of which *A*-Norergosta-2,5,7,22-tetraen-2-carbaldehyde has not been previously isolated. From the highest yielding hemisynthesized compound, 5 α -hydroxy-ergosta-7,22-diene-3,6-dione, some compounds were generated using, as reaction conditions, alcoholic acid catalysis varying the chain of alcohols. In this sense, the formation of two new semi-synthetic compounds was possible: 6-methoxy-ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one (OX 6) and 6-ethoxy-ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one (OX 7). The

derivatization of these sterols, to their ergosta-3-one fundamental structure, made possible the construction of the 1*H*-indole heterocyclic unit using the Fischer synthesis from substituted C4 phenylhydrazines hydrochlorides. This derivatization generated three new semi-synthetic compounds: ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-[2,3;*b*]-1*H*-indole (In 1), ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-[2,3;*b*]-5-cyano-1*H*-indole (In 2) and ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-[2,3;*b*]-5-bromo-1*H*-indole (In 3).

The generation of these semi-natural analogues made possible to carry *in vitro* tests, which are related susceptibility or antimicrobial resistance of Gram-positive and Gram-negative bacteria. From the first series, ergosta-5,22-dien-3-one presented the highest average inhibition halo, in a range of 13.33 ± 0.58 mm, compared to other ergosta-3-ones. This difference was attributed to the rigidity of the A-B rings of these compounds, which is not observed in ergosta-5,22-dien-3-one. The selectivity observed, on Gram-positive bacteria, was explained by the nature of the cell wall that these organisms present, and that due to the amphipathic nature of ergosta-3-ones, it generates an increase in antimicrobial activity with respect to ergosterol, which have no activity in these conditions. The introduction of electron donor groups in the B ring allowed to 6-methoxy-ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one, and 6-ethoxy-ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one to expand its range of action, that is, to act on Gram-positive and Gram-negative bacteria, with higher MIC values than the analogues of the former Serie. Additionally, being 6-ethoxy-ergosta-4,6,8 (14), 22-tetraen-3-one the analog that showed the highest inhibition halo, the evaluation of the minimum inhibitory concentration against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans* yielded values of 200 and 160 $\mu\text{g/mL}$, respectively. These values represent a minimum inhibitory concentration 4 to 5 times lower than that reported for ergosterol, which did not affect the bacteria tested at a concentration of 300 $\mu\text{g/mL}$. For hybrids, the inhibition values obtained were 30 to 75 percent higher than the

precursor ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one. Like series one, they were only selective on Gram-positive bacteria.

In general terms, the increase of the bacterial inhibition of ergosterol analogues depends mainly on the position that substituents acquire on ring A and B. The introduction of the *1H*-indole group into C2-C3, the construction of enol-ethers in C6 and the variation in the number of alkenes in C4-C6-C8(C14), made possible the increase of the magnitude of the inhibition halo respect to ergosterol as a precursor.

1 Introducción.

La investigación de productos naturales (PN) provenientes de plantas, animales y microorganismos terrestres ha resultado en el descubrimiento de numerosos compuestos orgánicos que pueden aplicarse como agroquímicos, pigmentos, fragancias y productos farmacéuticos. La generación de estas sustancias orgánicas naturales las lleva a cabo el organismo vivo a través de distintas reacciones enzimáticas que se enfocan en la supervivencia del huésped por medio de la generación de metabolitos primarios (MP) y secundario (MS) por medio de una ruta biosintética denominada metabolismo primario y secundario. El estudio químico de MS ha posibilitado la identificación de los componentes provenientes de fuentes naturales y que se encuentran directamente relacionado con una potencial actividad farmacológica. En este último campo, algunos de los medicamentos utilizados en el mercado farmacéutico se han generado a partir de PN y de compuestos derivados de estos ¹.

La exploración de los MS se remonta a tiempos antiguos, donde principalmente se relaciona la búsqueda con el uso tradicional de PN como medicinas y toxinas naturales, y que se han utilizado durante miles de años donde jugaron un papel vital en la lucha contra variadas enfermedades que afectaron un amplio rango de culturas y continentes ².

En términos de su fuente, los MS se han descubierto en organismos terrestres, principalmente en plantas y animales. Durante el 377 al 460 ac., Hipócrates dejó registros históricos de algunos tratamientos para aliviar el dolor que incluyeron el uso de polvo de la corteza y las hojas del sauce para ayudar a sanar dolores de cabeza, dolores de otro tipo y fiebre. Con el descubrimiento del analgésico salicina, a partir del extracto de sauce, en 1828 por Johann Buchner y el desarrollo de aspirina en 1899, la investigación de productos naturales entró en una nueva era a nivel molecular. Después del descubrimiento exitoso de la penicilina por Alexander Fleming en 1928 y los acontecimientos que siguieron marcaron otro hito en la historia de los productos naturales,

revitalizando el desarrollo de nuevas drogas y abriendo un nuevo capítulo en el descubrimiento de nuevos fármacos a partir del uso de microorganismos. Luego del exitoso descubrimiento de la penicilina, las compañías farmacéuticas establecieron grandes colecciones de cultivos de microorganismos con el fin de promover tanto la investigación como el desarrollo de nuevos microbianos. Principalmente, este desarrollo repercutió en el descubrimiento de nuevas MS con potencial actividad a partir de PN, donde se obtuvo algunos derivados tal como se mencionó la aspirina, a partir de la salicina, la digitoxina aislada desde *Digitalis purpurea*, la morfina aislada desde *Papaver somniferum*, quinina aislada desde *Cinchona ledgeriana* con su contraparte semi-sintética cloroquina usada como tratamiento de COVID-19, pilocarpina aislada desde plantas del género *Pilocarpus*, como también algunos derivados antimicrobianos como la eritromicina, estreptomicina, cloranfenicol, clortetraciclina, cefalosporina C y vancomicina. Todos los medicamentos descritos anteriormente, ya sea ellos mismos o sus derivados, todavía se usan ampliamente en la actualidad.

El descubrimiento de PN, que posean un potencial uso como fármacos, es una búsqueda compleja e interdisciplinaria que involucra la química, farmacología y las ciencias clínicas que ha beneficiado enormemente a la humanidad en los últimos 100 años. Aunque el descubrimiento de fármacos ha sido tradicionalmente un proceso difícil y costoso, la cantidad de dinero que se invierte actualmente en I+D, como en el desarrollo clínico, se ha acrecentado mientras que la producción de medicamentos recientemente lanzados ha disminuido.

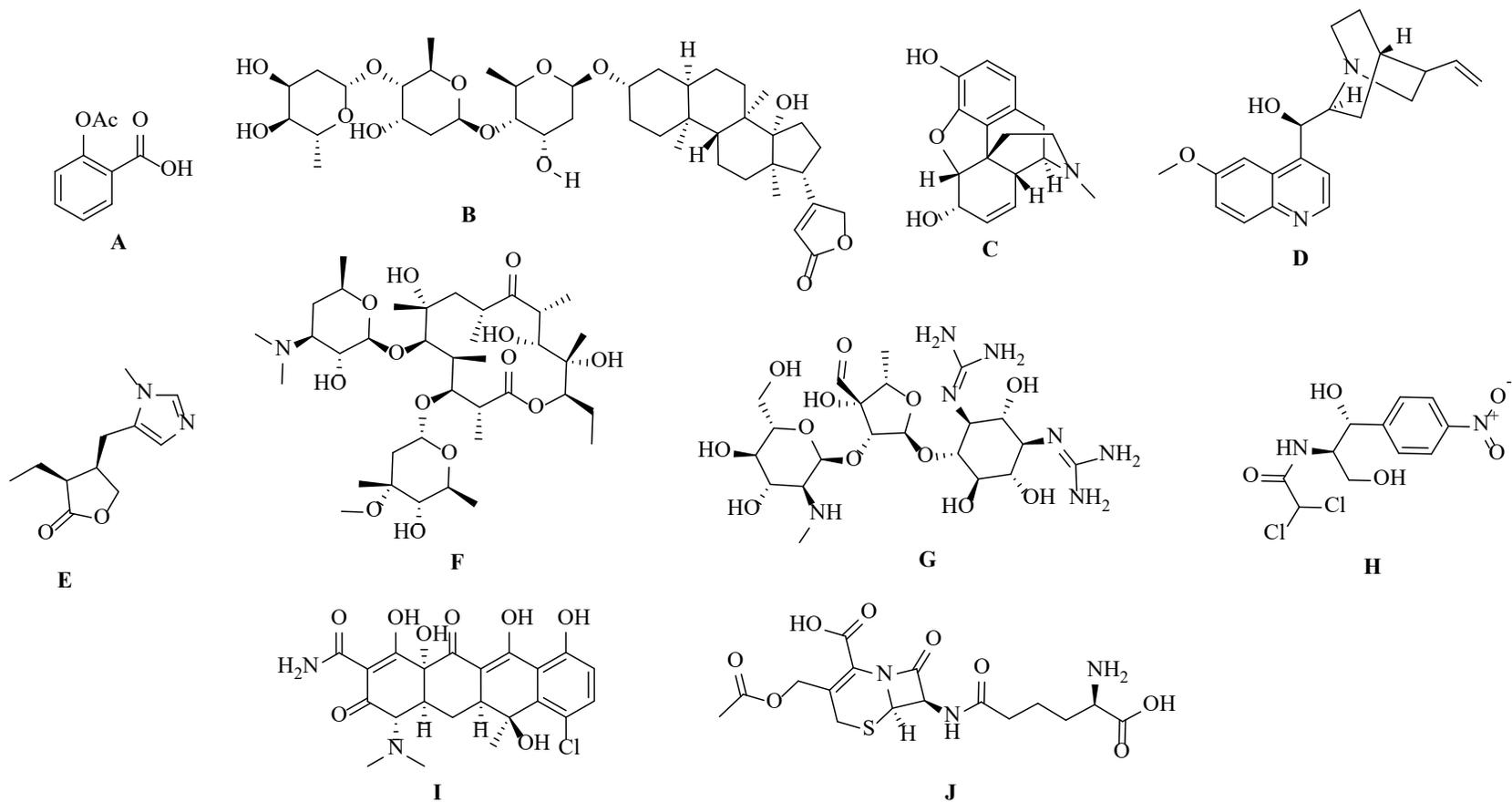


Figura 1. Aspirina (A), digitoxina (B), morfina (C), quinina (D), pilocarpina (E), eritromicina (F), estreptomicina (G), cloranfenicol (H), clortetraciclina (I) y cefalosporina (J) como compuestos bioactivos aislados desde distintas fuentes naturales.

1.1 Organismos como fuente de compuestos bioactivos.

La obtención de productos naturales está asociada a variadas fuentes, de las cuales, consideran organismos asociados a plantas, animales, bacteria, algas y hongos. Para estos últimos, y que son de importancia en esta tesis doctoral, la asociación está compuestos por células eucariotas que presentan un núcleo diferenciado y que se encuentra protegido por una membrana compuesta por quitina en vez de celulosa. Son heterótrofos, ya que no pueden producir moléculas esenciales por lo que su alimentación ocurre por un proceso de absorción de compuestos orgánicos, tal como las plantas. Los hongos se puede agrupar en cinco divisiones: Basidiomicetos (división Basidiomycota), Ascomicetos (división Ascomycota), Glomeromicetos (división Glomeromycota), Zigomicetos (división Zygomycota) y Quitridiomicetos (división Chytridiomycota) ³. Según su ecología, se pueden clasificar en cuatro grupos: saprofitos, liquenizados, micorrizógenos y parásitos. Estos organismos poseen un rol importante en el ciclo de nutrientes de un ecosistema y presentan una reproducción del tipo sexual como asexual. Los hongos se pueden presentar bajo dos formas principales: hongos filamentosos o levaduriformes. Los primeros están compuestos por dos porciones, una reproductiva y otra vegetativa. La parte vegetativa, que es haploide y generalmente no presenta coloración, está compuesta por filamentos llamados hifas, usualmente microscópicas. Un conjunto de hifas conforma el micelio, que es usualmente visible. Los hongos levaduriformes, o simplemente levaduras, son siempre unicelulares de forma casi esférica y donde no existe una distinción entre el cuerpo vegetativo y reproductivo ⁴. En términos de los objetivos de esta tesis doctoral, nos centraremos en los organismos clasificados como basidiomicetos. Esta división o filo incluye hongos que producen basidios con basidiosporas. Esto representa a hongos macroscópicos como son las clásicas setas, representadas en hongos comestibles, tóxicos, alucinógenos y fitopatógenos. En la figura 2 se observa las distintas partes que componen un hongo filamentosos ⁵.

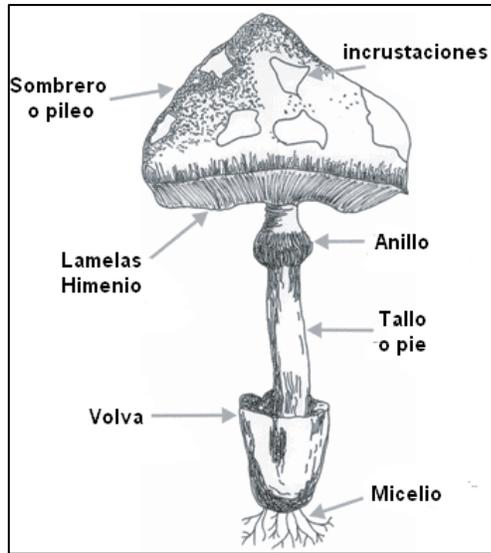


Figura 2. Secciones principales que componen un hongo filamentoso.

En términos de biodiversidad, se estima que existen al menos 1.5 millones de hongos distintos donde solo se han identificado cerca de 75.000 especies a la fecha. Debido a esta diversidad, se ha atribuido a los hongos variados roles, de los cuales se resumen en la figura 3.



Figura 3. Beneficios y efectos desfavorables que poseen los hongos ⁵.

1.2 Características físicas de los hongos estudiados.

El estudio de la obtención de MS provenientes de hongos terrestres involucró a dos familias: Cortinariaceae y Suillaceae. Desde estas familias se estudiaron dos macrohongos que comparten características del tipo basidiomicetos, y que sus características macroscópicas como microscópicas se detallarán a continuación.

1.2.1 *Cortinarius magellanicus* Speg.

Este basidiomiceto posee un sombrero que ronda los 30 a 70 mm de diámetro, donde este presenta una textura mucilaginosa tal como se observa en la figura 4. El sombrero presenta una coloración característica lila violácea, cuando es un organismo joven, mientras cambia a tonos ocráceos al envejecer. Posee lamelas ocráceas y un pie de 60-120 x 5-9 mm. Microscópicamente, posee esporas pardas que poseen un tamaño que ronda los 9-11 x 5-6 μm y que van de forma ovada a elipsoide. Este organismo se distribuye de forma nativa en Nueva Zelanda, Argentina y Chile, siendo en nuestro país, su distribución principal al sur, específicamente, Región del Maule, Región del Biobío, Región de la Araucanía, Región de Los Ríos, Región de Los Lagos, Región Aisén del General Carlos Ibáñez del Campo y Región de Magallanes ⁶.

1.2.2 *Suillus granulatus* Roussel.

Estos hongos filamentosos poseen un píleo de 49-150 mm de diámetro, de color castaño rojizo cuando es un espécimen joven mientras se torna pardo amarillento al envejecer. Posee un pie de 40-80 x 8-18 mm, de coloración amarilla como se observa en la figura 4. Este atributo lo diferencia de otras especies pertenecientes al género *Suillus*, que generalmente son más oscuros. Sus esporas son de 6-8 x 2,5-3,5 μm , pardas amarillas y elípticas lisas. Estos hongos se ubican en suelo de bosque de *Pinus sp.*, donde forman micorrizas con dichos árboles. Esta es una especie

cosmopolita que se encuentra en Chile desde la zona centro hasta la zona austral. Sus fructificaciones se pueden encontrar en la época de otoño y en principios del invierno ⁷.



Figura 4. Imágenes del carpóforo de *C. magellanicus* y *S. granulatus*.

1.3 Metabolismo involucrado en la generación de metabolitos secundarios.

Antes de describir los parámetros relacionados a la generación de productos naturales, se debe definir el termino metabolismo. Este último hace referencia a todas las reacciones químicas involucradas en el mantenimiento del estado vivo del organismo que involucra las células. Estas operaciones de mantenimiento se pueden dividir en dos: catabolismo, que se relaciona con la ruptura de moléculas para obtener energía, y anabolismo, que relaciona la síntesis de los compuestos necesarios para el desarrollo celular.

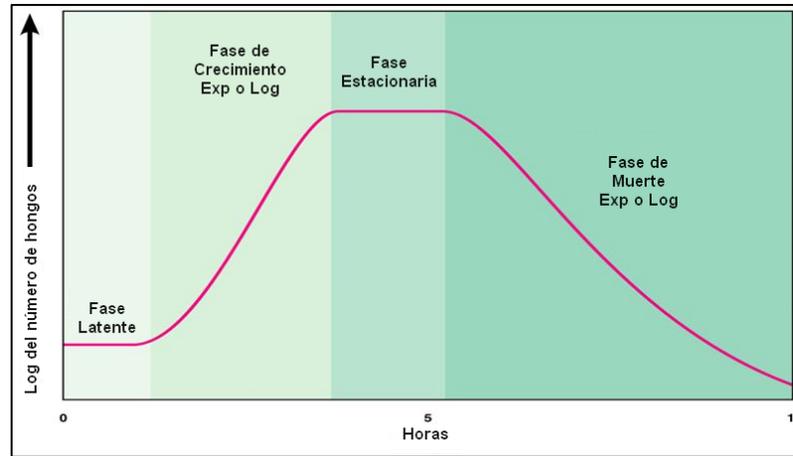


Figura 5. Curva de crecimiento o fases del crecimiento en hongos ⁸.

A partir desde este último concepto, se puede establecer una clasificación considerando la naturaleza del compuesto sintetizado y el rol que cumple.

1.3.1 Metabolismo primario.

Los metabolitos primarios son compuestos esenciales para que ocurra el crecimiento. Estos MP incluyen proteínas, carbohidratos, ácidos nucleicos y lípidos. Estos productos primarios deben sintetizarse si no es posible obtenerlos desde el medio de crecimiento. Por lo general, los metabolitos primarios están asociados con la fase de crecimiento inicial rápida del organismo y la producción máxima de estos metabolitos ocurre cerca del final de esta fase. Una vez que el hongo entra en la fase estacionaria de crecimiento estos MP pueden ser metabolizados aún más. Ejemplos de metabolitos primarios producidos en abundancia son enzimas, grasas, alcohol y ácidos orgánicos, así como también otros compuestos de bajo peso molecular. La figura 6 muestra un esquema general de la biosíntesis de los principales MP necesarios para la supervivencia de los organismos.

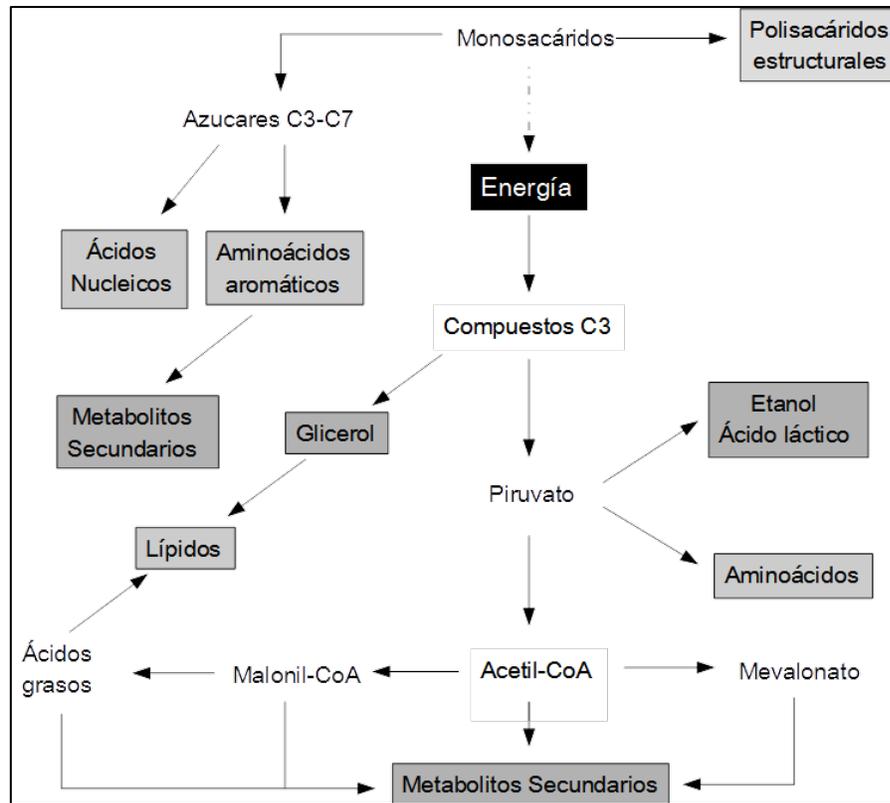


Figura 6. Rutas biosintéticas centrales en hongos ⁹.

1.3.2 Metabolismo secundario.

El término metabolismo secundario se refiere a una amplia gama de reacciones metabólicas cuyos productos no están directamente involucrados en el crecimiento normal. En este sentido, el metabolismo secundario difiere del metabolismo intermedio. Se han descrito miles de metabolitos secundarios a partir de hongos y las únicas características que tienen en común son las siguientes:

- Tienen a producirse al final de la fase de crecimiento exponencial, en cultivo discontinuo o cuando el crecimiento está limitado por el sustrato en un cultivo continuo.
- Se producen a partir de productos metabólicos intermedios comunes, pero por vías enzimáticas especiales.
- No son esenciales para el crecimiento o el metabolismo normal.
- Su producción tiende a ser específica del género, especie e incluso cepa.

Considerando lo anterior, la variación estructural de estos MS es el principal interés, ya que se relaciona directamente con su importancia comercial o ambiental. Por ejemplo, las penicilinas, aisladas desde *Penicillium chrysogenum*, las cefalosporinas, estructuralmente similares, aisladas desde especies *Cephalosporium* o *Acremonium* y la griseofulvina aislada desde *Penicillium griseofulvum*, son antibióticos producidos comercialmente a partir de hongos. Las melaninas de la pigmentación oscura en algunas paredes fúngicas también son metabolitos secundarios, como también son los pigmentos carotenoides en hongos como *Neurospora crassa* y que ayudan a prevenir el daño causado por especies reactivas de oxígeno en sus células. Algunos metabolitos secundarios son hormonas vegetales, como las giberelinas, y que son utilizadas comercialmente en la horticultura como también en productos farmacéuticos. En este último aspecto, la ciclosporina A se utiliza como supresor del rechazo de órganos en cirugías de trasplante. Otros ejemplos incluyen las micotoxinas, como las aflatoxinas producidas por *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* y los alcaloides ergóticos producidos por *Claviceps purpurea* y especies relacionadas ¹.

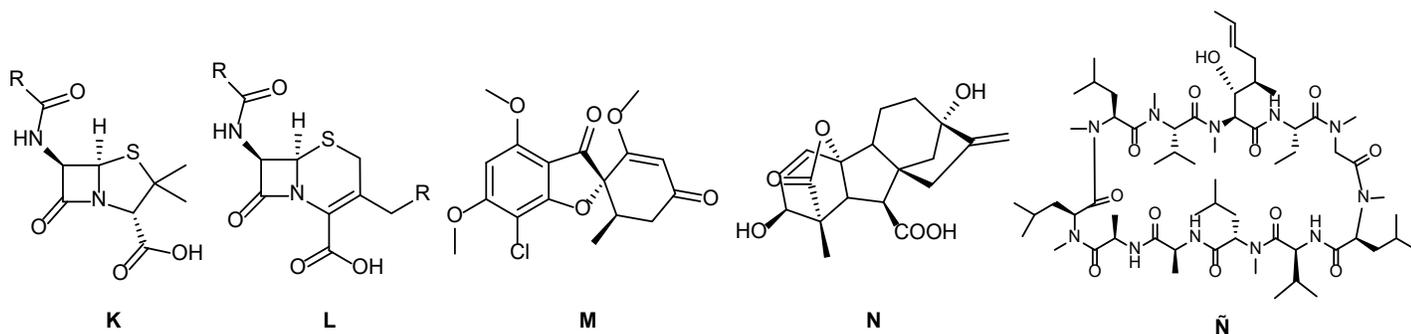


Figura 7. Penicilina (K), cefalosporina (L), griseofulvina (M), ácido giberélico (N), y ciclosporina (Ñ) como MS.

Las propiedades antes señaladas indican que muchos MS no tienen un rol conocido en la vida del organismo. Esto plantea la interrogante sobre el verdadero fin de la producción de metabolitos secundarios. Una sugerencia plausible es que el proceso del metabolismo secundario es necesario e independiente de los productos finales. Considerando este punto de vista, el

metabolismo secundario actúa como una válvula de escape o de desbordamiento para eliminar intermediarios de las rutas metabólicas cuando el crecimiento está temporalmente restringido. Por lo tanto, se argumenta que estos productos intermediarios se derivan hacia vías metabólicas secundarias, cuyos productos se exportan de la célula o se acumulan predominantemente como compuestos inactivos. Por ejemplo, los antibióticos pueden ser útiles en la defensa del territorio, las micotoxinas como antiapetentes animales, la melanina para protección contra el daño ultravioleta, las hormonas sexuales para atraer parejas y los componentes del sabor u olor de los hongos atraen insectos que dispersaran sus esporas. Por lo tanto, el rol de los metabolitos secundarios es variado, son específicos para un grupo de organismos y hay muchos de ellos que aún no se le ha encontrado una utilidad.

1.4 Rutas biosintéticas involucradas en la generación de metabolitos secundarios.

En términos generales, se ha abordado los principales mecanismos de producción de metabolitos primarios y secundarios en hongos y que se encuentran asociados a distintas rutas biosintéticas. Para la ruta de los policétidos, que parece no tener otro papel que participar en el metabolismo secundario, se aprecia que el principal precursor es la acetil-Coenzima A (acetil-CoA). Esta coenzima, mediante una reacción de carboxilación, forma malonil-CoA que posteriormente, entre tres o más moléculas de malonil-CoA se condensan con una molécula de acetil-CoA para formar, por ejemplo, ácido 3,5,7-trioxooctanoico. Esta cadena se somete nuevamente a una ciclación, donde los anillo formados pueden ser modificados para dar una amplia gama de productos.

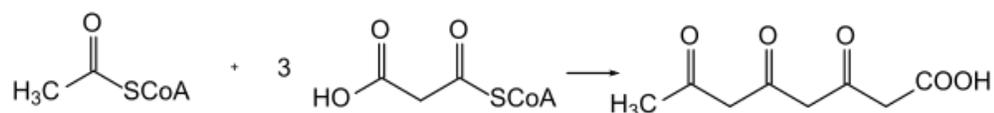


Figura 8. Biosíntesis general para la generación de ácidos orgánicos por la ruta de policétidos.

Este tipo de ciclación incluye la síntesis del antibiótico griseofulvina, las potentes aflatoxinas, ocratoxinas de varios *Penicillium* y *Aspergillus sp.*, y el antibiótico patulina desde *Penicillium patulum* entre otros ¹⁰.

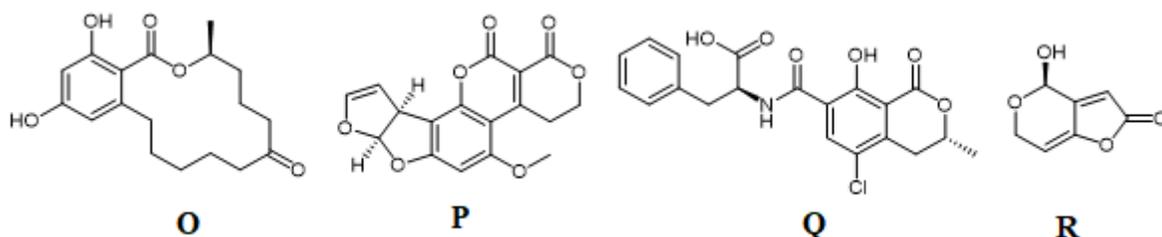


Figura 9. Zearalenona (O), aflatoxina G1 (P), ocratoxina A (Q) y patulina (R) como MS producidos por la ruta de los policétidos.

Otra vía metabólica secundaria importante es la ruta isoprenoide, asociada en este caso, en la síntesis de esteroides. Nuevamente, la acetil-CoA es el precursor inicial y por medio de una condensación de tres moléculas forman ácido mevalónico. Este se interconvierte en pirofosfato de isopentilo (IPP) que, por la posterior condensación mediante uniones cabeza-cola, puede formar cadenas de diversas longitudes donde se someten a ciclaciones y modificaciones enzimáticas adicionales.

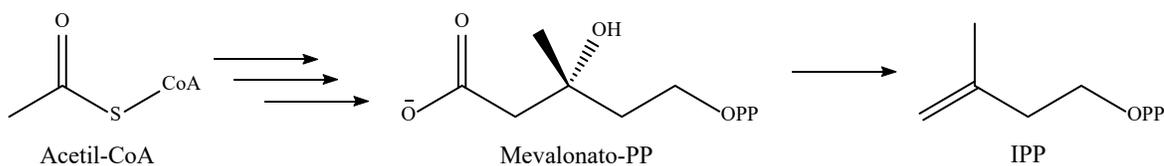


Figura 10. Formación de pirofosfato de isopentilo (IPP) mediante la formación de mevalonato-PP.

Algunos productos de esta vía incluyen las micotoxinas de *Fusarium sp.*, que crecen principalmente en granos húmedos, como la toxina T-2 y los tricotecenos.

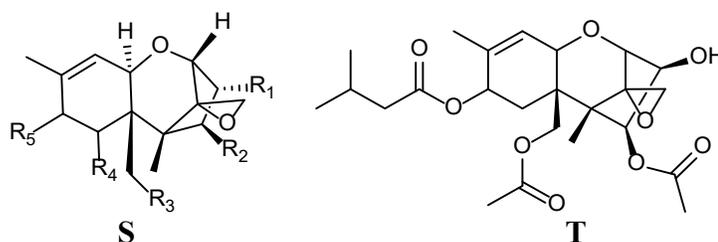


Figura 11. Tricotecenos (S) y T-2 (T) aisladas desde *Fusarium sp.*

Para la ruta del ácido shikímico, utilizada normalmente para la producción de aminoácidos aromáticos, proporciona algunos precursores de MS con efecto alucinógeno como es el ácido lisérgico, la psilocibina, en los hongos *Psilocybe*, como también la toxina muscarina en *Amanita muscaria*.

Luego de conocer, en términos generales, las principales rutas metabólicas en hongos, es necesario enfocarse en la formación de metabolitos secundarios de especial interés para esta tesis, como son los esteroides del tipo ergostano entre otros metabolitos aislados.

1.4.1 Ruta biosintética involucrada en la formación de esteroides en hongos.

El estudio de la biosíntesis de esteroides es un tema activo en investigación, donde el principal enfoque contempla a organismos del tipo eucarióticos. En animales, el principal producto de biosíntesis es colesterol, en levaduras y hongos es ergosterol, y en plantas algunos fitoesteroides como el β -sitosterol¹¹. Estos compuestos, esenciales en este tipo de células, aseguran importantes funciones estructurales y de señalización. La membrana plasmática de células eucariotas contiene esteroides que son esenciales para la organización y las funciones de esta estructura. Cada uno de estos esteroides es el producto final de una ruta biosintética de varios pasos que proviene de una vía inicial común. En esta vía común, la primera etapa considera la formación de pirofosfato de isopentenilo (IPP) a través de la ruta del ácido mevalónico (MVA), mencionada anteriormente, o

alternativamente por la vía del metileritrol fosfato (MEP/DOXP), a partir del 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP) y el 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato (DOXP) ¹⁰. En la figura 12 se observa la obtención de pirofosfato de farnesilo (FPP) a partir de una reacción enzimática. Esto ocurre mediante una adición electrofílica en el C1 del Δ^2 IPP a partir del Δ^3 IPP. Esta unión cabeza-cola, que genera un intermediario catiónico, se obtiene como producto pirofosfato de geranilo (GPP). De la misma forma, GPP sufre la pérdida del segmento pirofosfato (PPi) para generar un catión estabilizado por resonancia. Posteriormente, Δ^3 IPP se adiciona electrofílicamente a dicho catión para obtener pirofosfato de farnesilo (FPP). Los distintos tipos de asociación estructural IPP, GPP como FPP producirán variedad de estructuras terpénicas con 5, 10 y 15 átomos de carbono respectivamente.

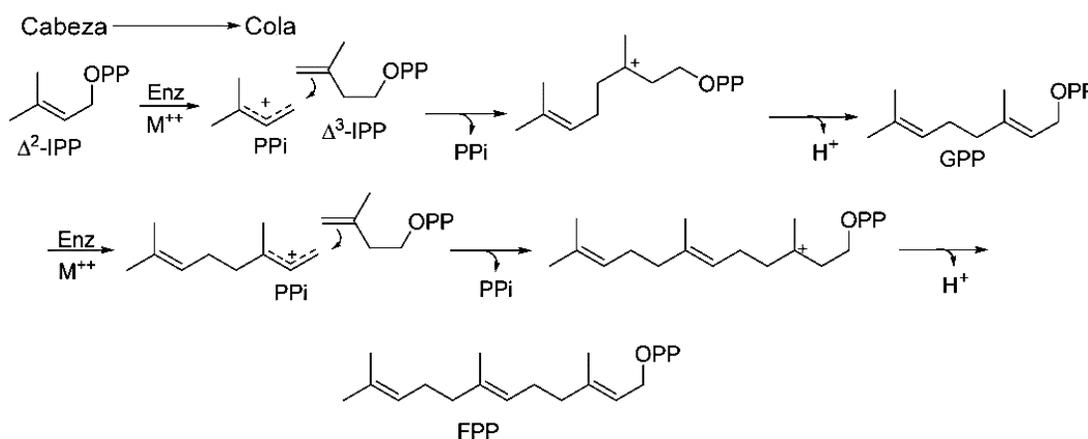


Figura 12. Reacción de la preniltransferasa y formación de pirofosfato de farnesilo (FPP) ¹².

En una segunda etapa, se requieren que dos moléculas de FPP reaccionen en similares condiciones. Una de ellas sufre la pérdida de PPI y donde la adición al carbocatión alílico ocurre desde el extremo del alqueno de la otra molécula. Esta transformación se encuentra acompañada por la pérdida de un protón y la posterior formación de pirofosfato de precaleno (PSPP). En similares condiciones, PSPP pierde el anión PPI y donde el catión ciclopropilcarbinilo experimenta

la apertura acompañada una reducción efectuada por la nicotiamida-adenina dinucleotido fosfato (NADPH) para formar escualeno.

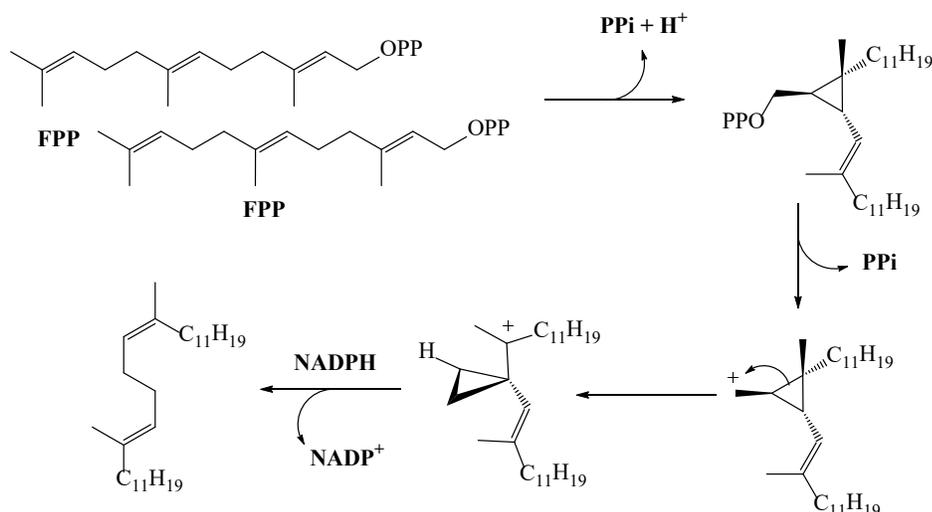


Figura 13. Mecanismo biosintético de formación de escualeno mediante acoplamiento de FPP ¹².

La tercera etapa involucra la epoxidación del escualeno, que es catalizada por la escualeno monooxigenasa (SM), con posterior ciclación para formar lanosterol, catalizada por la oxidoescualeno ciclasa (OC). Posterior a la biosíntesis de lanosterol, son necesarias 20 etapas adicionales para la formación de otros derivados esteroidales como es ergosterol.

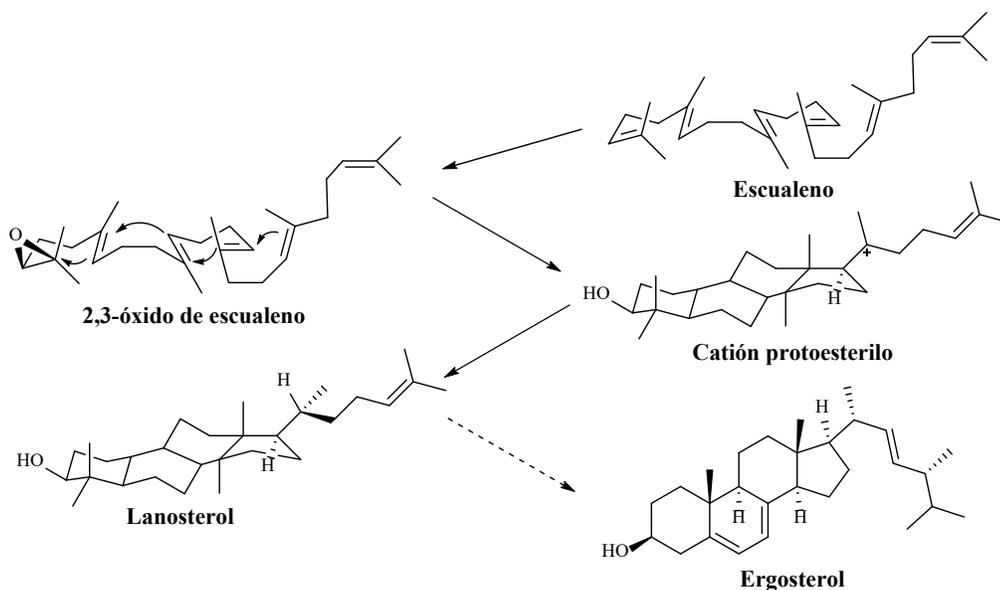


Figura 14. Etapas biosintéticas para la producción de ergosterol a partir de escualeno ¹².

1.5 Estudios fitoquímicos asociados a los macrohongos estudiados: Metabolitos secundarios aislados desde la familia Cortinariaceae.

De los diversos estudios que han involucrado la extracción y purificación de MS provenientes de macrohongos de la familia Cortinariaceae, se han caracterizado alcaloides, antraquinonas y esteroides principalmente. Es por esto que, desde el cuerpo fructífero de *Cortinarius infractus*, *C. brunneus* y *C. subtortus*, se han aislado alcaloides del tipo 1*H*-indol, β -carbolinas, quinolinas e isoquinolinas asociadas a las estructuras contenidas en la figura 15¹³⁻¹⁷.

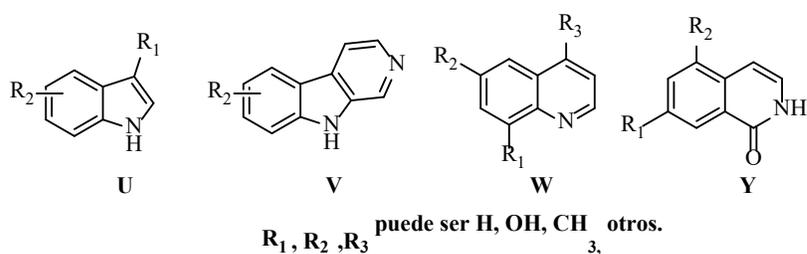


Figura 15. 1*H*-indole (U), β -carbolinas (V), quinolinas (W) e isoquinolinas (Y) aisladas desde el cuerpo fructífero de hongos pertenecientes al género *Cortinarius*.

Desde *Cortinarius vinosipes*, *C. sinapicolor*, entre otros, son los responsables del aislamiento de derivados del tipo antraquinoides. Los estudios asociados se centran en la determinación estructural de monómeros, dímeros, trímeros y tetrameros utilizando resonancia magnética nuclear apoyada con dicroísmo circular vibracional, Rayos X, cálculos teóricos, entre otros¹⁸⁻²⁵.

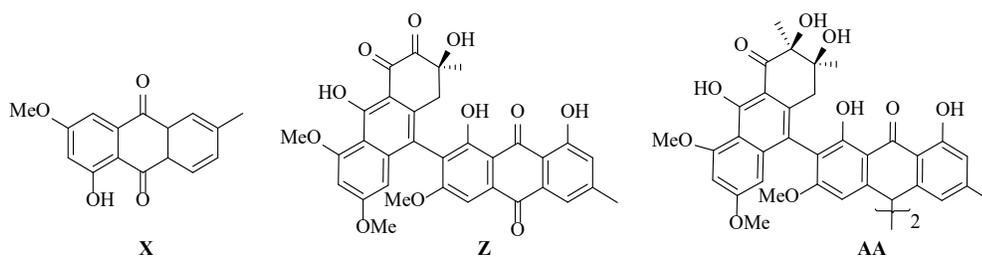


Figura 16. Antraquinonas monoméricas (X), diméricas (Z) y tetraméricas (AA) aisladas desde hongos pertenecientes al género *Cortinarius*.

Desde distintos cuerpos fructíferos del género *Cortinarius*, fue posible el aislamiento de distintos esteroides de esqueleto ergostano. Principalmente, la determinación estructural de estos metabolitos secundarios fue resuelta al utilizar métodos espectroscópicos y experimentos bidimensionales²⁶⁻²⁸.

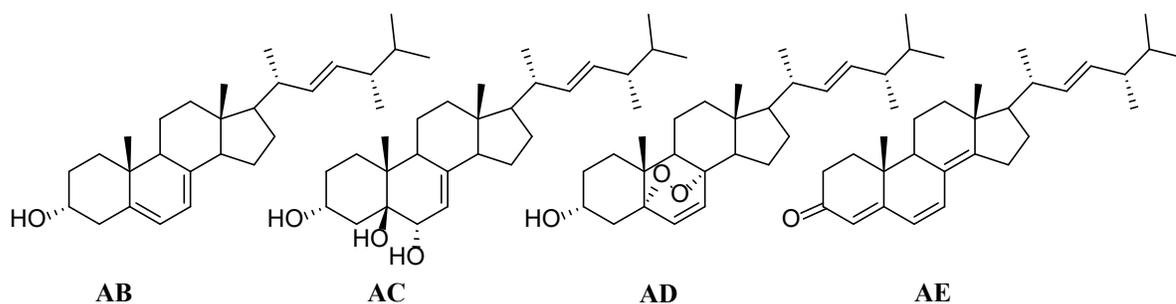


Figura 17. Ergosterol (AB), cerevisterol (AC), peróxido de ergosterol (AD) y ergona (AE) como MS aislados desde el cuerpo fructífero de algunos *Cortinarius*.

1.6 Metabolitos secundarios aislados desde la familia Suillaceae y Boletaceae.

Para la familia Boletaceae, la primera serie de metabolitos aislados son los meroterpenoides. Estos casi terpenos se caracterizan por ser bencenos polihidroxilados que, en una de sus posiciones, están sustituidas por tetra isopreniles en forma de geranylgeranilo (GG) u otro derivado isoprenoide. En la figura 18, se logra apreciar dihidroxibenzenos derivados aislados desde *S. granulatus* y que fueron caracterizados mediante métodos espectroscópicos clásicos.

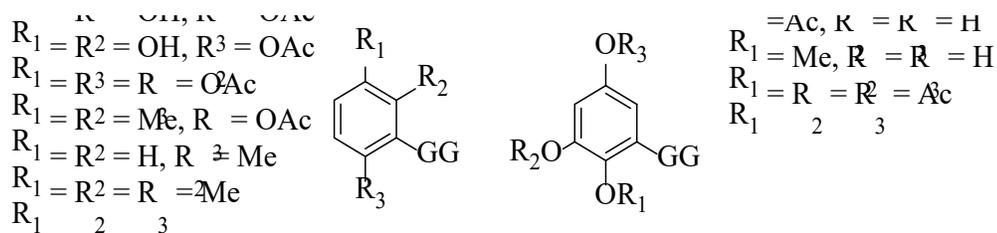


Figura 18. Meroterpenoides aislados desde el cuerpo fructífero de hongos del género *Suillus*.

Adicionalmente, se han logrado aislar distintos compuestos fenólicos desde los cuerpos fructíferos de hongos pertenecientes a la familia Suillaceae.

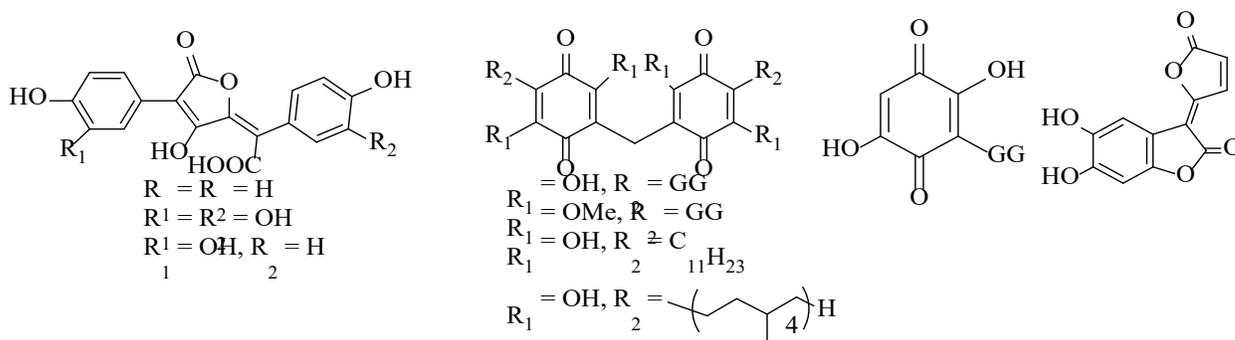


Figura 19. Compuestos fenólicos aislados desde miembros de Suillaceae.

Al igual que en hongos pertenecientes al género *Cortinarius*, se han aislado y caracterizado, desde especímenes pertenecientes a *Boletus*, β -carbolicinas que presentan sustituciones en las posiciones 1 y 3 principalmente.

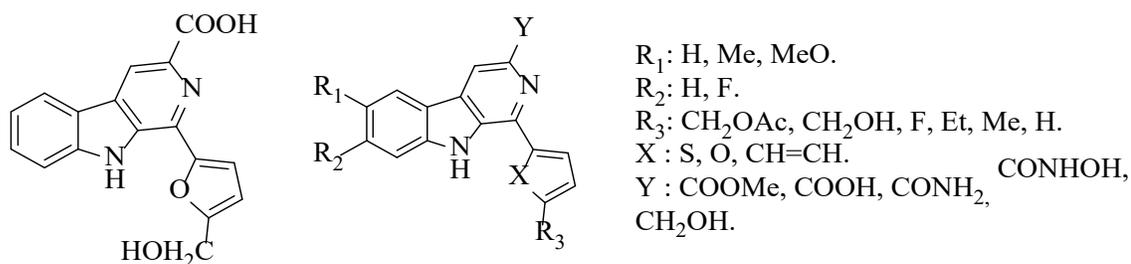


Figura 20. β -carbolicinas aisladas desde miembros pertenecientes a la familia Suillaceae.

1.7 Propiedades farmacológicas de los metabolitos secundarios descritos.

Tal como se mencionó previamente, existe una diversidad de metabolitos aislados desde la familia de los hongos en estudio. La literatura ha ligado a los distintos alcaloides provenientes desde la familia Cortinariaceae como inhibidores de la AChE, en rangos de IC_{50} de $9,72-12,7 \pm 0,19 \mu M$, como también baja actividad antioxidante y nula actividad antitumoral^{14,15,29,30}. Para los derivados antraquinoides, se ha probado la actividad antimicrobiana, frente a *P. aeruginosa* y *S.*

aureus, con rangos de IC₅₀ de 0,7-12 µg/mL e importante actividad citotóxica *in vitro*, en rangos de IC₅₀ de 10-31 µg/mL, sobre linfoblastos de ratones P388D1^{20,31-33}. Adicionalmente, ergona, esteroide del tipo ergostano aislada desde *Cortinarius xiphidipus*, presentó actividad citotóxica importante frente a líneas celulares MFC-7, Saos-2, LNCaP-C42 y N2A en rangos de IC₅₀ de 20,8 a 57,7 ± 2,00 µg/mL.

Por otra parte, para los metabolitos provenientes de Suillaceae, específicamente en la derivatización de suillin, se logró establecer una relación estructura-actividad que presentó valores de ID₅₀ significativos tanto en ensayos *in vitro*, para líneas celulares de leucemia (P-388), cáncer nasofaríngeo (KB) y carcinoma broncopulmonar (NSCLC-N6), como *in vivo* para leucemia de roedores (P-388)³⁴. Adicionalmente, dichos análogos experimentaron pobre actividad antimicrobiana frente a 8 bacterias siendo las más importantes *E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus* y *S. faecalis*³⁵. Para los MS fenólicos, se ha testado la actividad citotóxica frente a células cancerosas de roedores L1210 y 3LL, las que exhibieron una actividad citotóxica significativa con un IC₅₀ menor a 20 µg/mL³⁶. También fue posible la evaluación de la actividad citocrómica en sistemas CYP (1A2, 2C9, 2D6, 3A4) siendo el ácido variegático el más activo en todos los sistemas utilizados³⁷.

Es posible observar que, para los metabolitos secundarios producidos por estas especies fúngicas, existen variadas aplicaciones biológicas que posibilitan resolver problemas cotidianos. Cada uno de estos aspectos es de importancia global pero este trabajo se enfocará principalmente en la actividad antimicrobiana de MS de los hongos estudiados en esta tesis doctoral.

1.8 El problema de la resistencia antimicrobiana.

A nivel global, la organización mundial de la salud, *World health organization*, WHO en sus siglas en inglés, se encarga de plantear los lineamientos, con los distintos gobiernos, que se deban seguir con el fin de poder garantizar el más alto nivel de salud para la población. La WHO se enfoca principalmente en enfermedades infecciosas, el VIH y enfermedades no transmisibles como el cáncer y las enfermedades del corazón, entre otras. Dentro de este abanico de opciones, el control de agentes antimicrobianos es de vital importancia para la WHO, debido a la mala manipulación y uso que la población les puede dar, ya que este uso genera resistencia bacteriana a los distintos antimicrobianos existentes en el mercado (RAM).

La RAM en los microorganismos, ya sean bacterias, hongos, virus y parásitos que presentan una mutación o generan un gen de resistencia cuando están expuestos a medicamentos como son los antibióticos, antifúngicos, antivirales, antipalúdicos y antihelmínticos, por largos periodos de tiempo y sin control alguno. Estos microorganismos que desarrollan resistencia se les denominan superbacterias y como resultado los medicamentos se vuelven ineficaces por lo que las infecciones persisten en el cuerpo. Esto permite el aumento del riesgo de propagación a otras personas, repercutiendo en la prevención y el tratamiento efectivo de las infecciones. Se estima que para el año 2050, cerca de 10 millones de muertes estarán relacionadas con la resistencia a los antimicrobianos ³⁸.

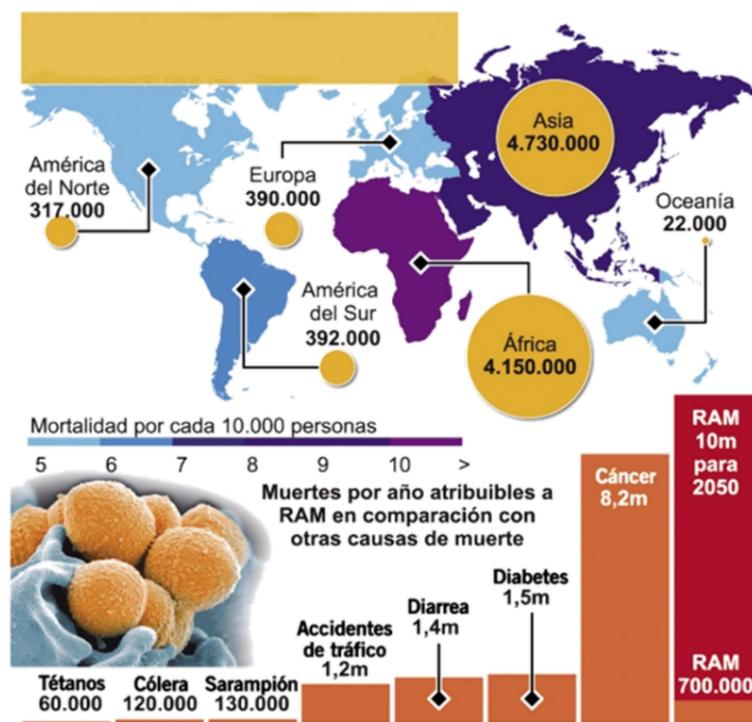


Figura 21. Estimación de las muertes por RAM al 2050 ³⁹.

Esta tendencia es de total preocupación, por lo que es necesario generar e identificar nuevas moléculas capaces de vencer efectivamente esta dolencia del mañana.

1.9 Metabolitos secundarios como fuente de medicamentos.

Newman y Cragg han contribuido con un resumen de las distintas drogas aprobadas en USA, Europa y Japón, durante el periodo 1981-2014, y que han comercializado en todo el mundo ⁴⁰. En términos generales, y considerando el blanco de estudio, la clasificación expuesta por los autores indica que un 13,10% de todos los compuestos corresponde a medicamentos que poseen actividad anticancerígena seguida de un 10,54% para medicamentos antibacteriales y un 10,46% a compuestos con actividad antiviral. En términos específicos, los autores antes citados clasifican con **N** para un producto natural inalterado, **B** como una macromolécula biológica, **NB** como droga botánica (mezcla), **ND** como PN derivatizados, **S** como droga sintética, **S*** como droga sintética,

que posee un farmacóforo basado en PNs, **V** como vacuna y **NM** como una molécula que imita la estructura de un PN. Considerando el número de medicamentos aprobados con actividad antimicrobiana se tiene que un 50,70% de PN proveniente de la derivatización de MS (**ND**), un 20,71% de medicamentos proveniente de la síntesis de compuestos (**S**), un 19,28% de moléculas pequeñas que son vacunas (**V**), un 7,90% de las drogas que son PN (**N**) y un 0,71% para macromoléculas biológicas como drogas sintéticas que poseen un farmacóforo basado en PN (**B-S*/NM**). Finalmente, de los medicamentos comentados anteriormente se encuentran dos principales fuentes naturales que aportan PN antimicrobianos. En la figura 22 B se observa la existencia de un igual número de PN que provienen de bacterias como hongos. Principalmente, las distintas drogas aprobadas corresponden a derivados de PN aislados desde dichas fuentes y que poseen distintos núcleos, a los cuales, se atribuye la actividad antimicrobiana.

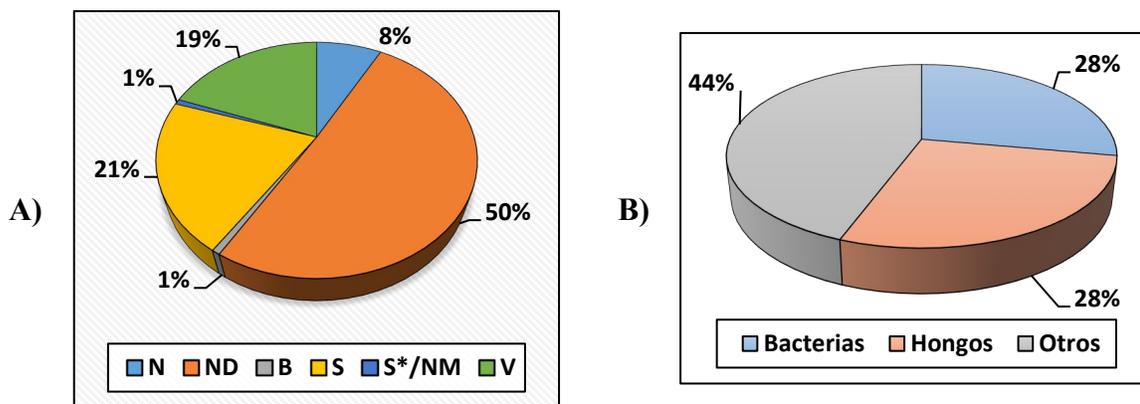


Figura 22. A) Porcentaje de medicamentos antimicrobianos según estructura. B) Porcentaje de medicamentos antimicrobianos según fuente de obtención.

Como se ha demostrado, estos resultados revelan que los organismos pertenecientes al reino fungi son buenos candidatos para la generación de metabolitos secundarios con propiedades antimicrobianas.

1.10 Anatomía básica de la célula bacteriana.

Las bacterias son microorganismos que presentan un tamaño que va entre 0,3 y 5 μm de longitud y presentan tres tipos de estructuras básicas, las cuales incluyen filamentos, esferas (cocos), barras (bacilos), sacacorchos (vibrios) y hélices (espirilos).

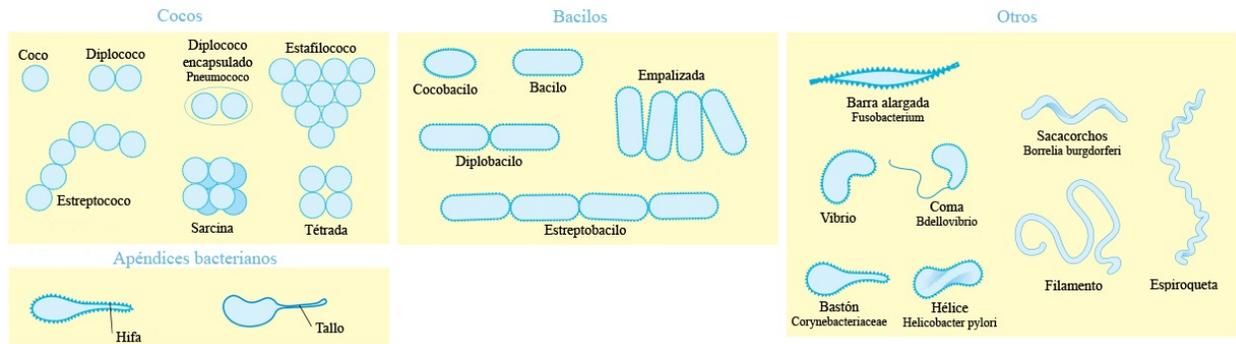


Figura 23. Morfología de las distintas bacterias ⁴¹.

Estos organismos están compuestos por células procariotas que, a diferencia de las células eucariotas provenientes de animales, plantas, hongos, entre otros, no poseen un núcleo definido ni presentan, en general, orgánulos membranosos internos. A pesar de esta característica, las bacterias contienen una estructura celular bien desarrollada, donde se puede identificar la pared celular, membrana plasmática, mesosomas, citoplasma y cromosomas bacterianos. Sin la existencia de los antes nombrados se pone en juego la integridad, capacidad de crecimiento, reproducción y viabilidad de las células y como en otros organismos, la pared celular bacteriana proporciona integridad estructural a la célula. Existen dos tipos principales de paredes de células bacterianas, las bacterias Gram-positivas y las Gram-negativas, donde estas se diferencian por sus características frente a la tinción de Gram. Las bacterias Gram-positivas poseen una membrana citoplásmica rodeada por una malla dura que compone la pared celular. Por el contrario, las bacterias Gram-negativas contienen una pared celular delgada que está rodeada por una segunda

membrana lipídica llamada membrana externa (ME). El espacio entre la ME y la membrana citoplasmática se conoce como periplasma. La ME es una capa protectora adicional y evita que muchas sustancias entren en la bacteria. Sin embargo, esta membrana contiene canales llamados porinas, que permiten la entrada de moléculas esenciales para la supervivencia de la bacteria como también algunos medicamentos antimicrobianos. La figura 24 muestra la diferencia estructural como también los constituyentes para cada uno de los tipos de bacteria ⁴².

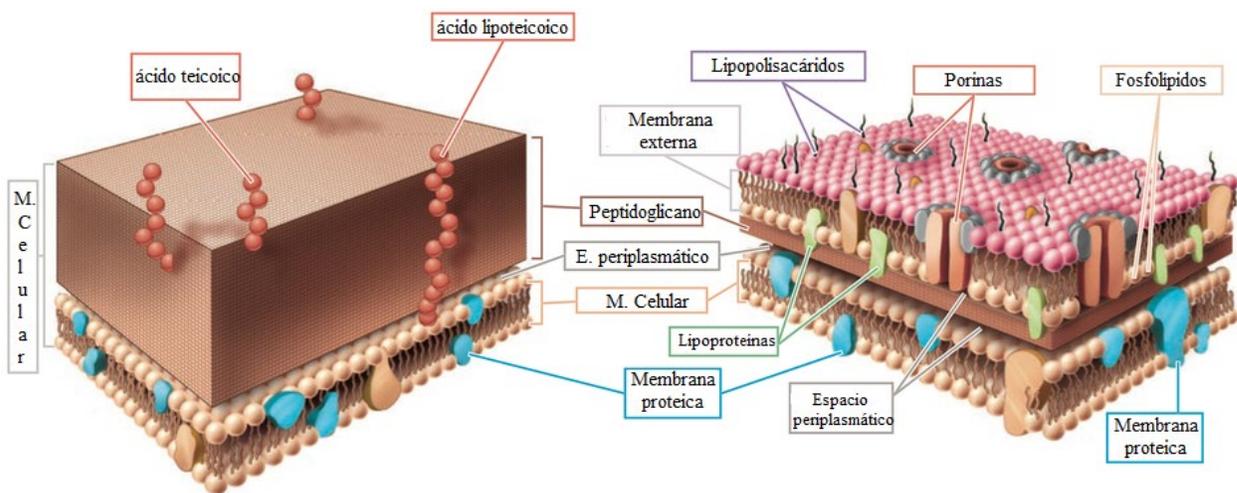


Figura 24. Constituyentes de la estructura de la pared celular para bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.

1.11 Mecanismo de acción de los antibióticos.

Tal como se vio anteriormente, las bacterias presentan características externas e internas distintas. Esta diversidad provoca que los antibióticos procedan por mecanismos de acción basados en las características vitales de cada organismo y, que en general, son específicos ya que no se producen en células animales ^{43,44}. En este sentido, las moléculas con actividad antimicrobiana actúan en tres áreas, las cuales están contenidas en la figura 25. Estas áreas relacionan la inhibición

de la síntesis de la pared celular, inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos y la inhibición de la síntesis de proteínas ⁴⁵.

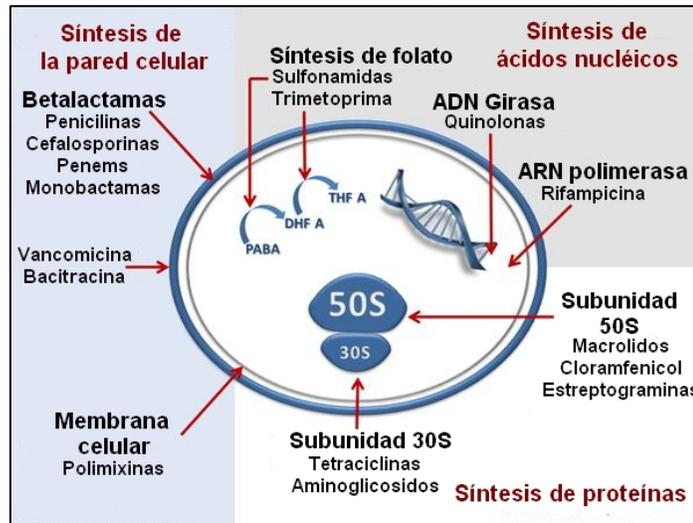


Figura 25. Mecanismos de acción de los compuestos antibióticos.

1.11.1 Inhibidores de la síntesis de la pared celular.

Tal como se mencionó anteriormente, las células bacterianas están rodeadas por una pared celular constituida por peptidoglicano. Este polímero se somete a un entrecruzamiento de las cadenas de glucanos, por la acción de las transglicosidasas. Estas cadenas peptídicas se extienden desde los azúcares en los polímeros y forman también entrecruzamientos desde un péptido a otro. La porción de D-alanil-alanina, perteneciente a la cadena peptídica, se encuentra entrelazada por residuos de glicina, en presencia de proteínas fijadoras de penicilina (PBP) ⁴⁶.

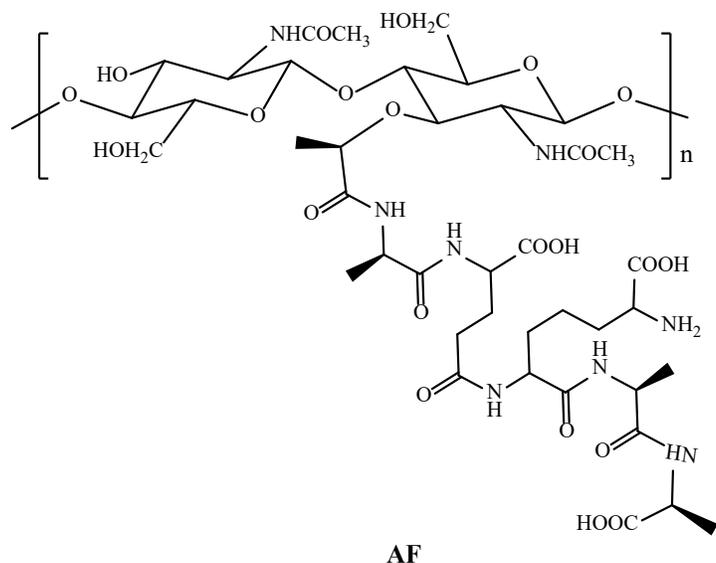


Figura 26. Monómero de la subunidad pentapéptida del disacárido N-acetilmurámico- β -1 \rightarrow 4-N-acetilglucosamina (AF) que compone el peptidoglicano.

Considerando lo anterior, es necesario que el medicamento posea, en su estructura, un núcleo β -lactámico. Asociada a esta estructura se encuentran variados medicamentos, tales como la tienamicina, aztreonam, cefalosporina C entre otros. Dentro del mecanismo de acción, los anillos β -lactámicos imitan a la porción correspondiente a la D-alanil-D-alanina de la cadena peptídica que normalmente está unida a la PBP.

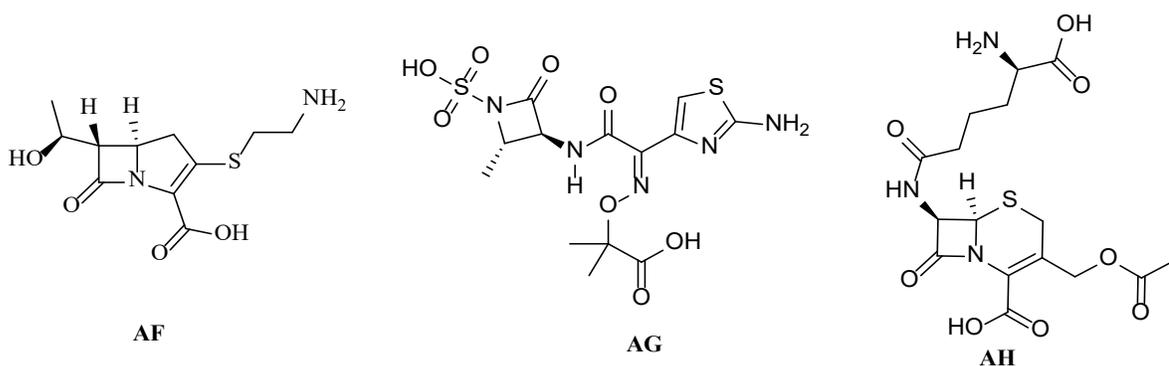


Figura 27. Tienamicina (AF), aztreonam (AG) y cefalosporina C (AH) como β -lactámicos inhibidoras de la síntesis de la pared celular.

Esta proteína interacciona con el anillo de la β -lactama inhabilitando irreversiblemente la síntesis de nuevos peptidoglicanos que provoca la lisis de la bacteria por medio de una alteración sustancial de la capa de peptidoglicano. La figura 27 representa las etapas que contempla la inhibición de la síntesis de la pared celular por parte de β -lactamas. La desactivación de la transpeptidasa repercute en el no entrecruzamiento y posterior formación de la pared celular de peptidoglicano.

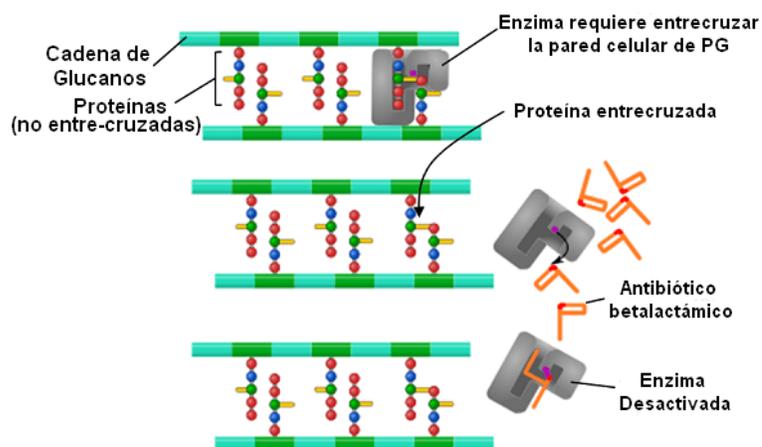


Figura 28. Mecanismo de inhibición para β -lactamas.

Al igual que las β -lactamas, los glucopéptidos se unen a la porción D-alanil-D-alanina de la subunidad precursora de peptidoglicano. La unión del glucopéptido, como es la vancomicina, impide la unión de la subunidad de D-alanilo con la PBP y, por lo tanto, inhibe la síntesis de la pared celular ⁴⁷.

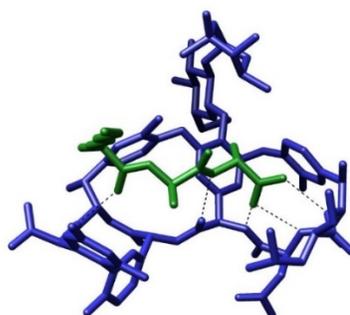


Figura 29. Complejo PBP-vancomicina.

1.11.2 Inhibidores de la síntesis de proteínas.

La síntesis de proteínas es un proceso vital para la supervivencia de la célula. Los ribosomas citoplasmáticos son los organelos encargados de la síntesis mediante un proceso de traducción. Específicamente, los ribosomas de células animales (80S) son estructuralmente distintos a los encontrados en las células bacterianas (70S), lo que hace que la biosíntesis de proteínas sea un objetivo selectivo para ciertos fármacos antibacterianos. El ribosoma 70S bacteriano está compuesto por dos subunidades de ribonucleoproteína (RNP), las subunidades 30S y 50S, donde los antimicrobianos inhiben la biosíntesis de proteínas interactuando específicamente con estas subunidades ^{48,49}.

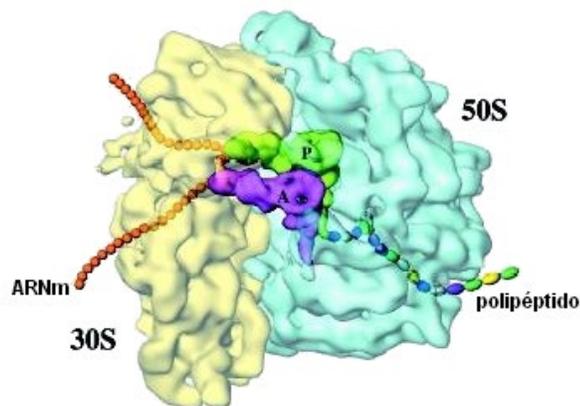


Figura 30. Ribosoma 70S de *E. coli* mostrando la síntesis de proteínas.

Los medicamentos capaces de inhibir la subunidad 30S se encuentran los aminoglucósidos y tetraciclinas mientras que los responsables de la inhibición de 50S son anfenicoles, macrolidos y oxazolidinas.

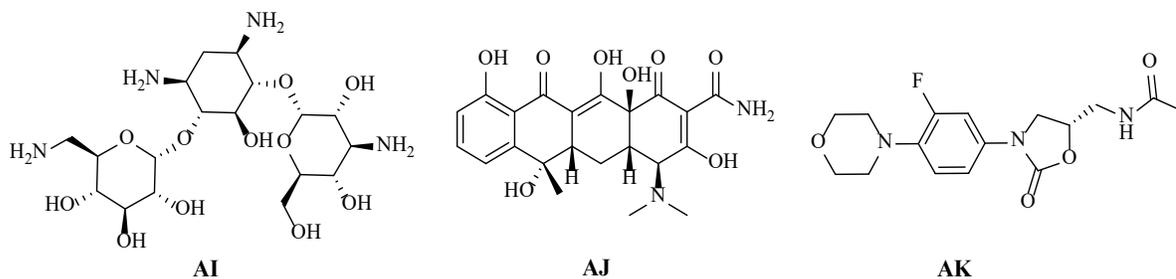


Figura 31. Anfenícoles (AI), macrólidos (AJ) y oxazolidinas (AK) como inhibidores de la síntesis de proteínas.

1.11.3 Inhibidores de la replicación del ADN.

Dentro de los medicamentos que actúan en la inhibición de la replicación de ácidos nucleicos, estos actúan sobre enzimas que participan en los procesos de transcripción y replicación mientras que otros actúan directamente sobre el ADN dañándolo.

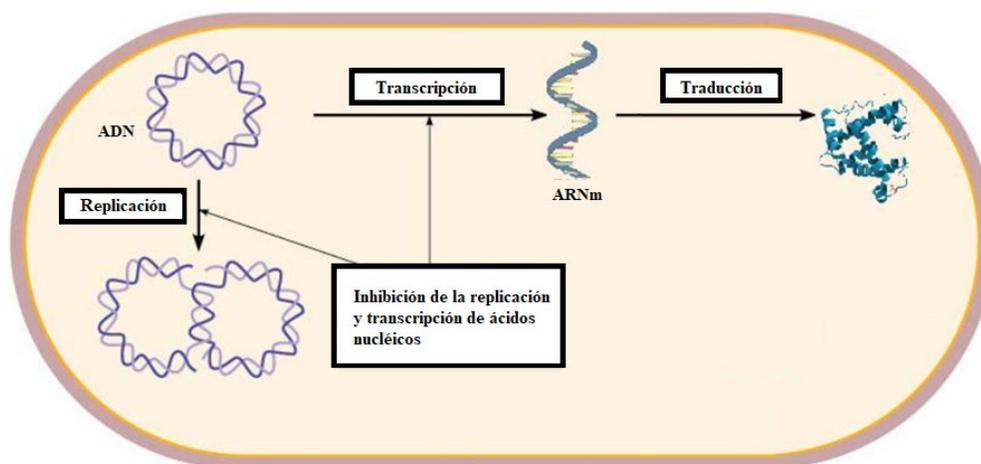
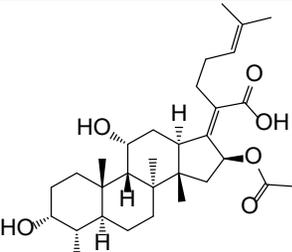
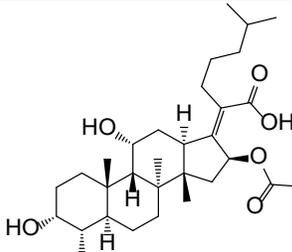


Figura 32. Etapas en la inhibición de la replicación del ADN.

De los primeros, que actúan inhibiendo las enzimas topoisomerasas, se tiene levofloxacino como también metronitrazole como inhibidores de la replicación de ADN.

Por otra parte, para ácido fusídico, que es el único antimicrobiano comercialmente distribuido de esta serie, posee una actividad antimicrobiana preferente sobre bacterias Gram-positivas. Wu y colaboradores testearon este ácido, y su respectivo análogo hidrogenado, frente a las cepas ATCC de *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus*, presentando mayores halos de inhibición para bacterias Gram-positivas y siendo también inactivos sobre las bacterias Gram-negativas ensayadas. La tabla 2 resume la información los halos de inhibición reportados.

Tabla 2. Actividad antibacterial de ácido fusídico y su análogo hidrogenado expresado como zona de inhibición.

Estructura				
	0,125	0,0625	0,125	0,0625
Bacterias	Zona de inhibición (mm)			
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	23,09±0,37	20,60±0,40	23,08±1,13	20,05±0,30
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	21,48±0,36	18,75±0,44	19,93±1,03	17,10±0,14
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	24,22±1,66	20,04±0,35	22,91±0,84	17,42±0,40
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19115	11,63±1,33	10,44±0,82	11,49±0,41	10,55±1,20
<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	8,22±0,79	7,37±1,23	9,39±0,90	7,52±1,11
<i>E.coli</i> CMCC 44102	S.I	S.I	S.I	S.I

S.I = Sin inhibición

Del mismo modo, Wu y colaboradores determinaron la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración bactericida mínima (CBI) para estos análogos. La tabla 3 resume los resultados obtenidos para los compuestos ensayados. A pesar de los excelentes resultados obtenidos sobre bacterias Gram-positivas, no existieron diferencias significativas en la magnitud del efecto obtenidos para estos dos fusidanos.

Tabla 3. Actividad antimicrobiana expresada como CMI y CMB.

Bacteria	Ácido Fusídico		Ácido fusídico hidrogenado		
	CMI	CMB (mg/mL)	CMI	CMB	
Gram-positiva	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	0,1	0,3125	0,1	0,2
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0,625	1,25	0,625	1,25
	<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	0,625	1,25	0,625	1,25
	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19115	>1,25	>1,25	>1,25	>1,25
	<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	>1,25	>1,25	>1,25	>1,25
	Gram-negativa	<i>E.coli</i> CMCC 44102	S.I	S.I	S.I

S.I = Sin inhibición

Paralelamente, escualamina, metabolito aislado desde *Squalus acanthias*, ha exhibido una actividad antibiótica de amplio espectro frente a bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, comparable con antibióticos comerciales como es la ampicilina. La tabla 4 desglosa la

concentración mínima inhibitoria obtenida para escualamina, N'-(3-aminopropil)butano-1,4-diamina (espermidina) y el antibiótico ampicilina. La elección de estos tres componentes se debe principalmente a que la espermidina esta inserta en la posición 3 del anillo cicloperhidrofenantreno y la ampicilina presenta valores de CMI similares a la escualamina ⁵³.

Tabla 4. Espectro antimicrobiano de la escualamina y moléculas relacionadas.

Bacteria	CMI (µg/mL)		
	Escualamina	Espermidina	Ampicilina
<i>E.coli</i> ATCC 25922	1-2	>500	2-4
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	4-8	>500	62-125
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	1-2	>500	<1
<i>S. faecalis</i> ATCC 29212	1-2	250-500	<1
<i>P. vulgaris</i> ATCC 13315	4-8	>500	8-16
<i>S. marcescens</i> ATCC 8100	>125	>500	4-62

Considerando los valores antes señalados, y tomando en cuenta la estructura de cada uno de estos compuestos, estos presentan sustituciones sobre los anillos A y B del cicloperhidrofenantreno. En los estudios antes señalados, se asocia el incremento de la actividad antimicrobiana observada al grado de sustitución presentado en las moléculas, en específico, a la presencia de bases de Lewis en las posiciones C3 y C7, asociadas a sustituyentes que pueden ser un grupo hidroxilo o bien, un grupo amino. Principalmente se ha observado que estas modificaciones estructurales generan un incremento en la actividad antimicrobiana afectando principalmente a bacterias Gram-positivas y, en menor grado, bacterias Gram-negativas.

Tomando en cuenta esto último, y relacionando la estructura con el mecanismo de acción de estos compuestos, diversas investigaciones han considerado estos aspectos estructurales con el modo de inhibición que poseen estos antibióticos esteroidales. Harvey y colaboradores estudiaron el modo de acción del ácido fusídico frente a *S. aureus* y *E. coli*. Dentro de los resultados obtenidos, los experimentos en células intactas mostraron inmediatamente la inhibición de síntesis de proteínas, luego de la aplicación del ácido fusídico, y que repercuten en el cese de la síntesis de ARN y ADN. Adicionalmente, la síntesis de mucopéptidos de la pared celular continuó después de la inhibición de la síntesis de proteínas, generando un aumento en el crecimiento bacterial durante un período de tiempo correspondiente a una a dos generaciones. En relación con el mecanismo de acción sobre bacterias Gram-negativas, se encontró que el ácido fusídico inhibe la síntesis de polifenilalanina, siendo esta interacción no reversible ⁵⁴.

Por otra parte, Alhanout y colaboradores evaluaron el mecanismo de acción que presenta escualamina y colistina, como comparación, frente a *S. aureus* ATCC 25923 y *P. aeruginosa* ATCC 27853. Luego del análisis fue posible observar, en la imagen TEM de la figura 35, el cambio morfológico presentado por ambas bacterias luego de la exposición a ambos componentes. Es posible observar que el tratamiento de escualamina sobre *S. aureus* resultó en la ruptura de la membrana bacteriana, con contenido citoplásmico drenado al medio, y donde paralelamente no se observaron cambios morfológicos en células de *S. aureus* tratadas con colistina. Para *P. aeruginosa*, se observó una mezcla de células llenas con membranas que exhibían proyecciones similares a ampollas y células completamente vacías como respuesta al tratamiento con escualamina. A raíz de estos resultados, fue posible establecer un mecanismo de acción para la escualamina, frente a *S. aureus* y *P. aeruginosa*, y que se encuentra graficado en la figura 35. En dicho estudio concluyeron que la escualamina actúa como una molécula activa sobre integridad de

la membrana bacteriana, de bacterias Gram-negativas, a través de interacciones de sus grupos amino cargados positivamente con los grupos fosfato cargados negativamente en la estructura del lipopolisacárido, desplazando a cationes divalente como Ca^{2+} y Mg^{2+} , mediante un mecanismo de acción similar al de un detergente^{55,56}. En cambio, para bacterias Gram-positivas, se observó que el mecanismo de acción de escualamina conduce a una fuerte despolarización de las membranas, generando un modo de acción "mecánico" mediado por la alteración de la membrana bacteriana que repercute en la lisis y que conduce en la salida de iones intracelulares^{56,57}.

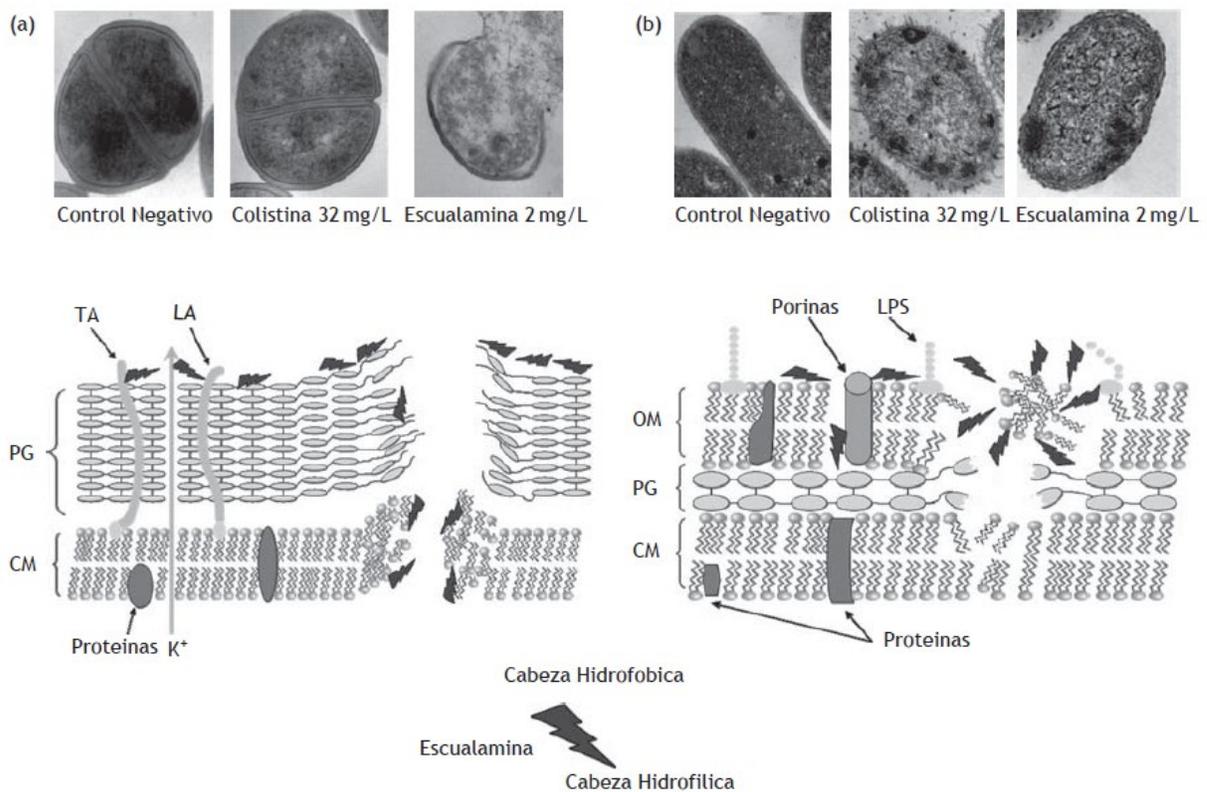


Figura 35. Cambios morfológicos de las cepas de referencia de *S. aureus* ATCC 25923 (a) y *P. aeruginosa* ATCC 27853 (b) después de la exposición a colistina o escualamina. TA, ácido teicoico; LA, ácido lipoteicoico; LPS, Lipopolisacárido; PG, peptidoglicano; CM, membrana citoplasmática; OM, membrana externa.

Tomando en consideración los metabolitos secundarios esteroidales que se describirán en el capítulo 2 de esta tesis doctoral, los estudios que relacionan la actividad antimicrobiana para ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol, y algunos compuestos estructuralmente similares como es colest-5-en-3 β -ol y colecalciferol, han presentado valores de CMI superiores a 1024 $\mu\text{g/mL}$ sobre *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *K. pneumonia* y *E.coli*, lo cual se considera inactivo^{58,59}.

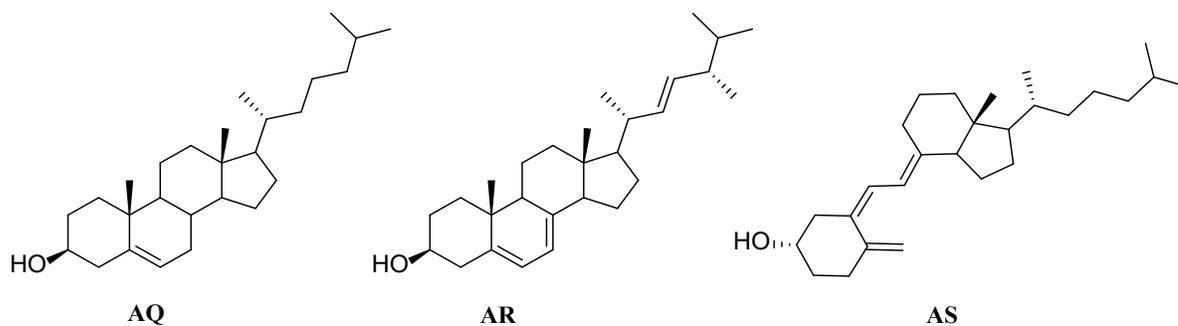


Figura 36. Estructuras para colesterol (AQ), ergosterol (AR) y colecalciferol (AS).

A pesar de estos resultados, y con el fin de buscar nuevas alternativas para resolver el problema de la RAM, se ha estudiado el efecto modulador de estas moléculas anfipáticas al ser empleadas en estudios *in vitro* y en conjunto con antibióticos inhibidores de la síntesis de proteínas, como son los del tipo aminoglucósidos, específicamente con amikacina, gentamicina y neomicina.

Tabla 5. Actividad moduladora de antibióticos aminoglucósidos asociados con colesterol, colecalciferol y ergosterol.

Antibiótico	Colesterol	Ergosterol	Colecalciferol	Control
	<i>Staphylococcus aureus</i> 358 (CMI $\mu\text{g/mL}$)			
Amikacina	19,53*	19,53*	4,88	156,25
Gentamicina	2,44*	2,44*	4,88	9,76
Neomicina	9,76*	78,12	1250#	156,25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 03 (CMI $\mu\text{g/mL}$)				
Amikacina	39,06	19,53*	9,76	78,12
Gentamicina	4,88*	4,88*	39,06	19,53
Neomicina	156,25	156,25	156,25	156,25

* Se observa sinergia. # Se observa antagonismo.

La tabla 5 expone los principales resultados obtenidos sobre bacterias resistentes. Andrade y colaboradores han establecido que existe un efecto sinérgico cuando se ha utilizado estos compuestos esteroidales sobre *S. aureus* 358 y *P. aeruginosa* 03 utilizando amikacina y gentamicina. Este efecto sinérgico se traduce en una menor concentración necesaria para ejercer el efecto antibiótico esperado. La actividad moduladora observada se explica por la propiedad anfipática que presentan estos compuestos, actuando mediante un efecto lipofílico en la envoltura celular, que repercute en la alteración del mosaico fluido presente en la membrana bacteriana. Esta pérdida de la permeabilización puede ocurrir en la membrana externa como interna, lo cual, facilita la entrada de antibióticos lo que causa la lisis celular. Adicionalmente, la célula puede controlar su fluidez regulando el grado de saturación de las cadenas de hidrocarburos de los fosfolípidos, y donde la presencia de este tipo de compuestos repercute en el cambio de la fluidez y permeabilidad de las membranas lipídicas presentes en la célula ⁶⁰.

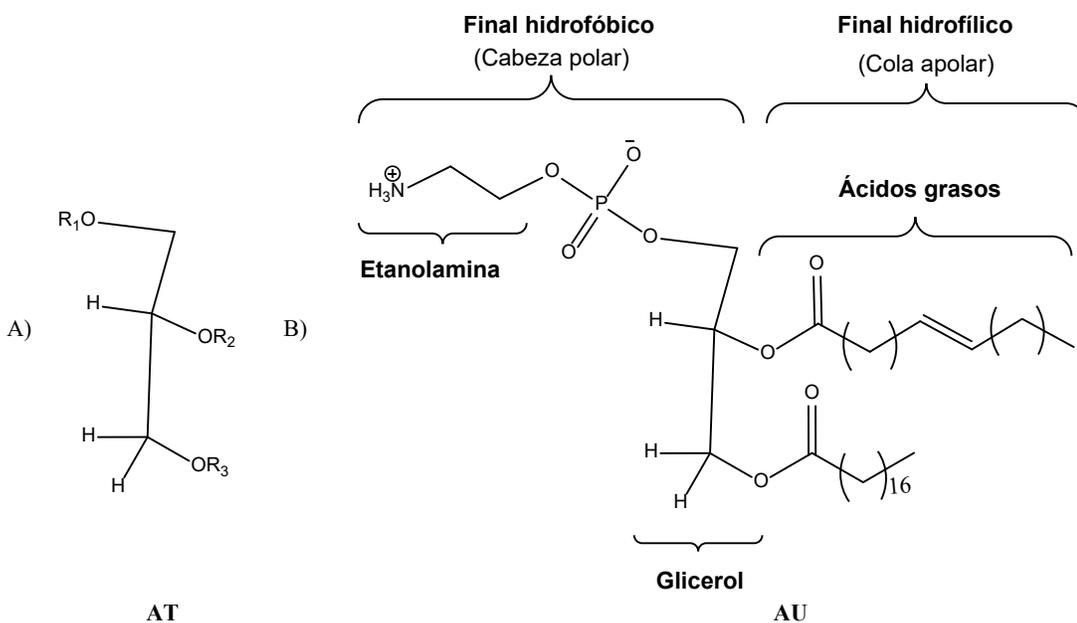


Figura 37. A) Estructura básica de un glicerofosfolípido (AT), compuestos por dos ácidos grasos, R₂ y R₃, una unidad de glicerol central, un grupo fosfato y una cabeza polar variable, R₁. B) Estructura de la fosfatidiletanolamina (AU) como fosfolípido en su forma zwitteriónica ⁶¹.

Específicamente para colesterol, el estudio de la permeabilidad sobre las membranas fosfolipídicas, desarrollado por Papahadjopoulos y colaboradores, mostró una disminución en la permeabilidad y conducción eléctrica en dichas membranas al ser expuestas a dicho estero.

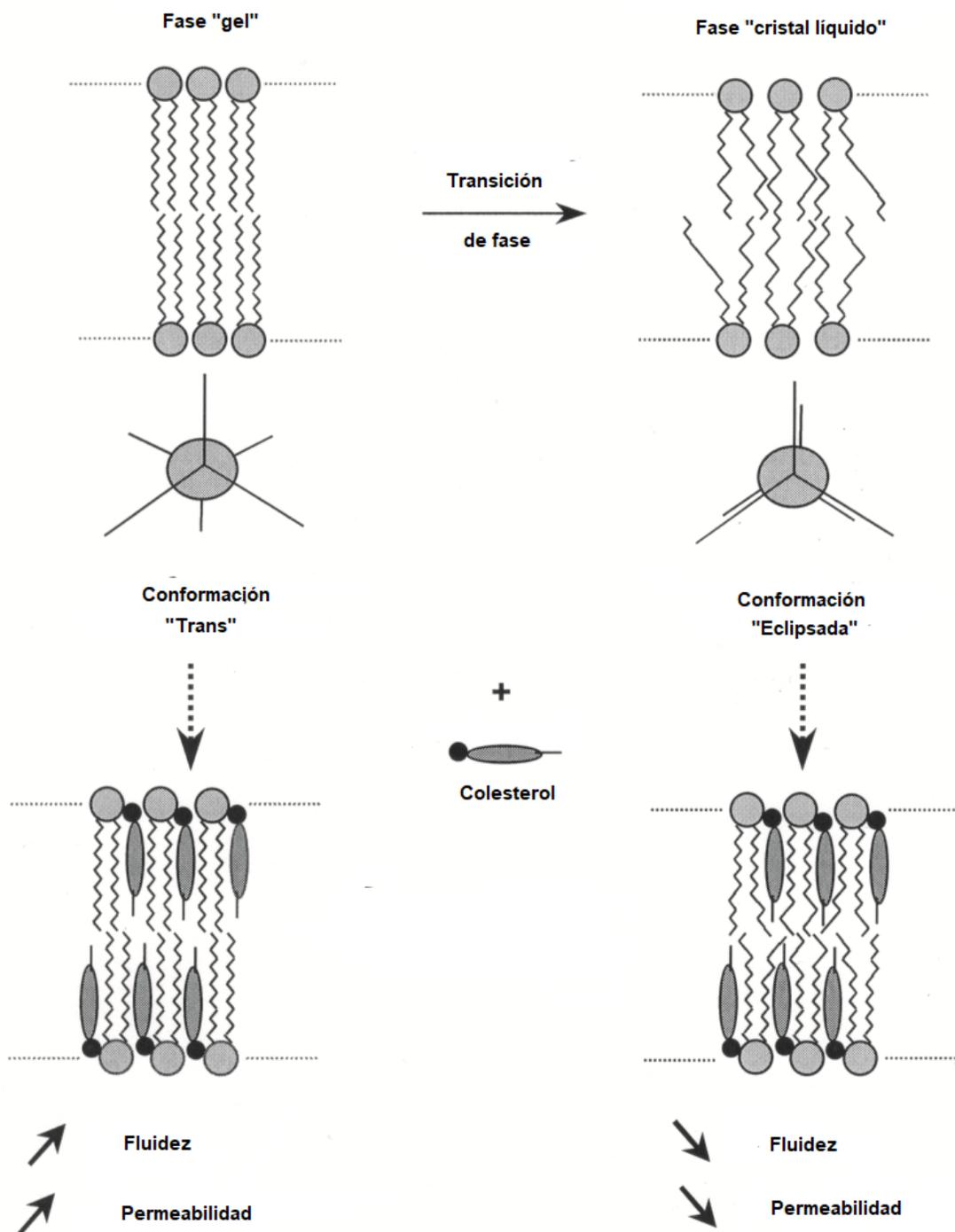


Figura 38. Comportamiento de fase de las membranas lipídicas y efecto del colesterol ⁶⁰.

Estos cambios provocan que no exista un flujo adecuado de especies neutras e iónicas, como son el agua, anión cloruro, glucosa y otras moléculas neutras, lo cual genera una disminución en el movimiento molecular y, en consecuencia, un incremento en el *packing* observado en las monocapas, producido por la presencia de colesterol ⁵⁷. La figura 38 muestra los cambios estructurales producidos por la presencia de colesterol.

Esta información descrita en este apartado ayudará a comprender la relación estructural generada entre los metabolitos secundarios, como también los compuestos hemisintetizados testeados, frente a las bacterias ensayadas y el probable mecanismo de acción antibacterial.

Hipótesis de la investigación.

La derivatización de ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol, como metabolito secundario mayoritario aislado desde *C. magellanicus* y *S. granulatus* conducirá a moléculas con un mejorado potencial antimicrobiano.

Objetivos de la investigación.

Objetivo general.

El objetivo fundamental de esta tesis doctoral es la obtención de metabolitos secundarios activos presentes en el cuerpo fructífero de hongos nativos de Chile, la derivatización y evaluación de la actividad antimicrobiana de estos metabolitos secundarios, así como también, los compuestos hemisintéticos preparados.

Objetivos específicos.

- Caracterizar la constitución química de los cuerpos fructíferos de *Cortinarius magellanicus* y *Suillus granulatus* que crecen en ecosistemas patagónicos u otros.
- Derivatizar y caracterizar, a través de métodos espectroscópicos y espectrométricos convencionales, los metabolitos secundarios esteroidales a sus correspondientes ergosta-3-onas, que pueden contener en el C3 un grupo cetona, en el C5 un grupo hidroxilo, en el C6 una función eter o un grupo cetona, y en C2-C3 el fragmento 1*H*-indol utilizando diversos métodos sintéticos.
- Evaluar la actividad antimicrobiana de los compuestos esteroidales y sus derivados mediante el uso del método de difusión en agar.
- Evaluar la actividad antimicrobiana de los compuestos esteroidales y sus derivados mediante la determinación la concentración mínima inhibitoria.

2 Parte experimental.

Los espectros de resonancia magnética nuclear para los compuestos aislados y hemisintetizados se registraron en el espectrómetro multidimensional Bruker Avance III HD-400 a 400,13 MHz para RMN ^1H y 100,03 MHz para RMN ^{13}C . El análisis de rayos X se realizó en el difractómetro Bruker D8 QUEST equipado con un detector bidimensional CMOS Photon100 utilizando radiación de grafito monocromado Mo-K α . Los espectros IR se midieron utilizando una película delgada sobre un espectrofotómetro Spectrum Two FT-IR, con una resolución espectral de 0,5 cm^{-1} . La TLC se realizó en láminas pre-recubiertas con gel de sílice F₂₅₄ para controlar las reacciones y donde fueron visualizadas con luz ultravioleta, solución 10% ácido sulfúrico/metanol y reactivo de Dragendorff. La purificación se realizó en Isolera One utilizando una columna Biotage® Ultra 10g HP-sphere de 25 μm . La cromatografía de exclusión se llevó a cabo utilizando Sephadex LH-20. Los productos crudos fueron purificados por cromatografía en columna sobre gel de sílice grado 60 (0,063-0,200 mm). Los espectros de masas fueron tomados en un CG Agilent 7890A con una columna HP 5MS acoplado con un detector Agilent 5975C. Para la realización de los experimentos *in vitro* se utilizaron bacterias tipo ATCC.

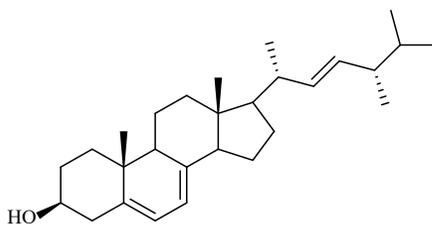
Se utilizaron los siguientes reactivos y solventes, los que fueron adquiridos comercialmente:

Clorocromato de piridinio, zinc metálico, cloruro de amonio, nitrito de sodio, carbonato de calcio, hidróxido de sodio, ácido clorhídrico 35,0 %, anilina 99,5 %, 4-bromoanilina, 4-nitrobenzoniitrilo, ácido 4-toluensulfónico, cloruro de estaño, 4-aminobenzoniitrilo, tamiz molecular de 3 Å, celite, 4-nitrobenzoniitrilo, ácido clorhídrico 32,0 %, éter etílico, etanol, diclorometano, acetato de etilo, n-hexano, benceno, tolueno y acetona.

2.1 Aislamiento de metabolitos secundarios provenientes del cuerpo fructífero de *Cortinarius magellanicus*.

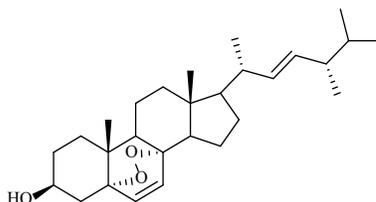
Los cuerpos fructíferos de *Cortinarius magellanicus* Speg. se recolectaron en Tierra del fuego, en abril de 2012. El espécimen vivo se depositó en el fungario de la Universidad de Concepción con la clave RM 199. Los hongos secos (32,65 g) fueron macerados hasta obtener un polvo fino, el que se extrajo con metanol a temperatura ambiente. Después de filtrar, el disolvente se evaporó usando presión reducida formando una goma y un precipitado. La goma (5,79 g) se disolvió en una mezcla de n-hexano-diclorometano-metanol en proporción 3:2:1 y se fraccionó usando una columna de sephadex LH-20. La fracción que contenía los metabolitos secundarios principales (2,38 g) se purificó empleando una columna Biotage® ultra de 10 g en un gradiente diclorometano-acetona como fase móvil, donde se aislaron 3 metabolitos: **CM 1**, **CM 2** y **CM 3**.

- **Ergosta-5,7,22-trien-3β-ol (CM 1).**



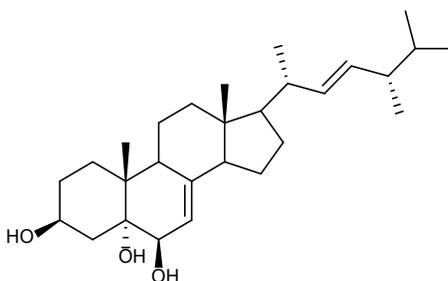
RMN-¹H (δ ppm, CDCl₃, 400 MHz): 0,62 (s, 3H, -CH₃), 0,81 (*d*, J= 7,27, 3H, -CH₃), 0,84 (*d*, J= 7,27, 3H, -CH₃), 0,92 (*d*, J= 6,82, 3H, -CH₃), 0,94 (s, 3H, -CH₃), 1,01 (s, 3H, -CH₃), 1,04 (*d*, J= 7,20, 1H, CH) 3,72 (*m*, 1H), 5,14 (*dd*, J=8,35, 7,38, 1H, CH=CH), 5,20 (*dd*, J=8,35, 7,05, 1H, -CH=CH), 5,42 (*dd*, J=5,77, 2,81, 1H, CH=CH), 5,63 (*dd*, J=5,77, 2,57, 1H, CH=CH). **RMN-¹³C** (δ ppm, CDCl₃, 100 MHz): 12,05 (CH₃), 16,28 (CH₃), 17,64 (CH₃), 19,96 (CH₃), 19,97 (CH₃), 21,12 (CH₃), 70,45 (CH), 116,4 (CH), 119,6 (CH), 132,0 (CH), 135,6 (CH).

- **Ergosta-5,8-epidioxi-6,22-dien-3 β -ol (CM 2),**



RMN-¹H (δ ppm, CDCl₃, 400 MHz): 0,81 (s, 3H, -CH₃), 0,88 (*d*, *J*= 8,35, 3H, -CH₃), 0,84 (*d*, *J*= 8,35, 3H, -CH₃), 0,89 (s, 3H, -CH₃), 0,91 (*d*, *J*= 6,81, 3H, -CH₃), 1,01 (*d*, *J*=6,81, 3H, -CH₃), 3,98 (*m*), 5,16 (*dd*, *J*=8,35, 7,38, 1H, CH=CH), 5,25 (*dd*, *J*=8,35, 7,05, 1H, -CH=CH), 6,24 (*d*, *J*=7,85, 1H, CH=CH), 6,50 (*d*, *J*=7,85, 1H, CH=CH). **RMN-¹³C** (δ ppm, CDCl₃, 100 MHz): 12,9 (CH₃), 17,6 (CH₃), 18,2 (CH₃), 19,7 (CH₃), 20,0 (CH₃), 21,0 (CH₃), 30,1 (CH₂), 34,7 (CH₂), 36,9 (C), 37,0 (CH₂), 39,7 (CH), 51,1 (CH), 56,2 (CH), 66,6 (CH), 79,8 (C), 82,2 (C), 83,10 (C), 130,8 (CH), 131,1 (CH), 132,3 (CH), 135,2 (CH), 135,4 (CH), 138,8 (CH).

- **Ergosta-7,22-dien-3 β ,5 α ,6 β -triol (CM 3),**



RMN-¹H (δ ppm, CDCl₃, 400 MHz): 0,60 (s, 3H, -CH₃), 0,83 (*d*, *J*= 6,80, 3H, -CH₃), 0,85 (*d*, *J*= 6,80, 3H, -CH₃), 0,91 (*d*, *J*= 6,91, 3H, -CH₃), 1,02 (*d*, *J*=6,67, 3H, -CH₃), 1,08 (s, 3H, -CH₃), 3,67 (*d*, *J*= 4,85, H, -CH), 4,03 (*m*, 1H), 4,65 (*s*, 1H), 5,16 (*dd*, *J*=15,4, 7,18, 1H, CH=CH), 5,21 (*dd*, *J*=15,4, 7,91, 1H, -CH=CH), 5,34 (*m*, 1H, C=CH). **RMN-¹³C** (δ ppm, CDCl₃, 100 MHz): 13,25

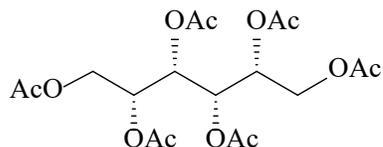
(CH₃), 17,95 (CH₃), 18,57 (CH₃), 20,03 (CH₃), 20,34 (CH₃), 21,26 (CH₃), 67,28 (CH), 72,91 (CH), 75,43 (C), 117,6 (CH), 131,8 (CH), 135,6 (CH), 141,4 (C).

2.2 Acetilación de metabolitos secundarios polares.

Desde el precipitado proveniente de *C. magellanicus*, se realizó el control cromatográfico en capa fina utilizando, como fase estacionaria, RP-18 en una mezcla 50% H₂O/MeOH. De este modo, se logró identificar cuatro componentes, los cuales fueron acilados utilizando el siguiente método sintético.

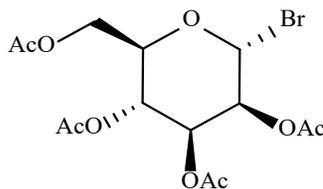
En un balón de fondo redondo de 50 mL equipado con una barra magnética fue cargado el sólido obtenido (350 mg) en piridina anhidra (1 mL). Tras la completa disolución, se añadió un exceso de anhídrido acético y donde la mezcla de reacción se agitó durante 6 horas a temperatura ambiente. Tras la completa derivatización de los componentes, la mezcla fue diluida con agua y salmuera para luego ser extraída utilizando diclorometano (3 x 10 mL). La fase orgánica se secó utilizando sulfato de sodio anhidro y el solvente se evaporó bajo presión reducida. La fracción acetilada se adsorbió en un samplet de Biotage® SNAP Ultra de 1 g y se eluyó usando una columna Biotage® Ultra de 10 g en gradiente n-hexano/AcOEt con cantidades crecientes de AcOEt, en base a los parámetros proporcionados por el sistema de aislamiento cromatográfico acelerado (ACI) para obtener 4 metabolitos: **CM 4, CM 5, CM 6 y CM 7.**

- **1,2,3,4,5,6-hexaacetato de hexanoilo (CM-4).**



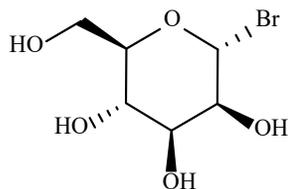
RMN-¹H (δ ppm, CDCl₃, 400 MHz): 1,81 (*s*, CH₃), 1,85 (*s*, CH₃), 1,90 (*s*, CH₃), 4,02 (*dd*, J=12,6, 5,11, 1H, CH), 4,17 (*dd*, J=12,6, 2,56, 1H, CH), 5,03 (*m*, 1H, CH), 5,41 (*d*, J=9,09, 1H, CH), **RMN-¹³C** (δ ppm, CDCl₃, 100 MHz): 20,92 (CH), 20,99 (CH), 21,18 (CH), 62,21 (CH₂), 67,82 (CH), 68,23 (CH), 170,02 (C=O), 170,21 (C=O), 170,86 (C=O), **EM-IE** (*m/z*): (int, rel.): 375 [M]⁺ (2), 289 (12), 217 (14), 145 (17), 73 (4),

- **Bromuro de 2,3,4,6-tetraacetilglucopiranosilo (CM-5).**



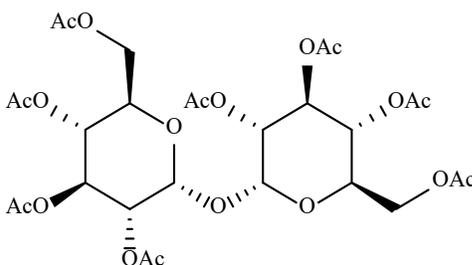
RMN-¹H (δ ppm, CDCl₃, 400 MHz): 1,99 (*s*, 3H, CH₃), 2,01 (*s*, 3H, CH₃), 2,03 (*s*, 3H, CH₃), 2,04 (*s*, 3H, CH₃), 3,94 (*dd*, J=12,7, 10,3, 1H, CH), 3,99 (*dd*, J=8,30, 6,07, 1H, CH₂), 4,17 (*dd*, J=12,7, 5,57, 1H, CH), 4,96 (*m*, 1H, CH), 4,98 (*m*, 1H, CH), 5,22 (*d*, J=3,90, 1H, CH), 5,42 (*t*, J= 12,7, 10,3, 1H, CH), **RMN-¹³C** (δ ppm, CDCl₃, 100 MHz): 20,16 (CH₃), 20,26 (CH₃), 20,34 (CH₃), 20,36 (CH₃), 61,68 (CH₂), 68,94 (CH), 69,17 (CH), 70,41 (CH), 77,80 (CH), 92,5 (CH), 169,5 (C=O), 169,6 (C=O), 169,8 (C=O), 170,3 (C=O), **FT-IR** (KBr, ν_{\max} cm⁻¹): 1751, 1742, 618, **EM-IE** (*m/z*): (int, rel.): 412 [M+2]⁺ (9), 411 [M+1]⁺ (10), 331 (7), 169 (41), 81 (5).

- **Bromuro de 2,3,4,6-tetrahidroxiglucopiranosilo (CM-6).**



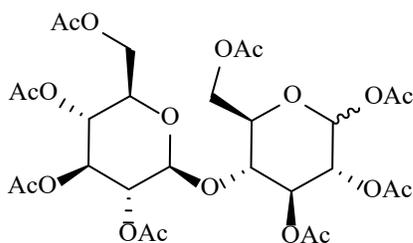
RMN-¹H (δ ppm, CDCl₃, 400 MHz): 3,31 (*t*, J=9,30, 1H, CH), 3,50 (*dd*, J=9,93, 3,65, 1H, CH), 3,61 (*m*, 1H, CH), 3,65 (*m*, 2H, CH₂), 3,70 (*m*, 1H, CH), 3,70 (*m*, 1H, CH), 5,05 (*d*, J= 3,6, 1H, CH), **RMN-¹³C** (δ ppm, CDCl₃, 100 MHz): 60,44 (CH₂), 69,91 (CH), 70,98 (CH), 72,10 (CH), 72,42 (CH), 93,15 (CH).

- **α -D-glucopiranosil(1-1')- α -D-glucopiranosido (CM-7).**



RMN-¹H (δ ppm, CDCl₃, 400 MHz): 2,04 (*s*, 3H, CH₃), 2,05 (*s*, 3H, CH₃), 2,08 (*s*, 3H, CH₃), 2,09 (*s*, 3H, CH₃), 4,00 (*m*, 1H, CH₂), 4,06 (*m*, 1H, CH₂), 4,23 (*m*, 1H, CH₂), 5,03 (*m*, 1H, CH), 5,05 (*m*, 1H, CH), 5,30 (*d*, J=4,52, 1H, CH), 5,48 (*q*, J=10,1, 9,92, 1H, CH), **RMN-¹³C** (δ ppm, CDCl₃, 100 MHz): 19,66 (CH₃), 19,78 (CH₃), 19,88 (CH₃), 19,90 (CH₃), 61,81 (CH₂), 67,42 (CH), 67,89 (CH), 68,60 (CH), 68,79 (CH), 91,42 (CH), 169,06 (C=O), 169,15 (C=O), 169,33 (C=O), 169,85 (C=O).

- **β -D-glucopiranosil(1-4')- β -D-glucopiranososa (CM-8).**



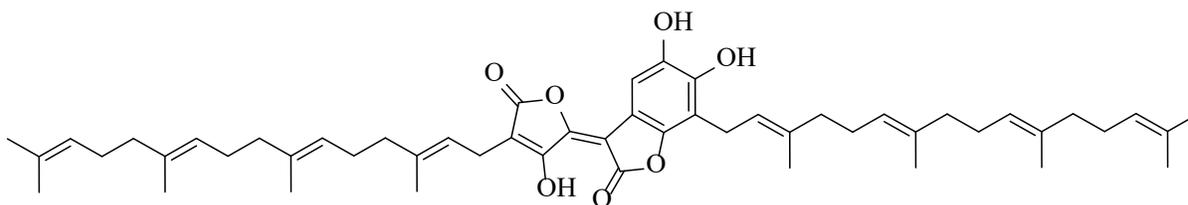
RMN-¹H (δ ppm, CDCl₃, 400 MHz): 1,75 (*s*, 3H, CH₃), 1,76 (*s*, 3H, CH₃), 1,79 (*s*, 3H, CH₃), 1,81 (*s*, 3H, CH₃), 1,82 (*s*, 3H, CH₃), 1,83 (*s*, 3H, CH₃), 1,84 (*s*, 3H, CH₃), 1,85 (*s*, 3H, CH₃), 4,19 (*m*, 2H, CH), 4,20 (*m*, 2H, CH), 4,43 (*m*, 2H, CH), 5,00 (*m*, 1H, CH), 5,02 (*m*, 1H, CH), 5,38 (*d*, J=3,6 Hz, CH), 5,40 (*d*, J=3,8 Hz, CH), 5,83 (*m*, 1H, CH), 5,87 (*m*, 1H, CH), **RMN-¹³C** (δ ppm, CDCl₃, 100 MHz): 19,65 (CH₃), 19,87 (CH₃), 19,91 (CH₃), 19,94 (CH₃), 19,97 (CH₃), 19,99 (CH₃), 20,01 (CH₃), 20,16 (CH₃), 61,18 (CH₂), 61,84 (CH₂), 68,59 (CH), 68,62 (CH), 68,96 (CH), 69,14 (CH), 69,66 (CH), 70,14 (CH), 70,16 (CH), 91,04 (CH), 91,26 (CH), 168,79 (C=O), 168,96 (C=O), 169,02 (C=O), 169,12 (C=O), 169,30 (C=O), 169,80 (C=O), 169,81 (C=O), 169,99 (C=O).

2.3 Aislamiento de metabolitos secundarios provenientes del cuerpo fructífero de *Suillus granulatus*.

La recolección de los especímenes de *Suillus granulatus* se llevó a cabo en la quinta región de Valparaíso, específicamente en la ruta F-800, coordenadas 33°11'14.6"S 71°32'48.0"W. El espécimen vivo se depositó en el fungario de la Universidad de Concepción con la clave SG1. Los hongos húmedos (20,1 Kg) fueron macerados y extraídos utilizando mezcla de disolventes en igual proporción (n-hexano/diclorometano/acetato de etilo). A partir del extracto crudo se efectuaron consecutivos tratamientos cromatográficos. En una primera etapa, el fraccionamiento se efectuó utilizando cromatografía flash en un gradiente de 0 a 100 % de una mezcla hexano/acetato de etilo con aumento de la proporción de AcOEt, para obtener 15 fracciones. El control cromatográfico en capa fina mostró que las F-4 y F-7 se encontraban MS mayoritarios.

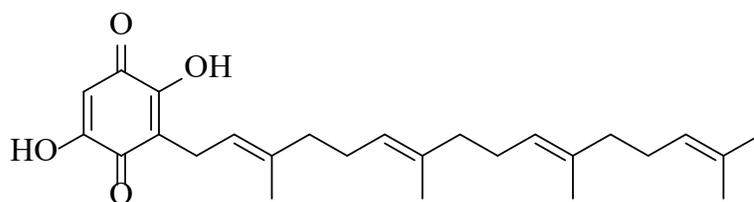
Para F-4, la purificación se centró en utilizar cromatografía de exclusión, específicamente Sephadex LH-20, utilizando como fase móvil mezclas de solventes lipófilos, que en una primera instancia se empleó una proporción 20:3:1 como también, en una segunda ocasión, con mezcla 20:5:0.5 de hexano:diclorometano:metanol, para aislar los compuestos denominados **SG-1**, que es una sustancia oleosa de color rojo oscuro, y **SG-2**, sustancia aceitosa de color café. Para F-7, debido a la naturaleza polar de los componentes de la mezcla, se efectuó la purificación por cromatografía en columna utilizando como gradiente de 0 a 10% de una mezcla de diclorometano/acetona, con cantidades crecientes de acetona, para obtener 10 fracciones. El control cromatográfico en capa fina mostró que la F-7 contenía el MS mayoritario. Es fracción fue recristalizada utilizando difusión de vapor con acetato de etilo como solvente de la muestra y hexano como solvente externo, en un sistema cerrado. De esta manera se obtuvo un compuesto cristalino, de color amarillo claro, que se denominó **SG-3**.

- **4,4'-bovilactona (SG 1).**



RMN-¹H (δ ppm, CDCl₃, 400 MHz): 1,59 (*s*), 1,59 (*s*), 1,67 (*s*), 1,67 (*s*), 1,74 (*s*), 1,81 (*s*), 3,08 (*d*, J=7,29, 2H, CH₂), 3,45 (*d*, J=7,29, 2H, CH₂), 5,08 (*m*), 5,08 (*m*), 5,08 (*m*), 5,08 (*m*), 5,08 (*m*), 5,08 (*m*), 5,25 (*t*, J=7,48, 1H, CH), 5,30 (*t*, J=7,35, 1H, CH), 5,71 (*s*, 1H, OH), 6,13 (*s*, 1H, OH), 7,29 (*s*, 1H, C₆H₁), 11,73 (*s*, 1H, OH), **RMN-¹³C** (δ ppm, CDCl₃, 100 MHz): 16,14 (CH₃), 16,14 (CH₃), 16,20 (CH₃), 16,20 (CH₃), 16,37 (CH₃), 16,44 (CH₃), 17,84 (CH₂), 17,84 (CH₂), 20,95 (CH₂), 23,17 (CH₂), 25,85 (CH₂), 25,85 (CH₂), 26,42 (CH₂), 26,90 (CH₂), 26,90 (CH₂), 39,85 (CH₂), 39,85 (CH₂), 39,85 (CH₂), 39,85 (CH₂), 39,85 (CH₂), 39,85 (CH₂), 107,22 (C), 107,76 (C), 109,09 (C), 112,53 (C), 112,88 (CH), 118,12 (CH), 119,74 (CH), 123,68 (CH), 124,27 (CH), 124,27 (CH), 124,36 (CH), 124,36 (CH), 131,42 (C), 131,42 (C), 135,20 (C), 135,20 (C), 135,20 (C), 135,20 (C), 138,41 (C), 139,61 (C), 141,59 (C), 146,23 (C), 147,26 (C), 150,81 (C), 161,57 (C), 167,86 (C), 173,39 (C).

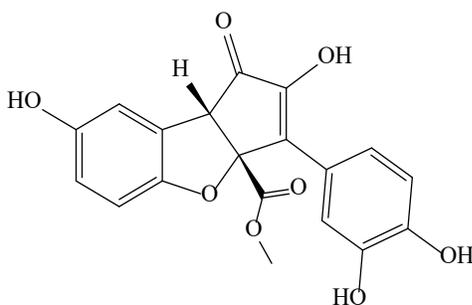
- **Boviquinona-4 (SG 2).**



RMN-¹H (δ ppm, CDCl₃, 400 MHz): 1,56-1,61 (*s*, 1H CH₃), 1,67 (*s*, 1H CH₃), 1,74 (*s*, 1H CH₃), 1,92-2,11 (*m*, 1H, CH), 3,16 (*d*, J=7,34, 2H, CH₂), 6,00 (*s*, 1H, CH), **RMN-¹³C** (δ ppm, CDCl₃,

100 MHz): 16,06 (CH₃), 16,09 (CH₃), 16,20 (CH₃), 17,80 (CH₃), 21,70 (CH₂), 25,80 (CH₃), 26,50 (CH₂), 26,70 (CH₂), 26,80 (CH₂), 39,76 (CH₂), 39,78 (CH₂), 102,3 (CH), 116,1 (C), 119,3 (CH), 120,0 (CH), 124,1 (CH), 124,5 (CH), 131,5 (C), 135,0 (C), 135,1 (C), 137,7 (C), 151,3 (C), 159,6 (C), 182,2 (C=O), 182,6 (C=O).

- **Suillusin (SG 3).**

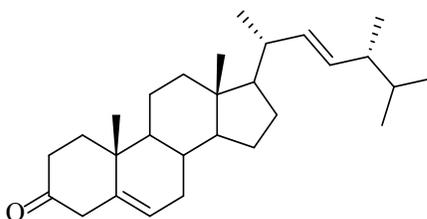


RMN-¹H (δ ppm, CDCl₃, 400 MHz): 3,73 (*s*, 3H, CH₃), 4,16 (*s*, H, CH), 6,64 (*dd*, J=8,65, 2,54, 1H, CH), 6,69 (*d*, J=8,65, 1H, CH), 6,80 (*d*, J=8,45, 1H, CH), 6,83 (*d*, J=2,50, 1H, CH), 7,44 (*dd*, J=8,49, 2,17, 1H, CH), 7,65 (*d*, J=2,15, 1H, CH), **RMN-¹³C** (δ ppm, CDCl₃, 100 MHz): 53,70 (CH₃), 56,81 (CH), 91,90 (C), 111,69 (CH), 112,17 (CH), 116,16 (CH), 117,02 (CH), 117,33 (CH), 122,70 (CH), 123,85 (C), 125,33 (C), 137,10 (C), 146,16 (C), 148,23 (C), 151,16 (C), 153,40 (C), 153,75 (C), 173,49 (C=O), 197,92 (C=O).

2.4 Oxidación de ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol utilizando clorocromato de piridinio.

En un balón de dos bocas, cargado con una barra magnética, 10 mmol (3,97 g) de ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol se adicionaron sobre 100 mL CH₂Cl₂ seco hasta su completa disolución. Posteriormente, se añadió consecutivamente 1,20 g de tamiz molecular activado de 3 Å, 500 mg de CaCO₃, 1,00 g de celite y se agitó durante 30 min a 0 °C. Luego de ese tiempo, se añadió lentamente 11 mmol (2,37 g) de PCC y se agitó durante 12 horas manteniendo constante la temperatura del sistema. Luego de corroborar la completa reacción del esteroide, se añadió 20 mL de isopropanol para consumir el oxidante restante. El crudo se purificó utilizando CC como también cromatografía semi-preparativa asistida por Isolera one en gradientes de n-hexano/AcOEt, como también CH₂Cl₂/(CH₃)₂CO, en donde se obtuvo 5 ergosta-3-onas denominadas **OX 1-5**.

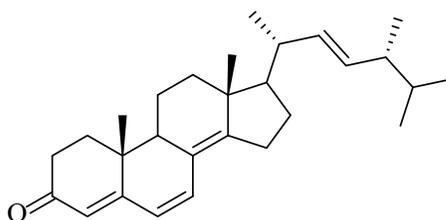
- **Ergosta-5,22-dien-3-ona (OX 1).**



Rendimiento: 1,5 %, **RMN-¹H** (δ ppm, CDCl₃, 400 MHz): 0,57 (*s*, 3H, CH₃), 0,82 (*d*, J=6,42, 3H, CH₃), 0,84 (*d*, J=6,42, 3H, CH₃), 0,91 (*d*, J=6,42, 3H, CH₃), 1,01 (*s*, 3H, CH₃), 1,02 (*d*, J=6,42, 3H, CH₃), 1,38 (*m*, 1H, CH), 1,48 (*m*, 2H, CH₂), 1,87 (*m*, 2H, CH₂), 1,89 (*m*, 2H, CH₂), 2,13 (*ddd*, J=23,4, 6,05, 5,50, 1H, CH₂), 2,27 (*d*, J= 14,7, 1H, CH₂), 2,42 (*ddd*, J= 14,9, 6,17, 5,82, 1H, CH₂), 5,16 (*dd*, J= 16,18, 7,87, 1H, CH=CH), 5,19 (*m*, 1H, C=CH), 5,22 (*m*, 1H, C=CH), 5,71 ppm (*t*, J= 5,75, 2,45 Hz), **RMN-¹³C** (δ ppm, CDCl₃, 100 MHz): 12,45 (CH₃), 17,60 (CH₃), 19,95 (CH₃),

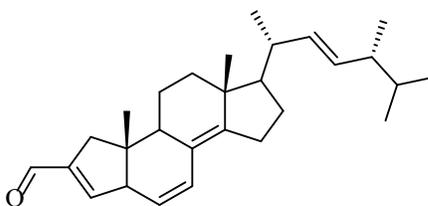
19,64 (CH₃), 21,12 (CH₃), 21,70 (CH₃), 29,70 (CH₂), 30,05 (CH), 38,12 (CH₂), 43,28 (CH₂), 44,25 (CH₂), 117,0 (CH), 132,0 (CH), 135,6 (CH), 139,5 (C), 212,1 (C=O).

- **Ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona (OX 2).**



Rendimiento: 12 %, **RMN-¹H** (δ ppm, CDCl₃, 400 MHz): 0,83 (*d*, J=6,68, 3H, CH₃), 0,85 (*d*, J=6,71, 3H, CH₃), 0,93 (*d*, J=6,82, 3H, CH₃), 0,95 (*s*, 3H, CH₃), 0,99 (*s*, 3H, CH₃), 1,05 (*d*, J=6,70, 3H, CH₃), 1,80 (*m*, 2H, CH₂), 2,04 (*m*, 2H, CH₂), 2,13 (*m*, 1H, CH), 5,22 (*dd*, J=15,1, 8,02, 1H, CH=CH), 5,24 (*dd*, J=15,1, 8,21, 1H, CH=CH), 5,73 (*s*, 1H, CH=C), 6,03 (*d*, J=9,03, 1H, CH=CH), 6,60 (*d*, J=9,45, 1H, CH=CH), **RMN-¹³C** (δ ppm, CDCl₃, 100 MHz): 16,66 (CH₃), 17,64 (CH₃), 18,96 (CH₃), 19,00 (CH₃), 19,67 (CH₃), 21,23 (CH), 34,13 (CH₂), 34,15 (CH₂), 39,28 (CH), 123,1 (CH), 124,5 (CH), 132,6 (CH), 134,0 (CH), 135,0 (CH), 199,5 (C=O), **TF-IR** (film, ν_{max} cm⁻¹): 3053, 2954, 2871, 2850, 2824, 1714, 1669, 968, 831.

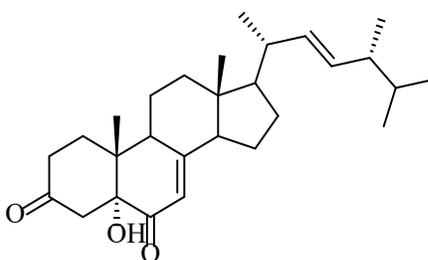
- **A-norergosta-2,5,7,22-tetraen-2-carbaldehído (OX 3).**



Rendimiento: 9 %, **RMN-¹H** (δ ppm, CDCl₃, 400 MHz): 0,65 (*s*, 3H, CH₃), 0,74 (*s*, 3H, CH₃), 0,83 (*d*, J=6,48, 3H, CH₃), 0,84 (*d*, J=6,54, 3H, CH₃), 0,92 (*d*, J=6,76, 3H, CH₃), 1,06 (*d*, J=6,64, 3H, CH₃), 2,03 (*m*, 1H, CH), 2,19 (*d*, J=16,6, 1H, CH), 2,62 (*d*, J=16,4, 1H, CH), 5,18 (*dd*, J=16,5,

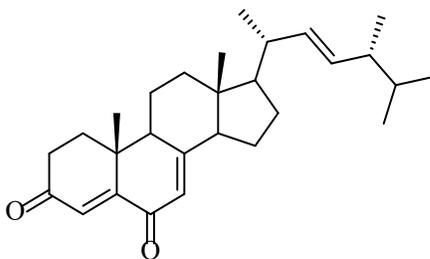
8,87 1H, CH=CH), 5,22 (*dd*, $J=16,3$, 8,20, H, CH=CH), 5,80 (*d*, $J=5,80$, 1H, CH=CH), 6,33 (*d*, $J=5,80$, 1H, CH=CH), 7,08 (*s*, 1H, CH=C), 9,89 (*s*, 1H, CHO), **RMN-¹³C** (δ ppm, CDCl₃, 100 MHz): 12,37 (CH₃), 18,47 (CH₃), 17,53 (CH₃), 19,57 (CH₃), 19,95 (CH₃), 21,21 (CH₃), 40,13 (CH), 41,27 (C), 42,82 (CH₂), 44,91 (CH), 118,7 (CH), 122,3 (CH), 132,4 (CH), 135,3 (CH), 145,6 (CH), 146,5 (C), 148,5 (C), 150,1 (C), 190,3 (CHO).

- **5 α -hidroxi-ergosta-7,22-dien-3,6-diona (OX 4).**



Rendimiento: 45 %, **RMN-¹H** (400 MHz, CDCl₃, δ ppm): 0,55 (*s*, 3H, CH₃), 0,73 (*d*, $J=6,6$, 3H, CH₃), 0,75 (*d*, $J=6,6$, 3H, CH₃), 0,83 (*d*, $J=6,8$, 3H, CH₃), 0,98 (*d*, $J=6,6$, 3H, CH₃), 1,04 (*s*, 3H, CH₃), 1,78 (*m*, 1H, CH), 1,84 (*m*, 1H, CH₂), 2,13 (*m*, 1H, CH₂), 2,49 (*d*, $J=16,0$, 1H, CH₂), 2,52 (*d*, $J=16,0$, 1H, CH₂), 2,49 (*d*, $J=13,0$, 1H, CH₂), 2,61 (*t*, $J=9,17$, 6,77, 1H, CH), 2,66 (*d*, $J=13,0$, 1H, CH₂), 3,00 (*s*, 1H), 4,04 (*s*, 1H), 5,16 (*dd*, $J=15,2$, 8,10, 1H, CH=CH), 5,25 (*dd*, $J=15,2$, 8,15, 1H, CH=CH), 5,58 (*s*, 1H, CH=C), **RMN-¹³C** (100 MHz, CDCl₃, δ ppm): 12,65 (CH₃), 15,61 (CH₃), 17,48 (CH₃), 19,54 (CH₃), 19,78 (CH₃), 21,03 (CH₃), 21,95 (CH₂), 22,42 (CH₂), 27,78 (CH₂), 31,74 (CH₂), 31,99 (CH₂), 33,48 (CH), 37,28 (CH₂), 40,86 (CH), 40,91 (C), 42,76 (CH₂), 43,67 (CH), 44,12 (CH), 44,59 (CH₂), 55,72 (CH), 55,96 (CH), 79,89 (C), 119,4 (CH), 132,47 (CH), 134,95 (CH), 166,2 (C), 197,0 (C=O), 210,1 (C=O).

- **Ergosta-4,7,22-trien-3,6-diona (OX 5).**

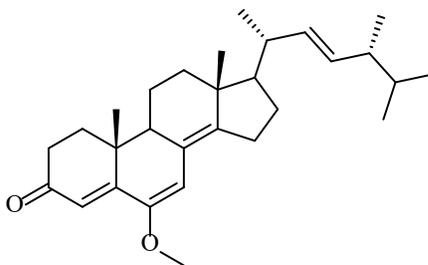


Rendimiento: 5 %, **RMN-¹H** (δ ppm, CDCl₃, 400 MHz): 0,69 (*s*, 3H, CH₃), 0,82 (*d*, J=6,40, 3H, CH₃), 0,85 (*d*, J=6,31, 3H, CH₃), 0,87 (*d*, J=6,52, 3H, CH₃), 1,05 (*d*, J=6,57, 3H, CH₃), 1,30 (*s*, 3H, CH₃), 1,79 (*m*, 2H, CH₂), 2,48 (*m*, 2H, CH₂), 3,32 (*d*, J=7,03, 2H, CH₂), 5,18 ppm (*dd*, J= 15,2, 7,12 Hz, 1H), 5,23 ppm (*dd*, J= 15,2, 7,12 Hz, 1H), 5,98 (*s*, 1H, CH), 6,48 (*s*, 1H, CH), **RMN-¹³C** (δ ppm, CDCl₃, 100 MHz): 12,63 (CH₃), 15,59 (CH₃), 17,48 (CH₃), 19,52 (CH₃), 19,88 (CH₃), 21,04 (CH₃), 32,34 (CH₂), 42,80 (CH₂), 121,5 (CH), 127,9 (CH₂), 132,3 (CH), 135,0 (CH), 144,3 (C), 149,1 (CH), 147,9 (C), 159,0 (C), 195,3 (C=O), 211,4 (C=O).

2.5 Síntesis de 6-alcoxi ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-onas.

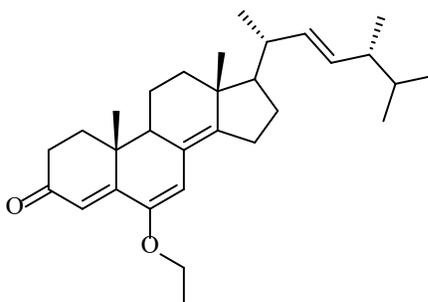
En un matraz de fondo redondo cargado con una barra magnética, se añadieron 0,12 mmol (50 mg) de 5 α -hidroxi-7,22-dien-3,6-diona en 10 mL del alcohol (metanol o etanol). Luego de su disolución, se añadieron 0,1 mL de ácido clorhídrico donde la solución fue agitada durante 4 horas a temperatura ambiente. Una vez completada la reacción, el crudo se concentró al vacío, se re-suspendió en agua y se neutralizó con 5 mL de una solución acuosa de NaHCO₃ al 10% donde se extrajo tres veces con 5 mL de diclorometano. La fase orgánica se lavó con salmuera y agua (5 mL cada una), se secó con sulfato de sodio anhidro y se evaporó a presión reducida. El producto fue recristalización por evaporación lenta para obtener el compuesto deseado.

- **6-metoxi-ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one (OX 6).**



Rendimiento: 67 %. **RMN-¹H** (400 MHz, CDCl₃, δ ppm): 0,83 (*d*, J = 6,8 Hz, 3H, CH₃), 0,85 (*d*, J = 6,8 Hz, 3H, CH₃), 0,93 (*d*, J = 5,5 Hz, 3H, CH₃), 0,94 (*s*, 3H, CH₃), 1,00 (*s*, 3H, CH₃), 1,06 (*d*, J = 6,7 Hz, 3H, CH₃), 3,67 (*s*, 3H, CH₃), 5,18-5,29 (*m*, 2H, CH=CH), 5,85 (*s*, 1H, CH=C), 6,25 (*s*, 1H, CH=C), **RMN-¹³C** (100 MHz, CDCl₃, δ ppm): 14,61 (CH₃), 16,86 (CH₃), 17,67 (CH₃), 18,90 (CH₃), 19,23 (CH₃), 19,67 (CH₃), 19,99 (CH₃), 21,24 (CH₃), 25,52 (CH₂), 27,88 (CH₂), 33,11 (CH), 34,01 (CH₂), 34,43 (CH₂), 35,62 (CH₂), 37,06 (C), 39,34 (CH), 42,90 (CH), 43,82 (C), 44,43 (CH), 56,30 (CH), 63,48 (CH₃), 106,70 (CH), 119,19 (CH), 122,69 (C), 132,4 (CH), 135,2 (CH), 149,40 (C), 150,29 (C), 158,85 (C), 199,63 (C=O).

- **6-etoxi-ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one (OX 7).**



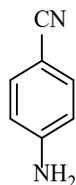
Rendimiento: 69 %, **RMN-¹H** (400 MHz, CDCl₃, δ ppm): 0,80 (*d*, J=6,8, 3H, CH₃), 0,82 (*d*, J=6,7, 3H, CH₃), 0,90 (*d*, J=6,6, 3H, CH₃), 0,91 (*s*, 3H), 0,98 (*s*, 3H), 1,03 (*d*, J=6,6, 3H, CH₃), 1,31 (*t*, J=6,9, 3H, CH₃), 3,78 (*q*, 1H, CH₂), 3,86 (*q*, 1H, CH₂), 5,18-5,23 (*m*, 2H, CH=CH), 5,81 (*s*, 1H,

CH=C), 6,28 (s, 1H, C=CH), **RMN-¹³C** (100 MHz, CDCl₃, δ ppm): 14,59 (CH₃), 16,86 (CH₃), 17,67 (CH₃), 18,90 (CH₃), 19,22 (CH₃), 19,67 (CH₃), 19,99 (CH₃), 21,24 (CH₃), 25,50 (CH₂), 27,88 (CH₂), 33,12 (CH₂), 34,01 (CH₂), 34,47 (CH₂), 35,61 (CH₂), 39,04 (C), 39,34 (CH), 42,90 (CH), 43,81 (C), 44,41 (CH), 56,08 (CH), 63,34 (CH₂), 107,59 (CH), 119,14 (CH), 122,83 (C), 132,42 (CH), 135,19 (CH), 148,68 (C), 150,14 (C), 159,15 (C), 199,80 (C=O).

2.6 Reducción de nitroarenos a sus respectivas anilinas.

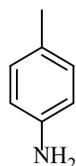
En un balón de dos bocas se tomó 1 mmol del nitroareno a reducir en 7 mL de la H₂O hasta una completa disolución. Posteriormente, se añadió 2 mmol (361,1 mg) de NH₄Cl y 7,25 mmol (449,3 mg) de zinc metálico a temperatura ambiente con constante agitación. Luego de que esta mezcla fuese agitada durante 30 min a 80 °C, los residuos insolubles son filtrados y lavados con AcOEt (15 mL, tres veces). La fase orgánica es lavada con agua, salmuera, secada con Na₂SO₄ y evaporada a presión reducida para obtener la anilina deseada.

- **4-aminobenzonitrilo (An 1).**



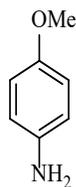
Rendimiento: 65,7 %. **FT-IR** (KBr, ν_{\max} cm⁻¹): 3381, 3174, 2200, 1603, 851. **P. fusión** 85-87 °C.

- **4-toluidina (An 2).**



Rendimiento: 60,1 %. **TF-IR** (KBr, ν_{\max} cm⁻¹): 3366, 3166, 849. **P. fusión** 44 °C.

- **4-anisidina (An 3).**



Rendimiento: 66,9 %. **TF-IR** (KBr, ν_{\max} cm^{-1}): 3350, 3153, 1630, 840. **P. fusión** 57 °C.

2.7 Síntesis de clorhidratos de hidracina a partir de las respectivas anilinas sustituidas.

En un balón de dos bocas se agregó 1 mmol de la anilina a diazotar, la que se disolvió en 1 mL de HCl concentrado a 0 °C hasta formar el precipitado correspondiente al cloruro de anilinio. Luego, 1,1 mmol (75,9 mg) de NaNO_2 son disueltos en 0,5 mL de H_2O fría y se añadió en pequeñas porciones con el fin de no elevar la temperatura de la reacción por sobre los 5 °C. Luego, a la solución completamente transparente, se añadió lentamente 5 mmol (0,95 g) de SnCl_2 anhidro disueltos en 1 mL de HCl concentrado previamente enfriado a 0 °C teniendo precaución de no agitar vigorosamente el sistema hasta formar una pasta, la cual, se filtra al vacío y se lava con Et_2O frío y EtOH para obtener el correspondiente clorhidrato de arilhidracina (**Ar 1-3**).

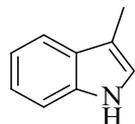
2.8 Síntesis de ergosta-[2,3;*b*]-1*H*-indol mediante la síntesis de Fischer.

2.9 Síntesis de 3-metil-1*H*-indol.

En un balón de dos bocas se añadió 0,44 mmol (83,7 mg) de ácido p-toluensulfónico monohidrato en 20 mL de C_6H_6 y se reflujo por 2 horas bajo condiciones Dean-Stark. Al enfriar el sistema, 4 mmol (578,4 mg) de clorhidrato de fenilhidracina, 4 mmol (0,27 mL) de 2-propanona y cantidades catalíticas de ácido p-toluensulfónico monohidrato fueron añadidos. La mezcla fue reflujo con constante agitación durante toda la noche. Luego de enfriar, una solución de NaHCO_3 saturada es añadida para neutralizar la reacción. La mezcla es extraída con AcOEt (2x10 mL) y la

fase orgánica combinada es extraída con 5 mL de NaHCO₃, 5 mL de H₂O, 5 mL salmuera respectivamente para luego ser secada con Na₂SO₄ y concentrada bajo presión reducida. El producto crudo es purificado por columna cromatográfica usando hexano/AcOEt para obtener un sólido blanco (**In 0**).

- **3-metil-1H-indol (In 0).**

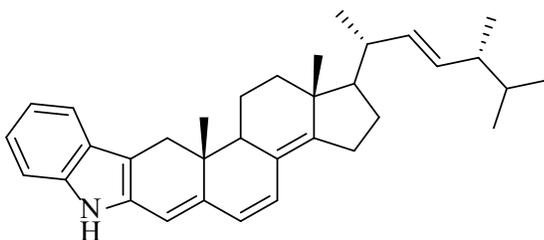


Rendimiento: 76%. **TF-IR** (KBr, ν_{\max} cm⁻¹): 3518, 3070, 724. **P. fusión** 93-95 °C.

2.10 Síntesis de ergosta-[2,3;*b*]-1H-indol utilizando la síntesis de Fischer.

En un balón de dos bocas se añadió 0,05 mmol (9,51 mg) de ácido p-toluensulfónico monohidrato en 2 mL de C₆H₆ seco y se refluxó por 2 horas bajo condiciones *Dean-Stark*. Al enfriar la reacción, 0,04 mmol del clorhidrato de aril hidracina, 0,04 mmol (15,7 mg) de ergosta-5,7,22-trien-3-ona y 0,0006 mmol (1.1 mg) de ácido p-toluensulfónico monohidrato fueron añadidos para luego refluxar con constante agitación durante 12 horas. Luego de enfriar, una solución de NaHCO₃ saturada es añadida para neutralizar la reacción. La mezcla es extraída con AcOEt (2x10 mL) y la fase orgánica combinada es extraída con 5 mL de NaHCO₃, 5 mL de H₂O, 5 mL salmuera respectivamente para luego ser secada con Na₂SO₄ y concentrada bajo presión reducida. El producto crudo es purificado por columna cromatográfica usando hexano/AcOEt para obtener un sólido (**In 1-3**).

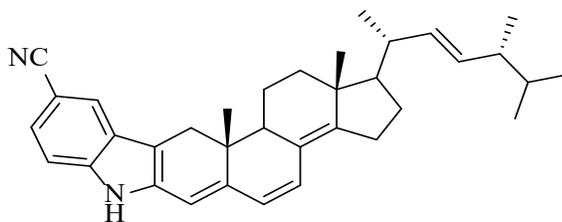
- **Ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-[2,3;*b*]-1*H*-indol (In 1).**



Rendimiento: 61 %. **FT-IR** (film, cm^{-1}) ν_{max} 3409, 3074, 2958, 2854, 1662, 1261, 973, 806, 766.

RMN-¹H (δ ppm, CDCl_3 , 400 MHz): 5,21 (*dd*, $J= 15,1, 8,39$, 1H, CH=CH), 5,24 (*dd*, $J= 15,10, 8,39$, 1H, CH=CH), 6,04 (*d*, $J= 9,5$, 1H, CH=CH), 6,08 (*s*, CH=C), 6,27 (*d*, $J= 9,5$, 1H, CH=CH), 6,84 (*t*, $J= 7,13$, 1H, C_6H_3), 7,08 (*d*, $J= 7,9$, 1H, C_6H_3), 7,25 (*d*, $J= 8,1$, 1H, C_6H_3), **RMN-¹³C** (δ ppm, CDCl_3 , 100 MHz): 110,3 (CH), 112,9 (C), 119,3 (CH), 120,2 (CH), 123,3 (CH), 125,6 (C), 132,2 (C), 135,3 (C).

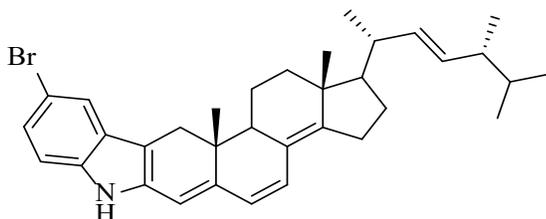
- **Ergosta-4,6,8(14),22-tetraen[2,3;*b*]-5-ciano-1*H*-indol (In 2),**



Rendimiento: 60 %, **FT-IR** (film, cm^{-1}) ν_{max} 3417, 2961, 2926, 2871, 2855, 2228, 1669, 1261, 866, 801, **RMN-¹H** (δ ppm, CDCl_3 , 400 MHz): 5,21 (*dd*, $J= 15,00, 8,40$, 1H, CH=CH), 5,24 (*dd*, $J= 15,10, 8,39$, 1H, CH=CH), 6,04 (*d*, $J= 9,5$, 1H, CH=CH), 6,07 (*s*, CH=C), 6,27 (*d*, $J= 9,5$, 1H, CH=CH), 6,94 (*t*, $J= 7,13$, 1H, C_6H_3), 7,34 (*d*, $J= 7,9$, 1H, C_6H_3), 7,58 (*d*, $J= 8,1$, 1H, C_6H_3), **RMN-**

^{13}C (δ ppm, CDCl_3 , 100 MHz): 110,3 (CH), 112,9 (C), 118,7 (CH), 120,2 (CH), 123,13 (CH), 124,73 (CH), 125,6 (C), 132,07 (CH), 132,13 (CH), 134 (CH), 135,3 (C).

- **Ergosta-4,6,8(14),22-tetraen[2,3;*b*]-5-bromo-1*H*-indol (In 3),**



Rendimiento: 64%, **FT-IR** (film, cm^{-1}) ν_{max} 3368, 3051, 2960, 2852, 1588, 1261, 861, 801, 640,

RMN- ^1H (δ ppm, CDCl_3 , 400 MHz): 5,20 (*dd*, $J= 15,0, 7,91$, 1H, CH=CH), 5,23 (*dd*, $J= 15,10, 8,39$, 1H, CH=CH), 5,92 (*d*, $J= 9,3$, 1H, CH=CH), 6,09 (*s*, CH=C), 6,19 (*d*, $J= 9,5$, 1H, CH=CH), 7,32 (*dd*, $J= 8,5, 2,9$, 1H, C_6H_3), 7,58 (*d*, $J= 3,1$, 1H, C_6H_3), 7,78 (*d*, $J= 8,3$, 1H, C_6H_3), **RMN- ^{13}C** (δ ppm, CDCl_3 , 100 MHz): 110,3 (CH), 112,9 (C), 118,7 (CH), 120,2 (CH), 123,13 (CH), 124,73 (CH), 125,6 (C), 132,07 (CH), 132,13 (CH), 134 (CH), 135,3 (C).

2.11 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los compuestos frente a bacterias Gram positivas y negativas.

La determinación de la actividad antimicrobiana de los compuestos hemisintetizados se llevó a cabo utilizando el método de difusión en disco y difusión en caldo frente a cepas bacterianas Gram positivas y negativas del *American type culture collection* correspondientes a *Bacillus subtilis* ATCC® 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Streptococcus pyogenes* ATCC 700294, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Escherichia coli* ATCC 35218 y *Salmonella sp.* utilizando como control positivo estreptomicina.

2.11.1 Preparación y cultivo de los microorganismos.

2.11.1.1 Preparación de estándares de turbidez de McFarland.

Estos estándares se utilizan como referencia en suspensiones bacteriológicas para conocer el número de bacterias por mL, o más bien en unidades formadoras de colonias (UFC), según una escala que va de 0,5 a 10. Estos estándares son creados al mezclar soluciones de cloruro de bario con ácido sulfúrico al 0,18 M en volúmenes específicos. Para asegurar la correcta densidad de la turbidez, se utiliza la medida de la absorbancia usando un espectrofotómetro. A una longitud de onda de 625 nm, el estándar 0,5 debe poseer una absorbancia que va entre 0,08 y 0,13.

La preparación de este último se realizó mediante el siguiente procedimiento:

- Se prepara una solución stock de concentración 0.048 mol/L de BaCl₂ o 1,175% p/v de BaCl₂·2H₂O.
- Se prepara una solución stock de concentración 0,18 mol/L de H₂SO₄.
- Con constante agitación, se añade 0,5 mL de la solución de BaCl₂ a 99,5 mL de la solución stock de H₂SO₄.
- Transferir 4 a 6 mL de la suspensión de BaSO₄ a tubos con rosca.
- De esta manera, la suspensión formada corresponde a un número total aproximado de $1,5 \cdot 10^8$ bacterias por mL de suspensión.

2.11.1.2 Cultivo de los microorganismos.

La preparación de los inóculos se realizó utilizando las cepas del *American type culture collection* correspondientes a *Bacillus subtilis* ATCC® 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Streptococcus pyogenes* ATCC 700294 y *Salmonella spp.*

El inóculo se preparó haciendo directamente un caldo de las colonias aisladas desde la placa de

agar, con 24 horas, en un medio no selectivo. La suspensión se ajusta hasta obtener la densidad de la turbiedad necesaria utilizando el estándar McFarland 0,5, según el método indicado en la sección anterior, con el fin de obtener una concentración de 10^8 CFU/mL.

2.11.1.3 Inoculación de los microorganismos.

2.11.1.3.1 Preparación del medio solido de cultivo.

El tipo de medio de cultivo a utilizad debe poseer varias propiedades que lo deben hacen ideal para el uso de antibióticos sobre él. En primer lugar, debe ser un medio no selectivo y no diferencial, lo que significa que prácticamente todos los microorganismos cultivados deben crecer en su superficie. En este contexto, el medio Mueller-Hinton cumple con esta característica, debido a la proporción de los componentes que lo constituyen, y que permitirán una mejor difusión de los posibles antibióticos, por lo que se observarán zonas de inhibición verdaderas.

A partir de la formula deshidratada del medio Mueller-Hinton, que contiene: 2,0 g de extracto de carne, 17,5 g de peptona de caseína, 1,5 g de almidón y 17,0 g de agar, se disuelven 38 g de la mezcla en 1 L de agua destilada y se ajusta a un pH de $7,3 \pm 0,1$ para luego autoclavar la solución preparada, Inmediatamente, se añade un volumen de 15 a 20 mL del medio en capsulas Petri de 100 o 150 mm hasta una altura de 4 mm de profundidad aproximadamente, las placas de cultivo preparadas deben ser usadas inmediatamente o almacenadas en bolsas de plástico entre 2 y 8 °C hasta un máximo de una semana antes de su uso,

2.11.1.3.2 Inoculación de las placas.

Las placas con agar MH fueron inoculadas utilizando el medio de cultivo líquido preparado previamente y que posee individualmente *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia*

coli, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes* y *Salmonella sp.* La inoculación de las placas siguió la siguiente secuencia:

1. Sumergir un hisopo estéril en el tubo del inóculo correspondiente.
2. Girar el hisopo contra el costado del tubo utilizando una presión firme para eliminar el exceso de líquido.
3. Inocular la superficie seca de una placa de agar MH pasando el hisopo tres veces por toda la superficie del agar; gire la placa aproximadamente 60 grados cada vez para asegurar una distribución pareja del inóculo.
4. Desechar el hisopo en un contenedor apropiado.
5. Dejar la tapa ligeramente entreabierta, permite que la placa se asiente a temperatura ambiente por lo menos de 3 a 5 minutos, para que la superficie de la placa de agar se seque antes de proceder al siguiente paso.

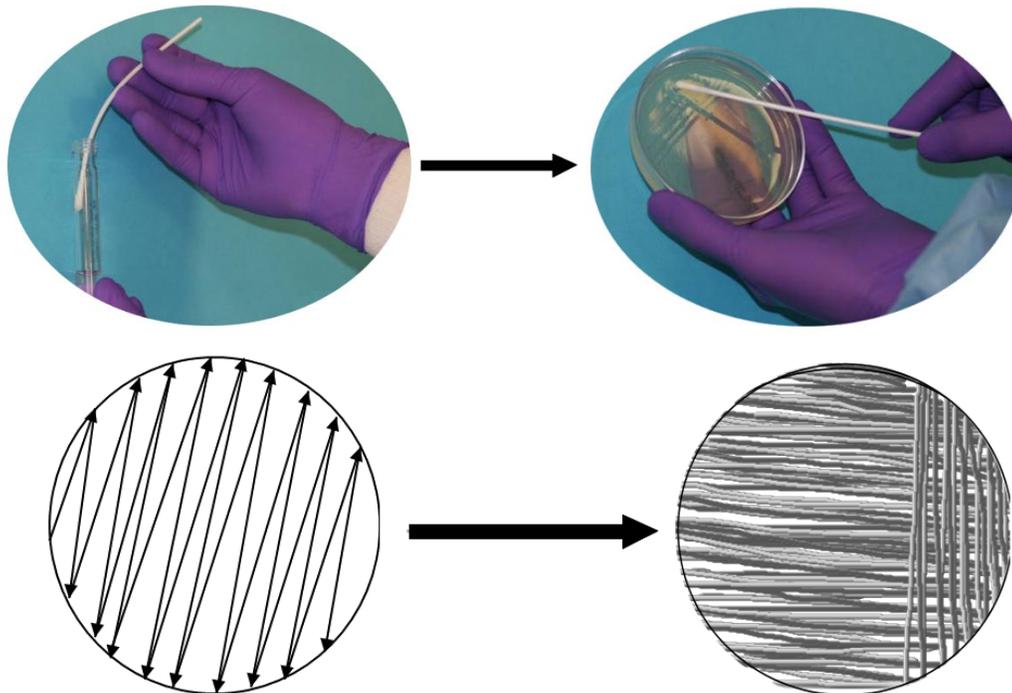


Figura 39. Proceso de aplicación del inóculo sobre la placa Petri para el ensayo de susceptibilidad antimicrobiana.

2.11.1.3.3 Aplicación de los compuestos con potencial actividad antimicrobiana.

Para la aplicación de los compuestos con potencial actividad antimicrobiana, se utilizan discos de papel Whatmann N°1 de 6 mm de diámetro. Cada disco utilizado es impregnado con una solución, de concentración 300 µg, de cada compuesto a ensayar. Los discos, se disponen sobre las placas de agar sembradas con el organismo de prueba. Durante el período de incubación, que se realiza durante 24 hrs a una temperatura de 37 °C, el potencial antibiótico se difunde desde el disco al medio e inhibe el crecimiento bacteriano. Después de este plazo de tiempo, es posible medir la zona inhibida por cada compuesto, donde el diámetro de esta zona determina si el organismo utilizado es susceptible, intermedio o resistente a los diversos antibióticos probados.

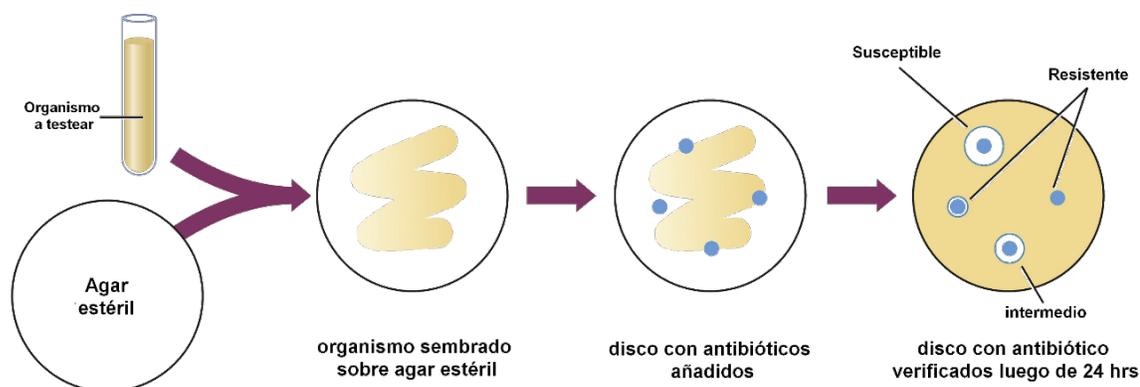


Figura 40. Etapas desarrolladas para la determinación de la susceptibilidad antimicrobiana de los compuestos sintetizados.

2.11.4 Ensayo de difusión en disco.

Las bacterias gran positivas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus sp.* y *Streptococcus mutans*), así como las Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*) fueron incubadas en placas BHI durante 24 horas a 37 °C. Al final de este tiempo, se tomaron colonias aisladas y fueron resuspendidas en solución salina fisiológica estéril para obtener un grado de turbidez McFarland

0,5. Con la suspensión, se realizó un césped bacteriano en medio MH con un hisopo estéril y se colocaron discos de papel previamente cargados con los compuestos a una concentración de 300 µg. Finalmente, se incubaron durante 24 horas a 37 °C y luego se observó la aparición de un halo de inhibición. Estreptomicina fue utilizado como control positivo mientras que dimetilsulfóxido fue empleado como control negativo.

2.11.5 Determinación de la concentración mínima inhibitoria.

La bacteria se incubó en una placa durante 24 horas a 37 °C. Al final de este período, se tomaron colonias aisladas y se re-suspendieron en solución salina fisiológica estéril para obtener un grado de turbidez Mc-Farland 0,5. En tubos de vidrio, se añadió medio de cultivo líquido MH y la suspensión bacteriana se inoculó en una proporción de 1:1000. En cada tubo, se añadió una alícuota del compuesto a una concentración de 10 mg/mL, para obtener concentraciones finales de 500, 400, 300, 200 y 100 µg/mL. Como control se usó: caldo de cultivo, caldo con bacterias y caldo con el compuesto. Se incubó 24 horas a 37 °C y se observó la presencia o ausencia de turbidez. DMSO se utilizó como control negativo.

2.12 Análisis estadístico.

Todos los resultados se analizaron utilizando técnicas de estadísticas descriptivas como la media y la desviación estándar. El análisis de la varianza de una vía, ANOVA en sus siglas en inglés, se empleó para evaluar la importancia y si estadísticamente existen diferencias significativas con $p < 0,05$ entre los grupos estudiados. La prueba de rango múltiple de Tukey se realizó para el análisis de parámetros múltiples. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software estadístico GraphPad Prism version 8.0.0, San Diego, California USA, www.graphpad.com.

3 Resultados y discusión.

3.1 Obtención de metabolitos secundarios de macrohongos estudiados.

3.1.1 Recolección de los especímenes a estudiar.

La recolección de los especímenes se llevó a cabo en dos zonas de nuestro país: en la zona central, que comprende la quinta región de Valparaíso, específicamente en la ruta F-800 coordenadas 33°11'14.6"S 71°32'48.0"W, y en la doceava región de Magallanes, específicamente en la Reserva Magallanes. Para la primera zona, se logró colectar 20,1 Kg de cuerpos fructíferos de *Suillus granulatus*. La identificación de este fue realizada utilizando los criterios señalados en el apartado 2.1.2 como también de la asesoría de biólogos pertenecientes al grupo de Química de Productos Naturales de la Universidad de Concepción liderados por el Dr. José Becerra Allende. Asimismo, para la zona dos, se colectó 320 mg de cuerpos fructíferos secos de *Cortinarius magellanicus*. Al igual que para *S. granulatus*, se utilizó una identificación utilizando las características físicas descritas en el apartado 1.2. Para ambas especies, se dispuso una muestra viva de los ejemplares colectados en el fungario de la Universidad de Concepción, que para *S. granulatus* la clave es SG01 y para *C. magellanicus* es RM01.

3.1.2 Obtención de los extractos.

Los hongos colectados fueron macerados y extraídos con mezclas de solvente correspondiente a hexano, diclorometano y acetato de etilo, todos en igual proporción de volumen. Este proceso se realizó tres veces y los volúmenes fueron secados utilizando sulfato de sodio anhidro y volatilizado utilizando presión reducida. donde se obtuvo las siguientes cantidades:

Tabla 6. Cantidad de extracto obtenido para los hongos estudiados.

Fuente del material	Extracto (g)	% Rendimiento
<i>S. granulatus</i>	257,00	12,23
<i>C. magellanicus</i>	0,95	1,625

3.1.3 Purificación de metabolitos secundarios principales desde el cuerpo fructífero de *S. granulatus*.

A partir del extracto crudo, se efectuaron consecutivos tratamientos cromatográficos. En una primera etapa, el fraccionamiento se efectuó utilizando cromatografía flash en un gradiente de 0 a 100 % de una mezcla hexano/acetato de etilo con aumento de la proporción de AcOEt donde se obtuvieron 15 fracciones. El control cromatográfico en capa fina mostró que F-4 y F-7 se encontraban MS con características similares. Para F-4, la purificación se centró en utilizar cromatografía de exclusión, específicamente Sephadex LH-20, utilizando como fase móvil mezclas de solventes lipófilicos, que en una primera instancia se empleó una proporción 20:3:1 como también, en una segunda ocasión, una mezcla 20:5:0,5 de hexano:CH₂Cl₂:MeOH, para aislar los compuestos denominados **SG 1** y **SG 2**.

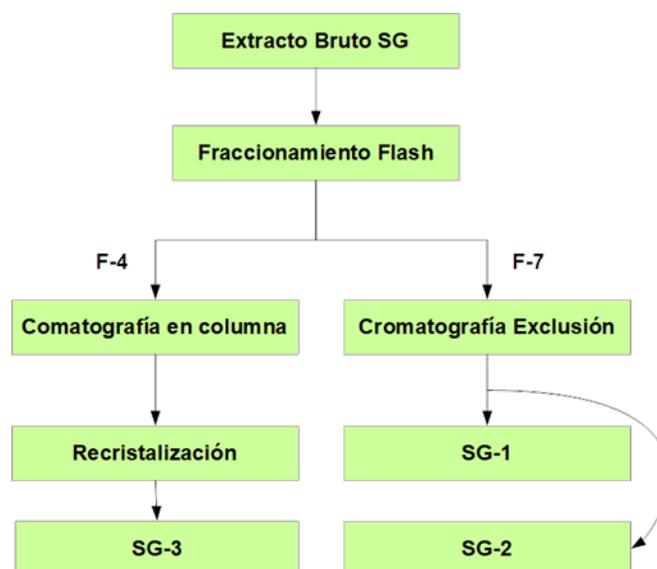


Figura 41. Etapas de la purificación de los MS de *S. granulatus*.

Para F-7, debido a la naturaleza polar de componente mayoritario, se efectuó la purificación utilizando CC en un gradiente de 0 a 10% de mezcla de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/(\text{CH}_3)_2\text{CO}$, con cantidades crecientes de acetona, para obtener 10 fracciones. El control cromatográfico en capa fina mostró que la F-7 contenía el MS mayoritario. Es así como F-7 fue recristalizada utilizando el método de difusión de vapor con AcOEt como solvente de la muestra y hexano como solvente externo en un sistema cerrado. De esta manera se obtuvo un compuesto cristalino denominado **SG 3**.

3.1.3.1 Caracterización estructural de los metabolitos secundarios aislados desde *S. granulatus*.

La caracterización estructural de **SG 1, 2 y 3** fue realizada mediante resonancia magnética nuclear en 1D y 2D. Para **SG 1**, se utilizó como solvente CDCl_3 para realizar los estudios espectroscópicos. El patrón de señales en RMN ^{13}C mostró la existencia de cincuenta y dos átomos de carbono, de los cuales, diez corresponden a metilos olefínicos, catorce metilenos vecinales a dobles enlaces, ocho metinos olefínicos y uno aromático, diez y nueve carbonos cuaternarios; donde ocho corresponden a C olefínicos, nueve a C aromáticos y dos C pertenecientes a una lactona. El δ_{H} para **SG 1** mostró señales consistentes a lo descrito por el Dept 135, donde destacan señales en la zona alifática, zona olefínica, zona aromática y como también una señal característica en δ 11,73 ppm (s) asociada a un hidroxilo quelado. Dentro de la zona alifática se encuentra agrupado el mayor número de las señales, las que son atribuidas a grupos CH_3 y CH_2 que están dispuestos en una cadena lineal. Dentro de este grupo se observan señales que poseen similar integral como multiplicidad pero que difieren en δ_{H} . Esto indica que **SG 1** posee dos cadenas laterales que contienen el mismo número de átomos de carbono. Dentro de estas cadenas laterales, las señales asignadas a 1' y 1'' se distinguen fácilmente utilizando el acoplamiento HMBC entre los protones del 1'' y los carbonilos posicionados en δ_{C} 167,57 ppm para C-10 y δ_{C} 167,86 ppm

para C-12. Adicionalmente, el acoplamiento HMBC permitió la diferenciación entre 2'/2'' y 3'/3'' y que, en conjunto con la utilización del espectro H-H COSY, se logró asignar el grupo 17'/17''.

Estos datos espectroscópicos fueron contrastados con la información propuesta por *Lang et al.*, la cual coincide con el desplazamiento químico observado, confirmando que la estructura corresponde a 3,11-digeranilgeranil-gomphilactona⁶². 4,4'-bovilactona o 3,11-digeranilgeranil-gomfilactona contiene un núcleo gomfilactona, el cual se caracteriza por contener una sección que contiene una 1,2-dihidroxibenzofuran-7-ona conectada, mediante un doble enlace cuaternario, a un anillo 10-hidroxifuran-12-ona. Este esqueleto es consistente con las señales observadas en δ_c 173,39 para C-7, δ_c 167,57 ppm para C-10 y δ_c 167,86 ppm para C-12, como también los hidroxilos aromáticos que poseen un δ_H para 1-OH, 2-OH y 10-OH de 5,71, 6,13 y 11,73 ppm respectivamente. En adición, este esqueleto posee sustituciones en C3 como en C11 por grupos geranilgeranilo. Estas señales observadas entre δ_H 1,50 y 5,25 ppm son atribuidas a los metilos, metilenos, metinos y carbonos cuaternarios para este fragmento, los cuales fueron coincidentes con la información de las técnicas espectroscópicas empleadas.

Para la elucidación estructural de **SG 2** se empleó solo RMN en 1D. En este caso, se observaron 26 señales en RMN ¹³C, y que al ser complementadas con la información del *DEPT* 135, se pueden desglosar en cinco metilos, siete metilenos, cinco metinos olefinicos y nueve carbonos cuaternarios, de los cuales siete pertenecen a alquenos y dos corresponden a cetonas. La RMN ¹H muestra señales similares a **SG 1** en la zona que comprende entre el δ_H 1,52 y 5,20 ppm, por lo que se presume que correspondería a un fragmento de geranilgeranilo. Se observa también solo una señal a alto campo correspondiente a un protón vecinal a una cetona atribuible a un núcleo benzoquinónico en δ_H 6,00 ppm (s, 1H). La asignación fue comparada con los datos

espectroscópicos expuestos por *Steglich et al.*, que correlaciona los datos espectroscópicos de **SG 2** con el MS boviquinona-4⁶³.

SG 3 se aisló como sólido amorfo color amarillo pardo, fue disuelto en CD₃OD para su caracterización estructural. El patrón de señales observados en RMN ¹³C muestra la presencia de 19 átomos de C, los cuales mediante Dept 135, se lograron identificar un grupo metilo, siete metinos, de los cuales seis corresponden a CH aromáticos y un alifático, once carbonos cuaternarios, de los cuales, cuatro corresponden a C fenólicos, cinco a C aromáticos y dos C cuaternario correspondiente a carbonilos. RMN ¹H reveló dos zonas principales, a campo alto se observa un δ_H 3,73 asignada a un CH₃ (*s*, 3H) vecino a un éster y un δ_H 4.16 ppm para un metino contenido en el fragmento 3-hidrobenzofurano mientras que, en la zona a bajo campo, se asocian hidrógenos aromáticos existentes. En esta zona se pudo identificar principalmente un número de hidrógenos correspondientes a dos anillos fenólicos; donde el primero corresponde al fragmento benzofurano, que se aprecia tres señales correspondientes a un benceno trisustituido. Esto se confirma mediante los acoplamientos de los hidrógenos aromáticos libres, 5, 6 y 8, que presentan multiplicidades consistentes con las sustituciones antes señaladas (6,69 (*d*, J=8,65, H-5); 6,64 (*dd*, J=8,67, 2,54, H-6) y 6,83 (*d*, J=2,40, H-8)). Para el segundo anillo aromático se observa acoplamientos consistentes con sustituciones en las posiciones 1', 3' y 4'. Las posiciones libres 2', 5' y 6' presentan multiplicidades de *d*, *d* y *dd* atribuible a acoplamientos orto y meta. Toda esta información es confirmada mediante el acoplamiento a larga distancia HMBC que conecta, para el anillo benzofurano, las posiciones 4a, 5, 6, 7, 8 y 8a mientras que el otro anillo aromático presenta conectividad entre las posiciones 1', 2', 3', 4', 5' y 6'. En adición, H-H COSY muestra los acoplamientos de los hidrógenos aromáticos en ambos anillos fenólicos.

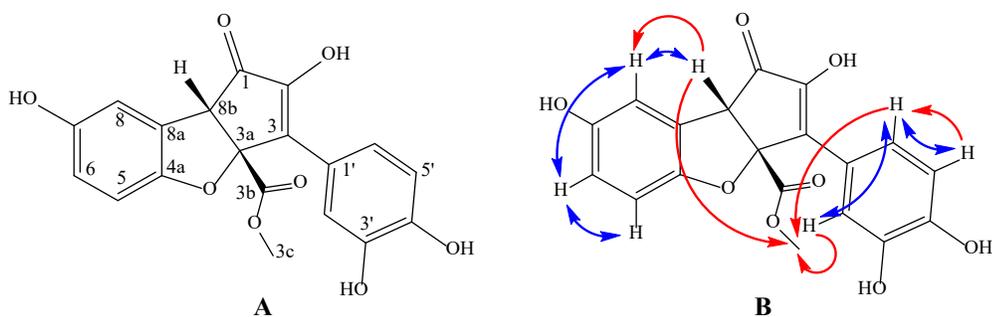


Figura 42. A) Estructura de **SG 3**. **B)** Acoplamiento observado: H-H COSY, en azul, y NOESY en rojo.

La estereoquímica para 3a y 8b fue confirmada mediante NOESY, indicando que ambos sustituyentes se encuentran sobre el mismo plano molecular, tal como se muestra en la figura 36-B. Lo antes expuesto fue contrastado con el trabajo de *Yun et al.*, que indica que la estructura para **SG 3** es suillusin⁶⁴.

3.1.4 Purificación de metabolitos secundarios mayoritarios desde el cuerpo fructífero de *S. granulatus* y *C. magellanicus*.

A partir de la disolución del extracto crudo en EtOH, se obtuvo, como precipitado, los azúcares estructurales arrastrados durante el proceso de extracción. Luego de ello, sobre la fase acuosa se utilizó cromatografía de exclusión, específicamente Sephadex LH-20 en un gradiente 3:2:1 (C₆H₁₄:CH₂Cl₂:MeOH), donde se obtuvieron 15 fracciones. El control cromatográfico en capa fina mostró que las fracciones 5-9 contenía los MS mayoritarios, lo cual dio pie a realizar sucesivas cromatografías en columna. Principalmente, se observó tres compuestos que poseen variados valores de R_f. Es por ello que se utilizó como gradiente una mezcla de CH₂Cl₂/(CH₃)₂CO con cantidades crecientes de (CH₃)₂CO. De este procedimiento se logró obtener tres compuestos cristalinos, color blanco, denominados **CM 1**, **CM 2** y **CM 3**.

Con el sólido obtenido de la precipitación metanólica, debido a las características polares que poseen sus componentes, se realizó el control cromatográfico en capa fina utilizando como fase estacionaria RP-18 en una mezcla 50% H₂O/MeOH. De este modo, se logró identificar cuatro componentes, los cuales fueron acetilados utilizando el método propuesto en el punto 2.2. Al verificar la completa reacción, la fracción acetilada se adsorbió en un samplet *Biotage® SNAP Ultra* de 1 g y se eluyó usando una columna *Biotage® Ultra* de 10 g en gradiente C₆H₁₄/AcOEt con cantidades crecientes de AcOEt, en base a los parámetros proporcionados por el sistema de aislamiento cromatográfico acelerado (ACI). De esta forma se obtuvieron distintos sólidos blancos amorfos denominado **CM 4**, **CM 5**, **CM 6**, **CM 7**. Para el compuesto **CM 4**, se procedió a desacetilar utilizando NaHCO₃ etanólico (10% m/v) para dar **CM 8**.

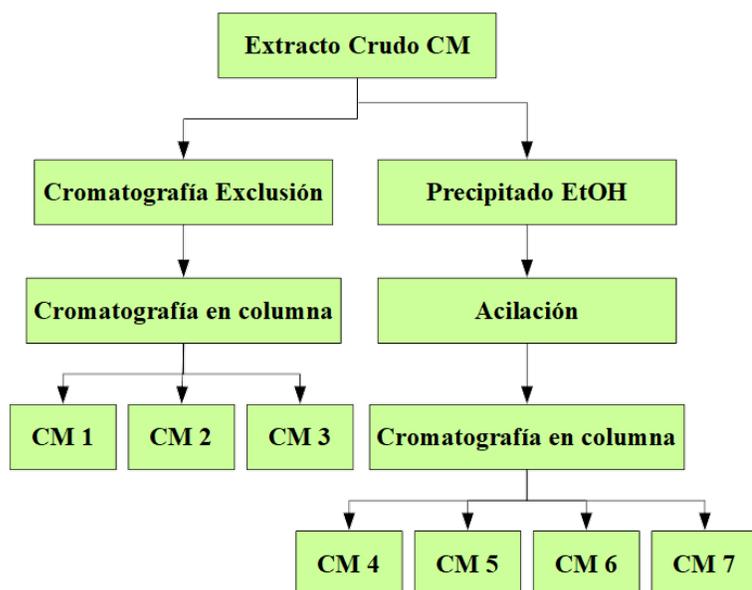


Figura 43. Diagrama de purificación de los principales MS proveniente de *C. magellanicus*.

3.1.4.1 Caracterización estructural de CM 1, CM 2 y CM 3 aislados desde *C. magellanicus*.

Posterior a la purificación de los MS de *C. magellanicus* CM 1-8, la caracterización estructural se llevó a cabo utilizando resonancia magnética nuclear de ^1H , ^{13}C , ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HMBC, ^1H - ^{13}C HSQC como también análisis de masas apoyado con la base de datos NIST 2005.

CM 1 es un sólido cristalino de color blanco amorfo que posee un punto de fusión de 170 °C. Los estudios espectroscópicos fueron realizados utilizando CDCl_3 como solvente deuterado. La RMN ^{13}C mostró 28 señales, las cuales representan a 6 metilos, 7 metilenos, 11 metinos, de los cuales, 4 corresponden a CH olefínicos y 7 alifáticos, y 4 carbonos cuaternarios. Tanto las características físicas como espectroscópicas demuestran que CM 1 contiene un núcleo esteroidal. Los esteroides son compuestos anfipáticos que se originan en la biosíntesis de isoprenoides, según lo expuesto en el punto 1.4.1, y que poseen una estructura asociada a un ciclopentanoperhidrofenantreno y una cadena lateral tal como se muestra en la figura 44.

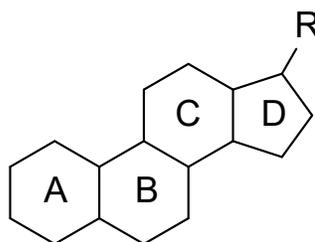


Figura 44. Esteroide tetracíclico base que contiene el esqueleto del anillo 1,2 ciclopentanoperhidrofenantreno.

Estos MS poseen cuatro dominios indispensables detallados en la figura 44 y que se deben considerar a la hora de elucidar una estructura. En el dominio A, que le confiere polaridad con la existencia del grupo hidroxilo en C3 que contribuye principalmente a las interacciones de puentes de hidrógeno. En el dominio B, los grupos metilos (Me-20) afecta la conformación del anillo A y la planaridad de la cara posterior. Alternativamente, el número y posición de los dobles enlaces en

este núcleo pueden afectar la forma del esteroide y la orientación del segmento 20. En el dominio C, la configuración absoluta en C 20, R, determina la conformación de la cadena lateral para orientar hacia la derecha. En el dominio D, la conformación y la longitud de la cadena lateral, además de la estereoquímica del grupo alquilo C 24 son fundamentales para los contactos intermoleculares.

Considerando lo anterior, es necesario analizar el δ_H que presentan los MS como también los acoplamientos que presentan los grupos metilos con el fin de determinar el esqueleto específico.

En este caso podemos observar seis señales asociadas a metilos, coincidentes con lo visualizado en ^{13}C , donde los singletes son las claves para la identificación del núcleo. En esta arista, se observan dos señales con un δ_H 0,63 ppm (*s*, 3H, H-18) y 0,95 ppm (*s*, 3H, H-19) asociadas a grupos CH_3 característicos para el núcleo ergostano ⁶⁵. Adicionalmente, los otros metilos poseen un desdoblamiento con multiplicidad *d*, los cuales, son coincidentes con los CH_3 encontrados en la cadena 5,6-dimetilhept-3-eno perteneciente al esqueleto ergostano, tal como se aprecia en la figura 45-A. Estos metilos tienen un δ_H de 0,81 (*d*, *J*= 7,27, CH_3 -26), 0,84 (*d*, *J*= 7,27, CH_3 -27), 0,92 (*d*, *J*= 6,82, CH_3 -28) y 1,04 (*d*, *J*= 7,2, CH_3 -21) ppm. La asignación se confirmó mediante el análisis de H^1-H^1 COSY, H^1-C^{13} HMBC como también H^1-C^{13} HSQC. Estos datos espectroscópicos de **CM 1** fueron verificados con los propuestos en la investigación desarrollada por *Qin et al.*, confirmando que la estructura de **CM 1** corresponde a ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol ⁶⁵.

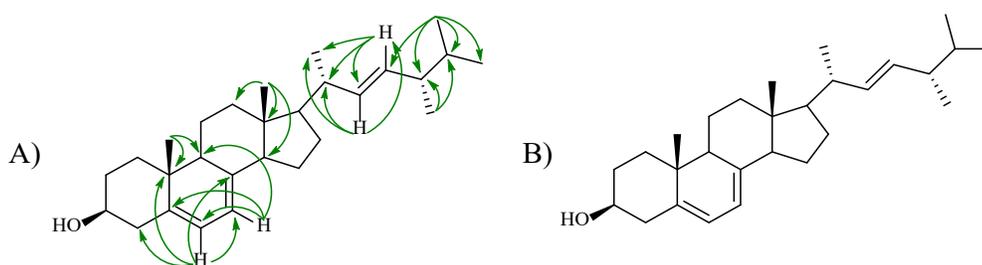


Figura 45. A) Principales correlaciones H-C HMBC observadas para CM 1. B) Estructura propuesta para CM 1.

Para **CM 2**, los análisis espectroscópicos mostraron igual número de átomos de carbono que **CM 1**. Principalmente en la RMN ^{13}C , se observaron 28 señales, las cuales corresponden a 6 metilos, 7 metilenos, 11 metinos, de los cuales 4 son olefínicos y 7 alifáticos, y cuatro carbonos cuaternarios. El δ_{H} mostró señales atribuidas a la existencia de la cadena de 5,6-dimetilhept-3-eno, confirmando que se trata de un derivado similar a **CM 1**. Se observan diferencias en el desplazamiento químico asignado a **CM 2** en δ_{H} 6,50 (*d*, $J= 7,85$ Hz, H-6) y 6,24 (*d*, $J= 7,58$ Hz, H-7) ppm atribuible a un grupo oxigenado atractor de electrones que provoca el desapantallamiento dichos metinos olefínicos. De igual manera, esta función afecta el desplazamiento en RMN ^{13}C , para las posiciones C-5 a C-8, donde se logra notar similar efecto en δ_{C} 138,8 (C-6) y 131,1 (C-7) ppm mientras que C-5 y C-8 presentan una magnitud de desplazamiento menor que las observadas en **CM 1**. El δ_{C} 79,82 (C-8) y 83,10 (C-5) ppm es característico a un carbono cuaternario unido a un oxígeno, por lo cual, se puede atribuir que **CM 1** sufrió a la sustitución en el dieno por una función oxigenada en las posiciones antes señaladas. Algunos autores indican que ciertos esteroides presentan la formación espontanea de grupos epidioxilos cuando poseen, en su estructura, dobles enlaces conjugados, tal como se muestra en la figura 46 ⁶⁶.

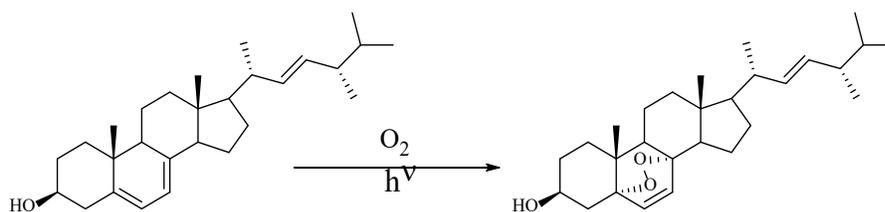


Figura 46. Síntesis espontánea de ergosta-5,8-epidioxi-6,22-dien-3 β -ol a partir de ergosterol.

En nuestro caso, para el género *Cortinarius*, se han descrito peróxidos derivados de ergosterol y que son consistentes con los datos espectroscópicos estructurales aportados por *Qin et al.* para identificar **CM 2** como ergosta-5,8-epidioxi-6,22-dien-3 β -ol ⁶⁵.

Para **CM 3**, se observan desplazamientos químicos consistentes con el núcleo ergostano. La RMN ^{13}C mostró la presencia de 28 átomos de carbonos, los cuales, corresponden a 6 metilos, 7 metilenos, 10 metinos (3 olefínicos y 7 alifáticos) y 4 carbonos cuaternarios. Al igual que los MS anteriores, este compuesto posee similar desplazamiento químico, para ^1H como ^{13}C , para la cadena lateral propio del esqueleto ergostano. Para los otros fragmentos, se observaron diferencias que son atribuidas a la oxidación de uno de los alquenos, principalmente el ubicado en las posiciones C-5 y C-6 del anillo B. Estos carbonos soportan sustituyentes asociados a grupos hidroxilos geminales que provocan un apantallamiento, en comparación con los desplazamientos percibidos en dichas posiciones en ergosterol, en un δ_{C} 75,43 (C, C-5) y 72,91 (CH, C-6) ppm. Asimismo, se observa un δ_{H} 3,61 (*d*, $J=4,8$, H-6) ppm para un protón geminal a un grupo hidroxilo como también un δ_{H} 3,67 (*s*, OH-5) y 4,65 (*sa*, OH-6) ppm asignados a dos grupos hidroxilos. Estos desplazamientos, contrastados con lo expuesto por *Jinming et al.* y *Nieto et al.*, confirman la presencia de un diol vecinal trans en las posiciones C5 y C6 del correspondiente anillo ^{67,68}.

Con el fin de confirmar la estructura propuesta para **CM 3**, se realizó un análisis *TOF-MS* en modo positivo, arrojando la fragmentación en la figura 47. Se observó un fragmento en 413 *m/z* que corresponde a una típica de una deshidratación. Otro fragmento importante es el asociado a la ruptura del grupo isopropilo en la cadena generando una señal en 370 *m/z* como también la pérdida de dos moléculas de agua, para generar el ión molecular con 319 *m/z*. Esta última señal confirma que **CM 3** posee un núcleo del tipo ergostano, el cual se encuentra trisustituido por grupos hidroxilos en las posiciones 3, 5 y 6. Esta información confirma que la estructura propuesta en la figura 45 corresponde a ergosta-7,22-dien-3 β ,5 α ,6 β -triol ⁶⁸.

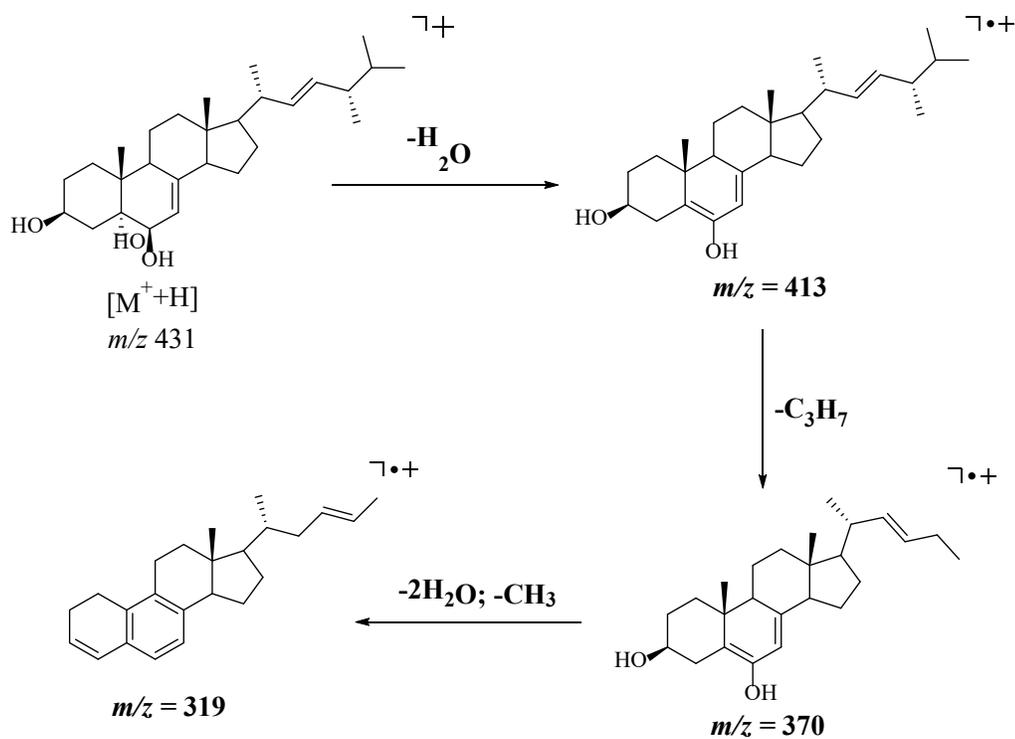


Figura 47. Fragmentación observada para **CM 3** utilizando *TOF-EM* a 7.4 eV.

Para **CM 4**, los análisis de RMN ^{13}C mostró 6 señales, las cuales, corresponden a 3 metilos, 1 metileno y 2 metinos. Las señales atribuidas a los metilos en δ_H 1,81 (s), 1,85 (s) y 1,90 (s) ppm corresponden al número de grupos acetatos introducidos mediante la reacción de acetilación. Para confirmar la estructura, fue necesario analizar el patrón de fragmentación de **CM 4**. La presencia del ión en m/z 217 demuestra la existencia de un eje de simetría que influye en el número de señales observadas en RMN 1H . Luego de observar los patrones de fragmentación, que incluyen principalmente la perdida de etileno y ácido acético en 361 y 217 m/z , fue posible confirmar que **CM 4** posee la estructura propuesta en la figura 46 y que corresponde a 1,2,3,4,5,6-hexaacetato de glucitoilo.

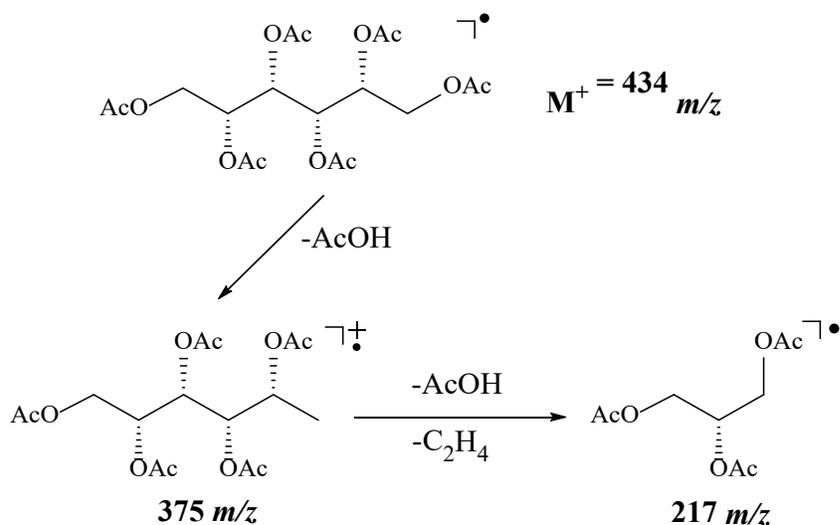


Figura 48. Fragmentación observada para **CM 4** utilizando *EM- IE*.

Para **CM 5**, RMN ^{13}C mostró 14 señales, las cuales, mediante espectroscopía *DEPT*, son asociadas 4 metilos, 1 metileno, 5 metinos y 4 carbonos cuaternarios adjudicados a una función ester. Estos metilos poseen un δ_{H} en 1,99 (*s*), 2,01 (*s*), 2,03 (*s*) y 2,04 (*s*) ppm, que al igual que **CM 4**, corresponde a CH_3 de grupos acetatos introducidos en el MS. Conectados a estos, se observan entre δ_{c} 169,5 y 170,3 ppm, cuatro señales que son propias a grupos carbonilos pertenecientes al fragmento acetilo. Para los metinos pertenecientes a **CM 5**, presentan un δ_{H} de 5,22 (*d*, $J= 3,90$, H-1), 3,94 (*dd*, $J=12,7, 10,3$, H-2), 5,42 (*t*, $J= 9,77$, H-3), 4,96 (*d*, $J= 10,0$, H-4), 4,98 (*m*, H-5), 3,99 (*dd*, $J= 8,30, 6,07$, H-6 α) y 4,17 (*dd*, $J= 12,7, 5,57$, H-6 β) y que son consistentes con los acoplamiento en $\text{H}^1\text{-H}^1$ COSY como también la multiplicidad en RMN ^1H conocida para la D-glucosa ⁶⁹. Para establecer la configuración relativa para **CM 5**, se tomó como referencia los hidrógenos diasterotópicos del grupo metileno con el fin de observar el efecto *NOE*. De esta manera fue posible demostrar que H-6 α presenta dicho efecto con H-2, H-3 y H-5 mientras que H-6 β se acopla con H-1 y H-4 tal como se observa en la figura 49.

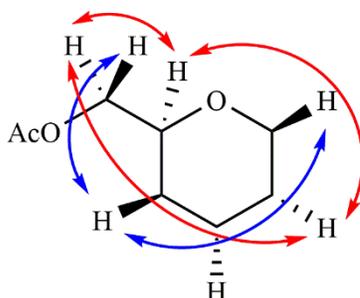


Figura 49. Efecto NOE observado para **CM 5**.

A diferencia de la D-glucosa, que es un carbohidrato pentahidroxilado, **CM 5** posee un grupo funcional distinto y cuatro grupos hidroxilos que han sido acetilados. Para indicar la naturaleza química de esta sustitución, las vibraciones en el infrarrojo mostraron estiramientos atribuidos a los grupos carbonilos del grupo acetato en 1751 y 1742 cm^{-1} como también una banda correspondiente al estiramiento para un átomo de bromo en 618 cm^{-1} . Para confirmar la presencia de este halógeno, el análisis EM-IE para **CM 5** mostró una señal en m/z 331 atribuible a la pérdida de HBr. Tal como se esperaba para esta familia de compuestos, al ser fragmentados por impacto electrónico se imposibilita la observación de los iones moleculares para los distintos compuestos, que, para nuestro caso, no se aprecia la presencia de los iones $[M+2]^+$ en un m/z 412,02 y $[M+1]^+$ de m/z 411,02. Adicionalmente, la presencia de las señales en m/z 81 y 79 corresponden a la composición isotópica del bromo, confirmando su presencia. Cruzando la información aportada por los datos espectroscópicos, la información obtenida del espectro infrarrojo, en conjunto con los datos de la espectrometría de masa confirma que la fórmula molecular de **CM 5** es $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{O}_9\text{Br}$. Finalmente, a partir de la fórmula molecular y contrastada con lo anterior, la estructura de este MS corresponde a triacetato de 6-(acetoximetil)-2-bromotetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo, señalado en la figura 50.

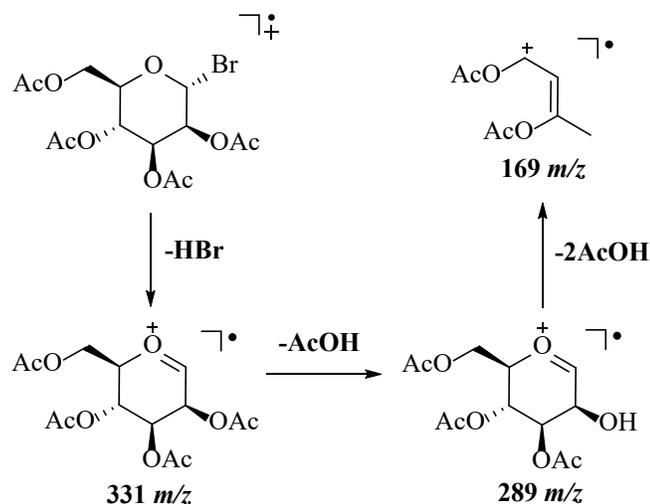


Figura 50. Patrón de fragmentación observado para **CM 5**.

La desacetilación de **CM 5**, y posterior análisis espectroscópico utilizando D₂O como solvente, mostró señales similares a las observadas para el derivado anterior. La espectroscopía de RMN ¹³C mostró 6 señales asociadas a 5 metinos y 1 metileno como también la presencia de 7 señales en RMN ¹H propias de los metinos en la zona de δ_H 3,31-3,65 ppm para H-2 a H-5 como también el hidrógeno anomérico en δ_H 5,05 (*d*, *J*= 3,60 Hz, H-1) ppm. Este protón posee un acoplamiento anti con H-2, asociado a una constante de acoplamiento de 3,6 Hz, que indica la conservación de la configuración relativa α observada mediante *NOESY* para **CM 5**. Esta información confirma la derivatización de **CM 6** y la confirmación de su estructura como 2-bromo-6-(hidroximetil)tetrahidro-2*H*-piran-3,4,5-triol.

CM 7 presenta patrones similares de desplazamiento químico, tanto en RMN ¹H como en RMN ¹³C, que los análogos anteriores. Se logran apreciar 14 señales en RMN ¹³C, de las cuales, 4 corresponden a metilos, 1 corresponde a metileno, 5 son metinos y 4 corresponden a carbono cuaternario asociado a un ester. El δ_H y las multiplicidades observadas para este producto semisintético, asemejan a lo descrito para **CM 5**. La diferencia se observa en el desplazamiento

químico observado para el protón anomérico, lo que sugiere una sustitución no equivalente a **CM 5**. En el estudio de espectrometría de masa se observó la ausencia del ión molecular $[M^+]$ de m/z 678,20, sugiriendo que la estructura posee dos unidades de glucosa unidas mediante un enlace -O-glucosídico 1,1'. Del mismo modo, el fragmento en m/z 331 indica una fragmentación correspondiente sobre solo un anillo pirano, similar a lo observado con **CM 5**. Este hecho indica la existencia de un eje de simetría capaz de generar una equivalencia entre los protones de ambos tetrahidro-2*H*-pirano, por lo cual, solo se observan 5 señales en RMN 1H . Con esta información, la estructura propuesta para **CM 7** corresponde a α -D-glucopiranosil(1-1') α -D-glucopiranosido (Figura 51) ⁷⁰.

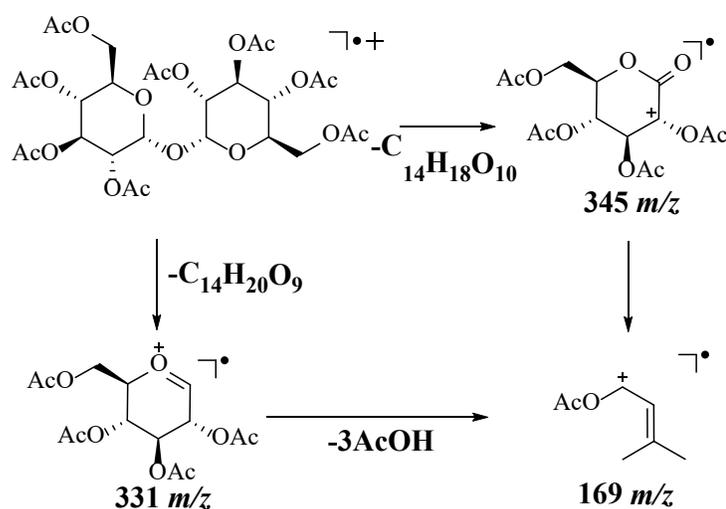


Figura 51. Patrón de fragmentación observado para **CM-7**.

Para **CM 8** se observan 28 señales en RMN ^{13}C , donde 8 corresponden a metilos, 2 son metilenos, 10 pertenecen a metinos y 8 son carbonos cuaternarios de los grupos acetilos. Para los protones, se observa un aumento en el número de señales, donde el δ_H en 5,38 (*d*, $J=3,6$ Hz) y 5,40 (*d*, $J=3,8$ Hz) ppm coinciden con 2 protones anoméricos que contiene dicho MS. Este aumento en el número de señales, como también el número de protones anoméricos observados en 1H y ^{13}C , es coincidente con la presencia de dos anillos tetrahidro-2*H*-pirano enlazados. Para identificar el tipo

de unión que posee **CM 8**, se efectuó la comparación de la fragmentación obtenida con los datos contenidos en la base de datos NIST 2005 ⁷⁰.

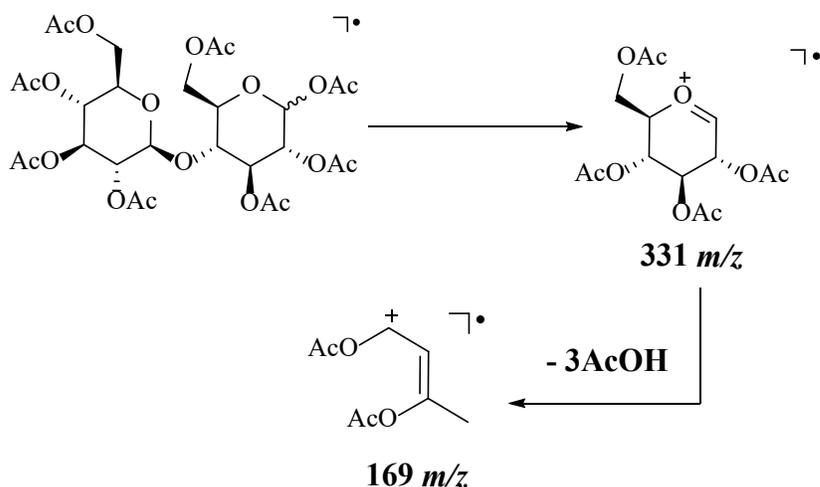


Figura 52. Patrón de fragmentación observado para **CM 8**.

De este, se observó un patrón de fragmentación tal como se indica en la figura 52. La ruptura del enlace O-glicosídico genera un fragmento principal correspondiente al radical 3,4,5-triacetoxi-2-(acetoximetil)-2,3,4,5-tetrahidropiraniilo, con una relación m/z de 331, formado por la pérdida de una molécula de AcOH. La consecutiva ruptura de los grupos acetatos, acompañados con la deshidratación y generación de alquenos, forma el radical 1,3-diacetoxibut-2-en-1-ilo con un m/z de 169 Da. La comparación de los fragmentos coincide con el disacárido β -D-glucopiranosil(1-4')- β -D-glucopiranososa, comúnmente llamado celobiosa ⁷⁰.

3.2 Hemisíntesis de ergosta-3-onas derivados a partir de ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol.

Considerando la naturaleza estructural de los MS aislados y la cantidad de producto obtenido, fue posible planificar la derivatización de ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol, mediante el uso de métodos sintéticos adecuados, a compuestos híbridos del tipo ergosta-1*H*-indol. Ergosterol posee, como función orgánica, un grupo hidroxilo y dobles enlaces conjugados, donde la primera es fácilmente derivatizable utilizando agentes oxidantes suaves. Por otra parte, la sección

correspondiente al 1*H*-indol es posible de introducir mediante el uso de la síntesis de Fischer. Este método involucra la reacción de cetonas o aldehídos en presencia del clorhidrato de arilhidracina correspondiente para dar el deseado ergosta-1*H*-indol. A partir de esta información, los compuestos identificados en esta investigación poseen los requerimientos necesarios para el desarrollo de la estrategia propuesta en a figura 53 para la indolización de Fischer.

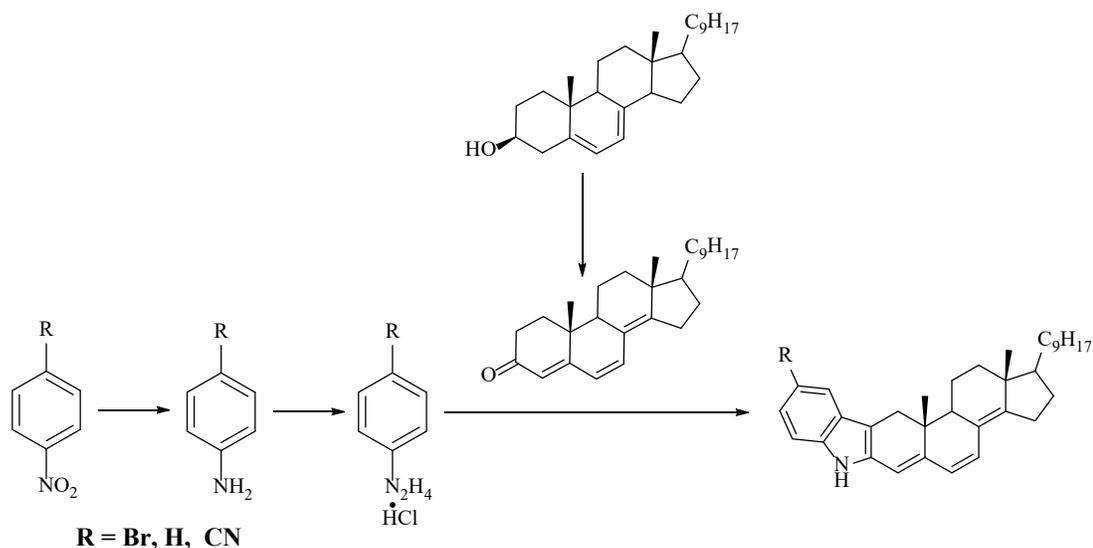


Figura 53. Esquema sintético general para la obtención de híbridos ergosta-[2,3;*b*]-1*H*-indol a partir de ergosta-5,7,22-trien-3β-ol.

Este esquema plantea, en una primera etapa, la reducción de nitrobenenos sustituidos, con $R = CN$, a sus respectivas anilinas que, en una etapa posterior, sea diazotada y reducida al clorhidrato de arilhidracina correspondiente. Paralelamente, ergosta-5,7,22-trien-3β-ol es oxidado, utilizando algún método sintético moderado para obtener las ergosta-3-onas requeridas para la indolización de Fischer. Luego de la obtención de los precursores, utilizando las condiciones adecuadas descritas en la literatura, es posible obtener los ergosta-1*H*-indol correspondientes.

3.3 Oxidación de ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol en condiciones no severas.

Dentro de los variados métodos de oxidación existentes, que van desde la utilización de agentes oxidantes fuertes como es el uso de permanganato de potasio, reactivo de Jones, PDC en DMF, oxidación de Heyns, tetróxido de rutenio o TEMPO para formar un ácido carboxílico, es posible la obtención de aldehídos o cetonas utilizando agentes oxidantes suaves, basados en cromo, como es el reactivo de Collins, PDC o PCC, DMSO Activado, compuestos de yodo hipervalente, cantidades catalíticas de TPAP en presencia de NMO y cantidades catalíticas de TEMPO en exceso de lejía ⁷¹⁻⁷⁴.

Adicional al grupo hidroxilo secundario, la estructura de ergosterol posee, en el anillo B, dobles enlaces conjugados. Esta función influye notablemente a la hora de definir la metodología a utilizar debido a los subproductos que se puedan generar de la reacción. Así, distintos autores destacan la generación de carbocationes que favorecen la migración de densidad electrónica a través de sistemas π conjugados. Para minimizar estos fenómenos de transposición, se sugiere utilizar agentes oxidantes suaves en condiciones específicas, con el fin de regular la acidez del medio oxidativo ⁷⁵. Dentro de los métodos posibles, la utilización de clorocromato de piridinio, PCC, se ajusta a los requerimientos de baja acidez, y que al ser combinado con celite, NaOAc, TM 3 Å, NaCO₃, favorece la no formación de productos secundarios acordes al mecanismo oxidativo de los reactivos basados en cromo ^{75,76}. Tomando en consideración estos parámetros, el esquema sintético empleado para la oxidación controlada de ergosterol fue el de la figura 54. De la oxidación, se logró aislar y caracterizar 5 ergosta-3-onas denominadas **OX 1-5**.

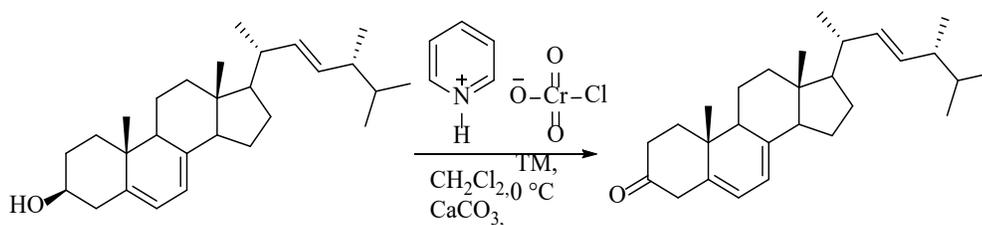


Figura 54. Condiciones de reacción empleadas para la oxidación de ergosterol utilizando PCC a 0°C.

3.3.1 Elucidación estructural de ergosta-3-onas.

Similar a **CM 1**, el espectro de RMN ^1H para **OX 1** indica la presencia de un protón olefínico endocíclico en un δ_{H} 5,71 ppm (*t*, $J= 5,75, 2,45$ Hz) y dos protones olefínicos alifáticos en δ_{H} 5,15 y 5,20 ppm (*dd*, $J= 15,2, 8,2$ Hz, H_{22} y *dd*, $J=15,1, 7,4$ Hz, H_{23}) respectivamente. La ausencia de la señal en δ_{H} 3,63 ppm (*m*, 1H) demuestra que el alcohol secundario perteneciente a ergosterol ha sido oxidado. Adicionalmente, en el espectro de RMN ^{13}C se logran identificar tres señales correspondientes a metinos olefínicos en 117,00, 132,0 y 135,6 ppm que son asignadas a C_7 , C_{22} y C_{23} respectivamente. Del mismo modo, se observa un carbono olefínico cuaternario en δ_{C} 139,5 ppm asignado a C_8 mientras que una señal en δ_{C} 212,1 ppm corresponde a un grupo carbonilo de una cetona cíclica correspondiente a la oxidación en C_3 . Esta información fue contrastada con los datos espectroscópicos citados por *Popova et al.*, que confirman que la derivatización de ergosterol produjo ergosta-5,22-dien-3-ona⁷⁷.

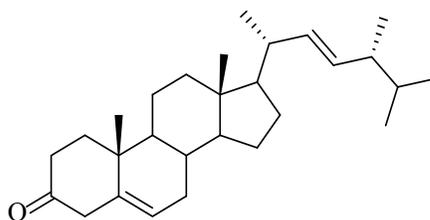


Figura 55. Estructura propuesta para **OX 1**.

Para **OX 2**, el análisis espectroscópico mostró desplazamientos químicos característicos de protones olefinicos, donde la señal en δ_{H} 5,22 y 5,24 ppm (*dd*, $J= 15,1, 8,2$ Hz) se asocia a un doble enlace exocíclico perteneciente a los hidrógenos H₂₁ y H₂₂ de la cadena alifática. Adicionalmente, se identificaron tres señales vinculadas a un sistema π conjugado. La señal en δ_{H} 5,73 ppm (1H, *s*), identificada como H₄, acopla con las señales observadas en δ_{H} 6,03 y 6,60 ppm (*d*, $J= 9,45$ Hz, H₆ y H₇) del anillo B. La espectroscopia de RMN ¹³C en conjunto con Dept arroja 5 señales para metinos insaturados y 3 señales de carbonos cuaternarios asociados a los dobles enlaces señalados anteriormente (C₄-C₅; C₆-C₇). Adicionalmente, se observan dos pares de carbonos cuaternarios en δ_{C} 164,36 y 156,05 ppm asignados a C₈ y C₁₄, por lo que es posible demostrar la existencia de un sistema triconjugado que conecta los anillo A, B y C del esqueleto ergostano (C₄ al C₁₄). Se reconoce también una señal en δ_{C} 199,48 ppm asociada a un carbono cuaternario perteneciente a la cetona formada en C₃, y que esta conjugada con los dobles enlaces previamente descritos. Los datos espectroscópicos antes mencionados fueron contrastados con la información propuesta por *Zhao et al.*, que confirma que la estructura de **OX 2** como ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona ^{27,78}.

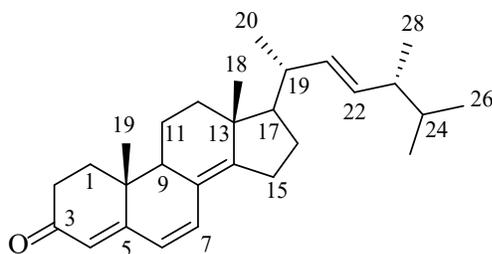


Figura 56. Estructura propuesta para **OX 2**.

El análisis espectroscópico de **OX 3** mostró desplazamientos similares en la zona olefinica al compuesto previamente mencionado. Se observa el doble enlace exocíclico característico en δ_{H} 5,18 y 5,22 ppm (*dd*, $J= 15,7, 7,7$ Hz), para H₂₂ y H₂₃, como también dos dobletes en δ_{H} 5,80 y 6,33 ppm (*d*, $J= 5,80$ Hz, 1H) para el dieno ubicado en el anillo B, similar a **CM 1**. La diferencia

radica en el desplazamiento químico observado en δ_H 7,08 ppm (s, 1H, H₄), donde este metino insaturado se encuentra influenciado por el efecto electrónico atractor que ejerce el grupo carbonilo. Esta última función es confirmada mediante la detección de una señal en δ_c 190,3 ppm como en un δ_H 9,89 ppm (s, 1H) y que concuerda con el desplazamiento químico para un aldehído α,β insaturado.

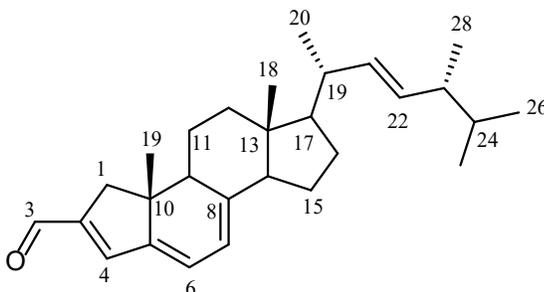


Figura 57. Estructura propuesta para **OX 3**.

La presencia de este aldehído, en el anillo A, se debe a una contracción del anillo de seis miembros, donde la acidez del método oxidativo provoca que ocurra una ruptura del enlace C2-C3 y que repercute en la formación de dos aldehídos en dichas posiciones. A partir de ello, la misma acidez genera un tautomerismo ceto-enolico, para uno de los carbaldehídos formados y que, por medio de una condensación aldólica intramolecular, produce el respectivo aldol con la consecuente deshidratación formando *A*-norergosta-2,5,7,22-tetraen-2-carbaldehído según el mecanismo detallado en la figura 58. Cabe mencionar que la estructura propuesta para este metabolito semisintético no ha sido reportada previamente.

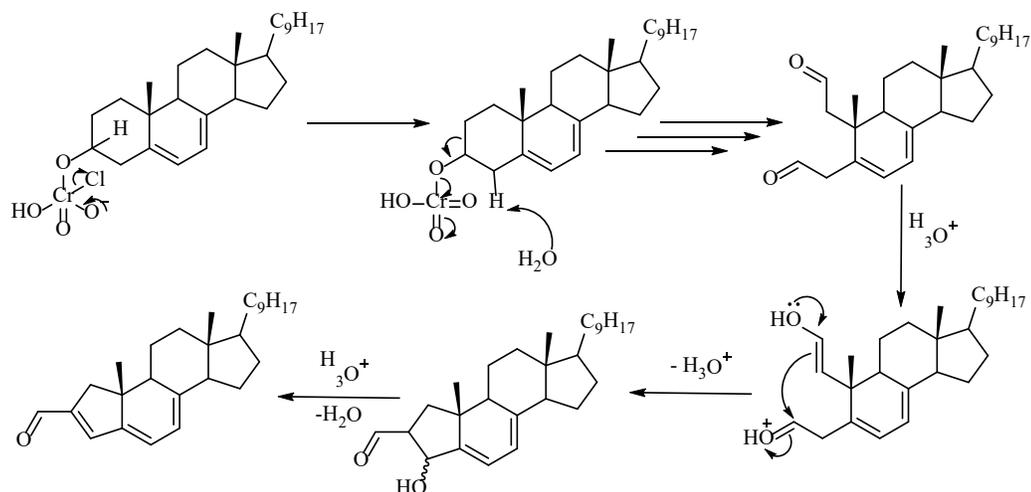


Figura 58. Formación de *A*-norgosta-2,5,7,22-tetraen-2-carbaldehído mediante condensación aldólica en medio ácido.

Para **OX 4**, el análisis espectroscópico presentó un patrón característico del doble enlace exocíclico en δ_{H} 5,16 y 5,25 ppm (*dd*, $J= 15,91, 6,91$ Hz) junto con una señal en δ_{H} 5,71 ppm (*s*,1H), que corresponde a un doble enlace endocíclico, asignado a H₇, posicionado α a un grupo atractor de electrones como lo es un grupo carbonilo. Este último se confirma con las señales observadas en RMN ¹³C a un δ_{c} 197,0 y 210,1 ppm, que representan carbonos cuaternarios de dos cetonas asociadas a las posiciones C₃ y C₆, y donde este último se encuentra conjugado con el sistema insaturado antes señalado. También se observa una señal en δ_{H} 4,04 ppm (*sa*, 1H) como δ_{c} 79,89 ppm (C), que concuerda con el desplazamiento químico de un grupo hidroxilo vecino a la cetona α,β insaturada del anillo B. Lo antes planteado, y en conjunto con la evidencia propuesta por *Russo y colaboradores*, es posible aseverar que la estructura de **OX 4** es 5 α -hidroxi-ergosta-7,22-dien-3,6-diona ⁷⁹.

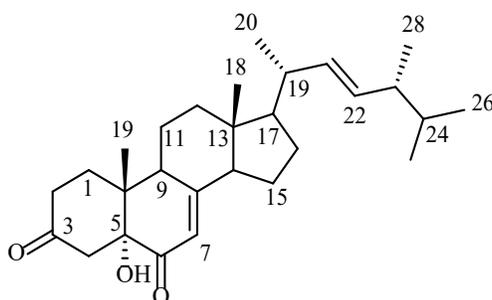


Figura 59. Estructura propuesta para **OX 4**.

OX 5 proviene de la deshidratación de **OX 4** ocurrida durante la reacción. El desplazamiento químico de protones indica la presencia del doble enlace exocíclico, asignado a H_{22} y H_{23} , en δ_H 5,18 y 5,23 ppm (*dd*, $J= 15,2, 7,12$ Hz, 1H). Además, fue posible identificar dos singletes asignados a metinos olefinicos situados en un δ_H 6,48 ppm (*s*, 1H, H_4) y 5,98 (*s*, 1H, H_7). Es posible confirmar esta información mediante RMN ^{13}C , donde se observó la presencia de carbonos cuaternarios asociados a cetonas en un δ_c 195,3 ppm (C_3) y 211,4 ppm (C_6) en conjunto con seis señales olefinicas, y que difieren en un δ_c 149,1 ppm (C_4) y 147,9 ppm (C_5) respecto a **OX 4**. A partir de lo anterior, es posible aseverar que la estructura de **OX 5** corresponde a ergosta-4,7,22-dien-3,6-diona ⁸⁰.

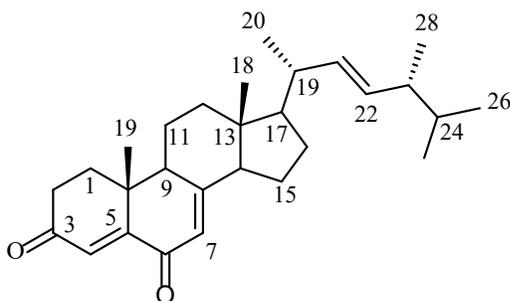


Figura 60. Estructura propuesta para **OX-5**.

3.3.2 Mecanismo propuesto para la oxidación de CM 1 a sus respectivas ergosta-3-onas.

Considerando las estructuras obtenidas posterior a la oxidación de **CM 1** utilizando PCC, es necesario proponer un mecanismo coherente a la ruta sintética empleada. Se propone, en una primera etapa, la adición nucleofílica al centro metálico correspondiente a cromo VI. La transferencia sigmatrópica de un hidruro facilita la regeneración de PCC, mediante la eliminación de Py y HCl, para generar ergosta-5,7,22-trien-3-ona. En condiciones similares, esta cetona es protonada y reordenada mediante una transferencia de hidruro generando un centro de carga positiva que es deslocalizado a la posición 6. La adición nucleofílica de H₂O en la posición 6 genera, en etapas similares a las mencionadas, los compuestos 5 α -hidroxiergosta-7,22-dien-3,6-diona (**OX 4**) como también ergosta-4,7,22-trien-3,6-diona (**OX 5**). Asimismo, desde el catión vinílico, es posible completar el sistema conjugado hasta la formación de un carbocatión en C-8 donde, mediante la abstracción de un protón por parte del anión cloruro para la regeneración de HCl, se obtiene ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3 β -ol. Este intermediario, por acción de PCC, regenera la cetona en el C3 con posterior formación de ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona. La figura 61 muestra las etapas más importantes en la formación de los productos **OX 1-5**.

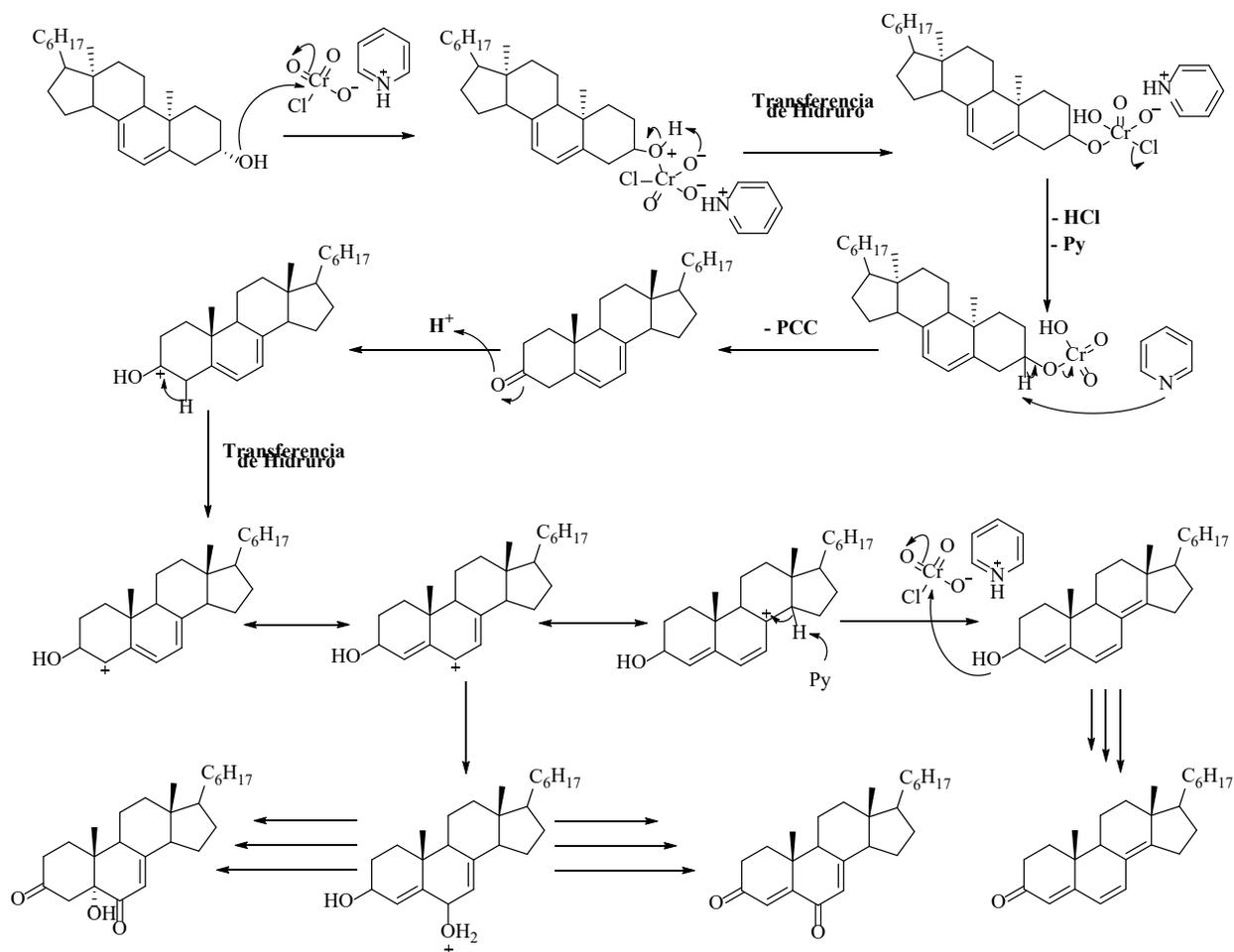


Figura 61. Mecanismo propuesto para la formación de ergosta-3-onas utilizando PCC.

3.4 Formación de enoleteres a partir de 5 α -hidroxiergosta-7,22-dien-3,6-diona.

Tomando en cuenta la naturaleza estructural de 5 α -hidroxiergosta-7,22-dien-3,6-diona, se ideó la modificación estructural según la figura 62. Para la derivatización, se utilizó como metodología el exceso de alcohol alifático en presencia de ácido clorhídrico como agente deshidratante. El uso de diferentes solventes permitió la conversión de **OX 4** en dos nuevos análogos tipo 6-alcoxi-ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona.

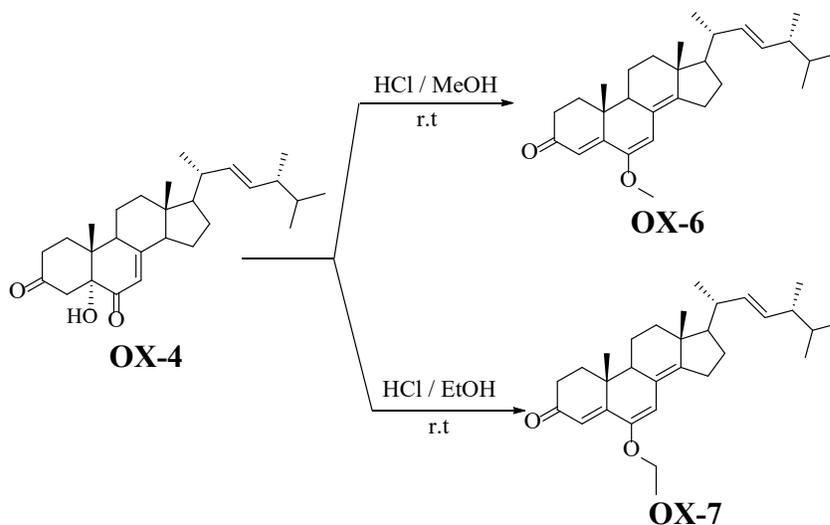


Figura 62. Síntesis de enoléteres mediante catálisis ácida alcohólica.

3.4.1 Caracterización estructural de 6-alcoxiergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona.

Luego de la síntesis y purificación, **OX 6** se aisló como cristales de color naranja pálido. La elucidación de la estructura molecular se realizó mediante TF-IR y espectroscopía de RMN. El análisis de resonancia magnética nuclear de ^1H mostró seis señales, entre δ_{H} 0,83 a 1,06, ppm, correspondiente a seis grupos metilo pertenecientes al esqueleto ergostano. Además, en la zona olefinica, fue posible la identificación de dos señales para alquenos endocíclicos y una señal asociada a una olefina exocíclica. La señal en δ_{H} 5,85 ppm (*s*, 1H) corresponde a un nuevo alqueno formado en el anillo A, perteneciente a una cetona α,β -insaturada, mientras que la señal en δ_{H} 6,25 ppm (*s*, 1H) corresponde protón olefínico del enoléter formado en C6-C7. Adicionalmente, es posible identificar una señal para el grupo metilo, asociado al enoléter, en δ_{H} 3,67 ppm (*s*, 3H) asignado a C6. Asimismo, el análisis de RMN ^{13}C confirma la presencia de 7 metilos, 6 de metilenos, 9 metinos y 7 de carbonos cuaternarios. Por consiguiente, fue posible confirmar la derivatización en C6, ya que no fue observado el grupo carbonilo presente en **OX 4** y que fue reemplazado por un fragmento metoxilo asociado con la señal con δ_{c} 55,06 ppm (CH_3). Las otras

señales observadas en el análisis RMN ^{13}C tienen un patrón similar al informado para **OX 2**⁸. En consecuencia, y con el fin de confirmar la asignación correcta de los protones olefínicos, el análisis bidimensional de HMBC mostró una correlación entre H4 con C5, C3, C9 y C10 confirmando el desplazamiento químico para C4 en δ_{C} 119,19 ppm. Adicionalmente, fue posible correlacionar los alquenos endocíclicos encontrados en el fragmento fenantrenoilo con un δ_{C} para C5 a 158,85 ppm, C6 a 149,40 ppm, C7 a 106,70 ppm, C8 a 122,69 y C14 a 150,29 ppm.

Esta información confirma que la estructura propuesta para **OX 6** es 6-metoxi-ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona y cabe destacar que este compuesto no ha sido reportado previamente.

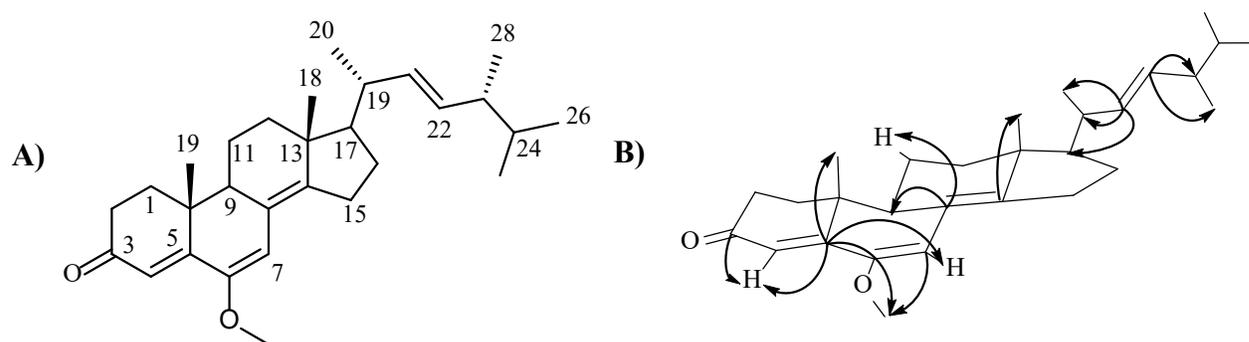


Figura 63. A) Estructura propuesta para **OX 6**. B) Acoplamiento H-C HMBC observado para los alquenos presentes en **OX 6**.

En el caso de **OX 7**, de la purificación se obtuvieron cristales amarillo pálido que fueron caracterizados utilizando las mismas técnicas que para **OX 6**. Los datos de RMN ^1H mostraron seis señales, entre un δ_{H} 0,80 a 1,03 ppm, correspondientes a seis grupos metilo que pertenecen al esqueleto de ergostano y que además poseen desplazamientos químicos similares a **OX 6** en la zona olefínica. La señal en δ_{H} 5,81 ppm (*s*, 1H) corresponde al nuevo alqueno formado en C4-C5, mientras que la señal en δ_{H} 6,28 ppm (*s*, 1H) corresponde al protón del enol éter en C7. Del mismo modo, fue posible identificar dos conjuntos de señales asignadas al fragmento de etilo en C6. En

este sentido fue posible reconocer el grupo metilo en un δ_H 1,31 ppm (*t*, $J = 6,93$, 3H) y la presencia de un metileno diasterotópico en δ_H 3,78 y 3,86 ppm (*m*, 1H) para el grupo etoxilo. El análisis de RMN ^{13}C mostró la presencia de 7 metilos, 7 metilenos, 9 metinos y 7 carbonos cuaternarios. Este análisis apoya la derivatización en C6 con la detección de dos señales en δ_C 63,34 (CH_2) y 14,59 (CH_3) asociadas al fragmento etoxilo en conjunto con la ausencia del grupo carbonilo C-6 observado en **OX 4**.

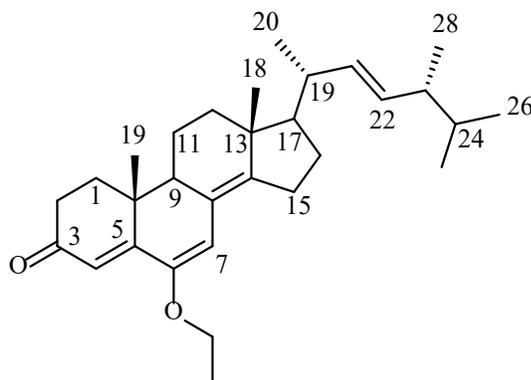


Figura 64. Estructura propuesta para **OX 7**.

Adicionalmente, el análisis estructural por rayos X para la estructura cristalina de **OX 7** mostró la formación del sistema π triconjugado a través del esqueleto de ergostano y la incorporación del grupo etoxilo en C6. En la figura 63 se presenta el diagrama ORTEP para esta molécula. El análisis en el estado sólido reveló que **OX 7** cristaliza en el grupo espacial monoclinico $C2$, observando una entidad molecular por unidad asimétrica. Dentro del empaquetamiento cristalino, el análisis de las interacciones intermoleculares mostró un puente de hidrógeno intermolecular $CH \cdots O=R$, entre H2 y C=O3 de una longitud de 3,33 Å y un ángulo de 134,1°, a través de un eje de rotación binario paralelo al eje b. Afortunadamente, la estereoquímica fue determinada inequívocamente como 9R, 10R, 13R, 17R, 20R, 24S y que es consistente con la estereoquímica de compuestos de esqueleto de ergostano encontrados en la literatura. Esta

información confirma que la estructura propuesta para **OX 7** es 6-etoxi-ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona y que previamente no ha sido reportada.

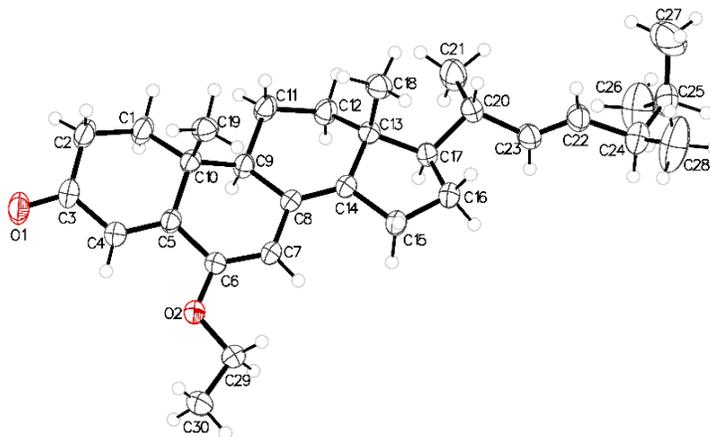


Figura 65. Diagrama ORTEP para **OX 7** con elipsoides térmicos dibujados al 30% de probabilidad.

3.4.2 Mecanismo propuesto para la obtención de 6-alcoxi-ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-onas derivados a partir de 5 α -hidroxi-ergosta-7,22-dien-3,6-diona.

Para comprender la formación de los 6-alcoxi-derivados, es necesario considerar el mecanismo propuesto en la figura 66. La generación del ion ergostaoxonio, acompañado de la pérdida de agua, forma un catión en C5 por medio de un mecanismo E₁. La deslocalización de la densidad electrónica genera un catión hidroxihexahidronaftalen-1-ilio en la decalina y que es estabilizado por resonancia. La adición de una molécula de alcohol genera el hemiacetal, que es protonado, deshidratado e isomerizado en un enol éter para formar un catión alílico en C8. A través de un mecanismo E₁ se promueve la formación de un nuevo alqueno, entre C8-C14, para generar el sistema π triconjugado observado en los compuestos aislados.

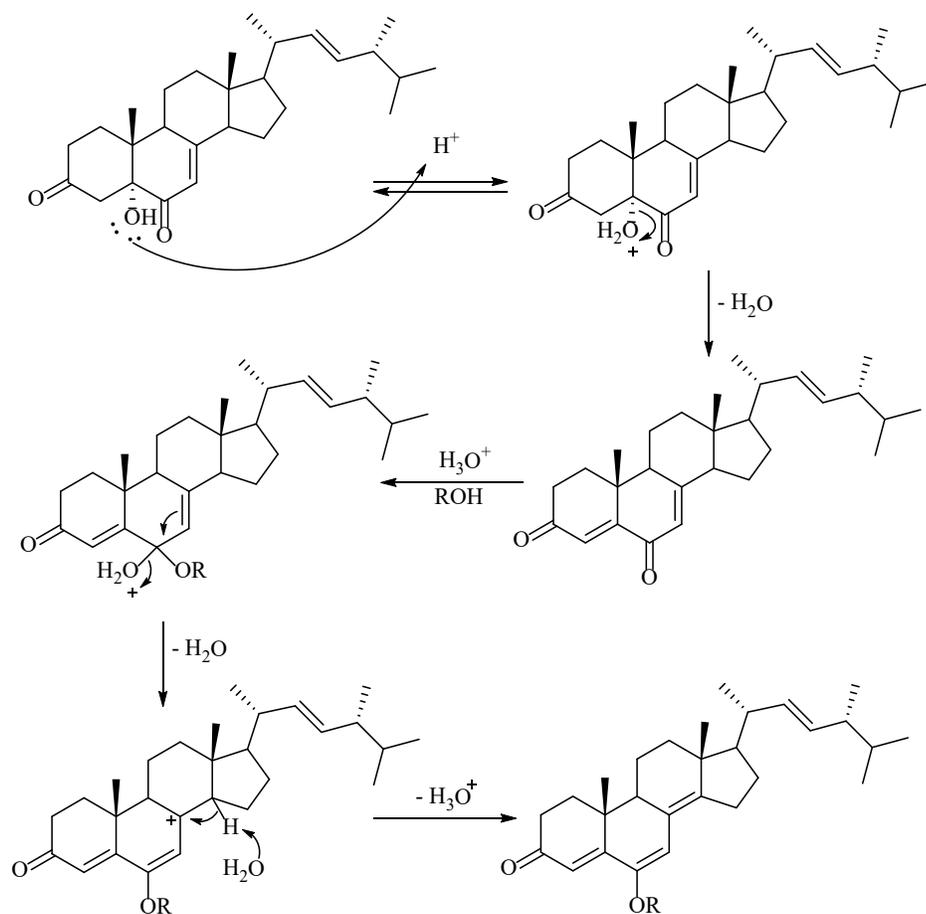
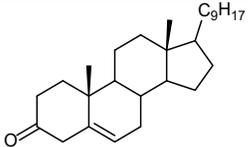
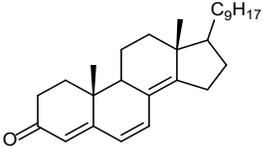
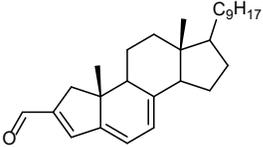
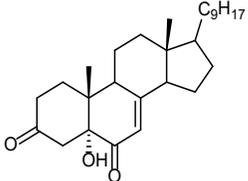
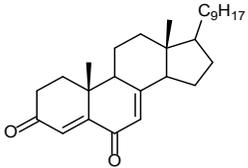
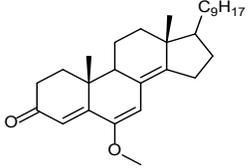
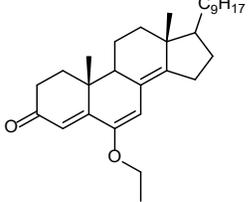


Figura 66. Mecanismo de reacción propuesto para la formación de 6-alcoxi-ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-onas.

En términos generales, la transformación desde ergosterol a sus respectivas ergosta-3-onas, como también a sus 6-alcoxi-ergosta-3-ona, obtuvo los siguientes rendimientos.

Tabla 7. Porcentaje de rendimiento asociado a la formación de ergosta-3-onas y 6-alcoxi-ergosta-3-ona.

OX	Cetona obtenida	Nombre	Rendimiento
1		ergosta-5,22-dien-3-ona	1,5 %
2		ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona	12 %
3		A-norergosta-2,5,7,22-tetraen-2-carbaldehido	9 %
4		5 α -hidroxi-ergosta-7,22-dien-3,6-diona	45 %
5		ergosta-4,7,22-dien-3,6-diona	< 0,5 %-
6		6-metoxi-ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona	67 %
7		6-etoxi-ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona	69 %

3.5 Reducción de nitro arenos a sus correspondientes anilinas.

Para desarrollar la estrategia sintética planteada en el punto 2.6, se requiere de aril aminas para la correcta formación de los reactantes necesarios. En nuestro caso, para los nitros arenos disponibles, la utilización de agentes reductores facilita la formación de las anilinas deseadas. Dentro de los métodos descritos en la literatura, se encuentra el uso de Pd/C metanólico, Fe/HCl, Sn/HCl, D-glucosa/KOH, entre otras ^{81,82}. Considerando los reactivos disponibles podemos considerar la utilización de tres métodos: *Bellamy et al.* describe la utilización de la metodología que emplea las sales de estaño, como es SnCl₂•2H₂O o su contraparte anhidra en AcOEt o EtOH respectivamente, a 70 °C en medio inerte para obtener aminas con un rendimiento del 95% ⁸³, *Kumar et al.* utilizó, para la reducción de nitroarenos, una fuente generadora de hidrógeno como es la D-glucosa e hidróxido de potasio en una mezcla, con la misma proporción, de dimetilsulfoxido y agua ⁸³, mientras que *Tsukinoki et al.* proponen la utilización de Zn/NH₄Cl en H₂O, como método reductor verde, a 80 °C con rendimientos por sobre el 90 % a presión atmosférica ⁸⁴. La elección de la metodología a utilizar se basó principalmente en la comparación de los subproductos percibidos mediante el uso de *TLC*, los tiempos de reacción, las condiciones de reacción a utilizar y la accesibilidad de los reactivos. Dentro de estas, el método que se acomodó de manera eficiente se describe en la figura 65.

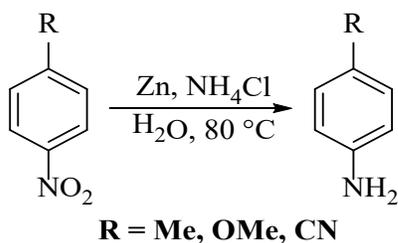
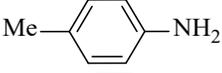
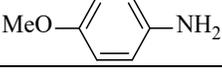


Figura 67. Reducción de nitrobenzeno derivados utilizando Zn/NH₄Cl en medio acuoso.

3.5.1 Caracterización de las anilinas obtenidas.

La reducción de los nitrobenzenos a sus anilinas correspondientes mediante el uso de Zn/NH₄Cl obtuvo como rendimiento, los porcentajes contenidos en la tabla 8.

Tabla 8. Rendimiento porcentual de las anilinas obtenidas a partir de la reducción.

N°	Anilina obtenida	Nombre común	% de Rendimiento
An-1		4-aminobenzonitrilo	90,5
An-2		4-toluidina	91,7
An-3		4-anisidina	79,5

La caracterización de las anilinas fue realizada principalmente mediante la comparación de las bandas obtenidas en la espectroscopía IR como también el punto de fusión observado, donde estos datos fueron contrastados con los contenidos en la literatura.

Se obtuvo la 4-cianoanilina, **An-1**, como un sólido de color beige, el cuál mostró un punto de fusión entre 85-87 °C. Paralelamente, el análisis TF-IR mostró bandas asociadas al fragmento correspondiente a benceno en 3174 cm⁻¹ además de otras bandas asociadas al grupo nitrilo, en 2200 cm⁻¹, y en 3381 cm⁻¹ una banda asociada a una amina primaria ⁸⁵. Para la 4-toluidina, **An-2**, sólido de color café, se obtuvo un punto de fusión de 44 °C y donde el análisis en el infrarrojo mostraron una banda en 3366 cm⁻¹ pertenecientes a la amina primaria ⁸⁶. Para la 4-anisidina, **An-3**, se aisló esta como sólido de color beige con un punto de fusión de 57 °C. Su espectro infrarrojo entregó bandas asociada a benceno, en 3153 cm⁻¹, además de las bandas pertenecientes a la amina primaria en 2833 cm⁻¹ como también en 3350 cm⁻¹ la banda correspondiente al grupo metoxilo ⁸⁷.

Las aril aminas **An 1-3** son compuestos aromáticos disustituídos que poseen un patrón de sustitución 1-4, el cual, posee una banda característica, asociada una flexión, en la zona de 790–

860 cm^{-1} . Para nuestro caso, esto es confirmado mediante la detección de bandas entre 851, 849 y 840 cm^{-1} para **An 1, 2 y 3** respectivamente.

3.5.2 Obtención de clorhidratos de hidracina

Desde las anilinas obtenidas, es posible formar los respectivos clorhidratos de fenilhidracina utilizando el método planteado por *Bentley et al.* y que puede ser resumido según el esquema propuesto en la figura 66^{88,89}.

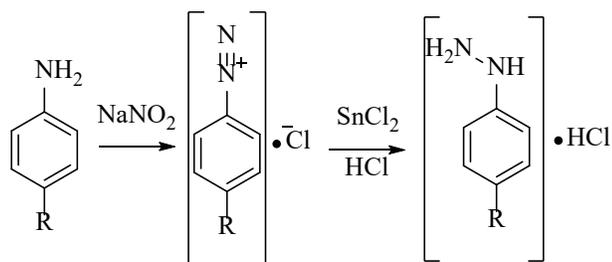


Figura 68. Etapas sintéticas involucradas en la formación de los clorhidratos de hidracina.

3.5.3 Caracterización de los clorhidratos de arilhidracina obtenidos.

Dentro de la preparación *in situ*, de los distintos clorhidratos de hidracina, la tabla 9 resume los rendimientos obtenidos en las condiciones de reacciones utilizadas.

Tabla 9. Rendimientos porcentuales obtenidos al generar los clorhidratos de hidracina empleadas.

N°	Clorhidratos de arilhidracina	% de Rendimiento
Ar 1	$\text{NC}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{HCl}$	65,71
Ar2	$\text{Me}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{HCl}$	60,11
Ar 3	$\text{MeO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{HCl}$	66,94
Ar 4	$\text{Br}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{HCl}$	65,50
Ar 5	$\text{C}_6\text{H}_5-\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{HCl}$	61,19

Cabe destacar que a estos compuestos no se realizó caracterización estructural debido a su utilización inmediata.

3.5.4 Obtención de ergosta-1*H*-indoles utilizando la síntesis de Fischer.

Luego de aislar y caracterizar los principales precursores contenidos en el esquema sintético propuesto en el apartado 3.2, fue posible realizar la indolización de Fischer. Dentro de los variados métodos existentes para esta reacción, se utilizó una mezcla entre los métodos descritos por *Onajole y Bentley*^{89,90}. Principalmente, estas metodologías fueron consideradas por los rendimientos obtenidos, reactivos y condiciones de reacción que se encuentran detalladas en la figura 67.

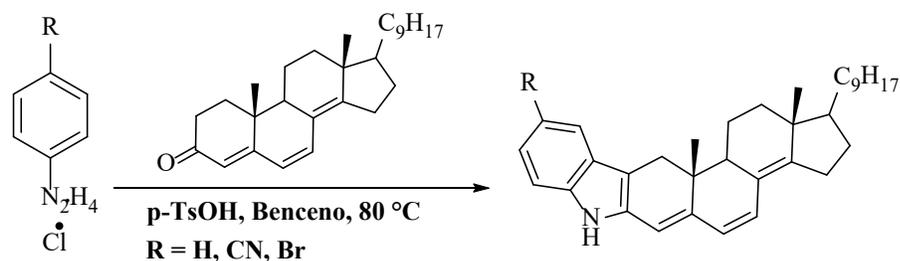


Figura 69. Esquema sintético general para la obtención de ergosta-5,7,22-trien-[2,3;*b*]-1*H*-indol utilizando la indolización de Fischer.

Adicionalmente, es importante tener en cuenta las consideraciones que la Unión internacional de química pura y aplicada en materia de fusión de anillos. Esta establece que, en el caso de fusionar dos anillos de distinta índole, se debe considerar la numeración individual de cada uno de ellos y relacionarlos con las posiciones en las que se encuentren fusionados. En nuestro caso, las posiciones C2-C3, del núcleo ergostano, comparten enlace con la cara *b* del fragmento 1*H*-indol, tal como se observa en la figura 70. De esta forma, para los indoles semisintéticos se utilizará la nomenclatura ergosta-[2,3;*b*]-1*H*-indol como base.

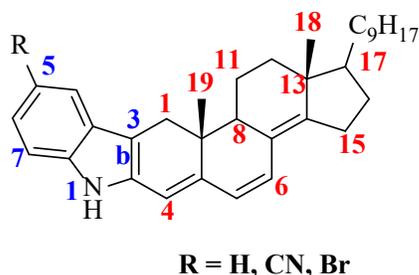


Figura 70. Numeración asignada para los ergosta-[2,3;*b*]-1*H*-indol derivados.

3.5.4.1 Caracterización estructural de ergosta-[2,3;*b*]-1*H*-indol.

Los heterociclos nitrogenados, como son los 1*H*-indol, fueron detectados mediante la aplicación, sobre la TLC, de agentes colorimétricos específicos como lo es el reactivo de *Dragendorff*. La preparación fue realizada de acuerdo a lo compilado por *Stalh*, de lo expuesto por *Munier y Macheboeuf*, donde la aplicación genera *spots* naranjos/café al detectar, específicamente, alcaloides y otros compuestos que contienen nitrógeno en su estructura ⁹¹.

Mediante la purificación del crudo obtenido al reaccionar **Ar-5** con **OX 2** fue posible aislar **In-1**, que presentó una reacción positiva con el reactivo de *Dragendorff*. El análisis TF-IR mostraron una absorción en 3325 cm⁻¹, relacionada con el estiramiento de N-H, y 1261 cm⁻¹ para la flexión de N-H del grupo 1*H*-indol. **In 1** es un sólido transparente cristalino soluble en CDCl₃. El análisis espectroscópico RMN ¹H mostró diversas señales características atribuidas a la zona aromática y olefínica. Se identifica en un δ_H 5,21 y 5,24 ppm (*dd*, *J*= 15,1, 8,4 Hz) los metinos asociado al alqueno exocíclico posicionado en H22 y H23, y en donde, la constante de acoplamiento vecinal de 15,1 Hz indica que la configuración de dicha olefina es *trans*. Además, se observan dos señales en un δ_H 6,04 y 6,27 ppm (*d*, *J*= 9,5 Hz), perteneciente al doble enlace endocíclico ubicado entre C6-C7 en el anillo B, y en donde la constante de acoplamiento vecinal de 9,5 Hz indica que este alqueno posee configuración *cis*. Adicionalmente, se identifica, en un δ_H

6,08 ppm (1H, s), un protón olefínico asociado a H4 en el anillo A de la sección correspondiente a la ergosta-3-ona. La parte aromática perteneciente al 1*H*-indol presenta tres señales en δ_H 6,84 (*t*, $J=7,13$ Hz, H6-In), 7,08 (*d*, $J=7,9$ Hz, H5/H7-In) y 7,25 ppm (*d*, $J=8,1$ Hz, H4-In) y que se encuentran asociados a un δ_C 110,32 (C7-In), 119,3 (C4-In), 120,21 (C5-In) y 123,17 ppm (C5-In) respectivamente. Las constantes de acoplamiento observadas indican la existencia de un sistema formado por cuatro núcleos independientes, del tipo AA'BB', y que poseen diferencias en el desplazamiento químico. Además, se observan cuatro carbonos cuaternarios aromáticos posicionados en un δ_C 132,27 (C2-In), 112,96 (C3-In), 135,27 (C8-In) y 125,64 ppm (C9-In), los cuales, completan la total asignación de los núcleos perteneciente al segmento 1*H*-indolilo. Respecto a las posiciones no consideradas en la discusión previa, fue posible observar coincidencias tanto en los δ_H como los δ_C de los núcleos constituyentes del fragmento proveniente de **OX 2**. Esta evidencia confirma la completa reacción y se puede inferir que la estructura **In 1** es ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-[2,3;*b*]-1*H*-indol.

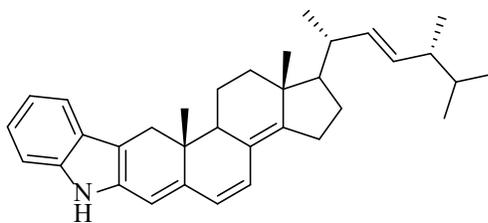


Figura 71. Estructura propuesta para ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-[2,3;*b*]-1*H*-indol (**In 1**).

Al igual que el compuesto anterior, **In 2** posee señales características en un δ_H 5,21 y 5,24 ppm (*dd*, $J=15,0, 8,4$ Hz), para H22 y H23, asociado con las respectivas señales en RMN ^{13}C de los metinos olefínicos en δ_C 132,07 y 132,13 ppm. Considerando los valores de las constantes de acoplamiento vecinal, este alqueno presenta una configuración *trans*. Este híbrido, al provenir de la reacción de **OX 2** con **Ar 1**, posee también dos señales pertenecientes a los metinos del anillo B

en δ_H 6,27 y 6,04 ppm (*d*, $J= 9,5$ Hz, H_6 y H_7), como también los carbonos asociados en un δ_C 124.43 y 134.00 ppm. Los valores observados para el acoplamiento vecinal 3J sugieren que la configuración de este alqueno es *cis*. También fue posible identificar un singlete en un δ_H 6,07 ppm (1H, s) asociado al protón H4 del anillo A en la sección esteroidal. Respecto al fragmento indólico para **In 2**, fue posible identificar tres señales en RMN 1H que concuerdan con el patrón de sustitución de **Ar 1**. En este sentido, el desdoblamiento observado es atribuido a un sistema de acoplamientos de *spin* del tipo AMX, donde estos hidrógenos poseen un δ_H 6,94, 7,34 y 7,58 ppm, asignados a H4-In, H6-In y H7-In, y que se correlacionan con el desplazamiento químico observado en δ_C 124,73, 123,13 y 111,82 ppm respectivamente. En adición, es posible identificar la señal perteneciente al grupo nitrilo en un δ_C 118,77 ppm. Estos datos espectroscópicos, en conjunto con la información estructural de los precursores, el nombre de **In 2** es ergosta-4,6,8(14),22-tetraen[2,3;*b*]-5-ciano-1*H*-indol.

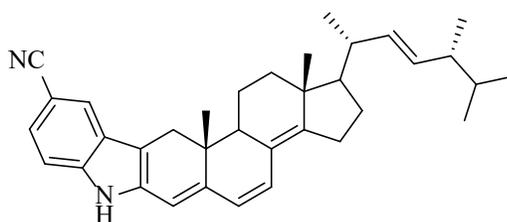


Figura 72. Estructura propuesta para ergosta-4,6,8(14),22-tetraen[2,3;*b*]-5-ciano-1*H*-indol (**In 2**).

La síntesis de **OX 2** con **Ar 4** produjo **In 3**, compuesto incoloro cristalino que es soluble con $CDCl_3$. Al igual que sus antecesores, este posee señales en RMN 1H , en la zona olefínica, asociadas a los hidrógenos H22 y H23 pertenecientes al alqueno exocíclico interno en δ_H 5,20 y 5,23 ppm (*dd*, $J=15,0, 7,9$ Hz) respectivamente. El acoplamiento vecinal indica, al igual que las índoles anteriores, un valor de constante para un alqueno de geometría *trans*. También se observa el patrón típico del sistema olefínico conjugado, entre en anillo A, B y C de **OX 2**, para un δ_H 5,92

(*d*, $J=9,3$ Hz), 6,09 (*d*, $J=9,4$ Hz) y 6,19 ppm (*s*) asignado a H7, H6 y H4. Los valores observados para el acoplamiento vecinal, entre H6 y H7, sugieren que la configuración de este alqueno es *cis*. En el caso de la zona aromática, se observan tres grupos de señales en RMN ^1H en un δ_{H} 7,32 (*dd*, $J=8,5, 2,9$ Hz, 7,58 (*d*, $J=3,1$ Hz) y 7,78 ppm (*d*, $J=8,3$ Hz) atribuidas a H6-In, H4-In y H7-In. Las multiplicidades observadas concuerdan con un patrón de *spin* del tipo AMX. Adicionalmente, las bandas FT-IR más representativas, para In 2, mostraron una absorción en 3368 cm^{-1} , relacionada con el estiramiento N-H, 1261 cm^{-1} para la flexión de N-H indólico y 654 cm^{-1} la banda asociada a la vibración C-Br. Estos datos espectroscópicos, en conjunto con la información estructural de los precursores, confirman que la estructura de **In 3** corresponde a ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-[2,3;*b*]-5-bromo-1*H*-indol.

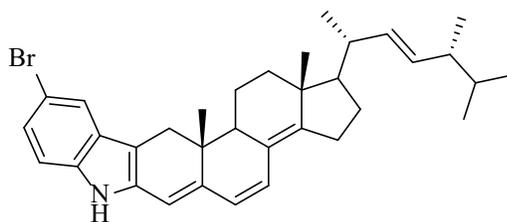


Figura 73. Estructura propuesta para ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-[2,3;*b*]-5-bromo-1*H*-indol
(In 3).

3.5.4.2 Mecanismo propuesto para la síntesis de ergosta-4,6,8(14),22-tetraen[2,3;*b*]-1*H*-indol.

Tal como se ha mencionado. esta síntesis involucra la utilización de clorhidratos de hidracina en presencia de cetonas o aldehídos bajo condiciones de calentamiento y acidez para obtener, en una primera etapa, una arilhidrazona híbrida. Este intermediario tautomeriza a una hidrazina y sufre un reordenamiento sigmatrópico [3,3] que funcionaliza una posición aromática

inactiva. Además de una tautomerización posterior y un intercambio de imina se obtiene, por la eliminación de amoniaco, el deseado indol tal como se describe en la figura 72^{92,93}.

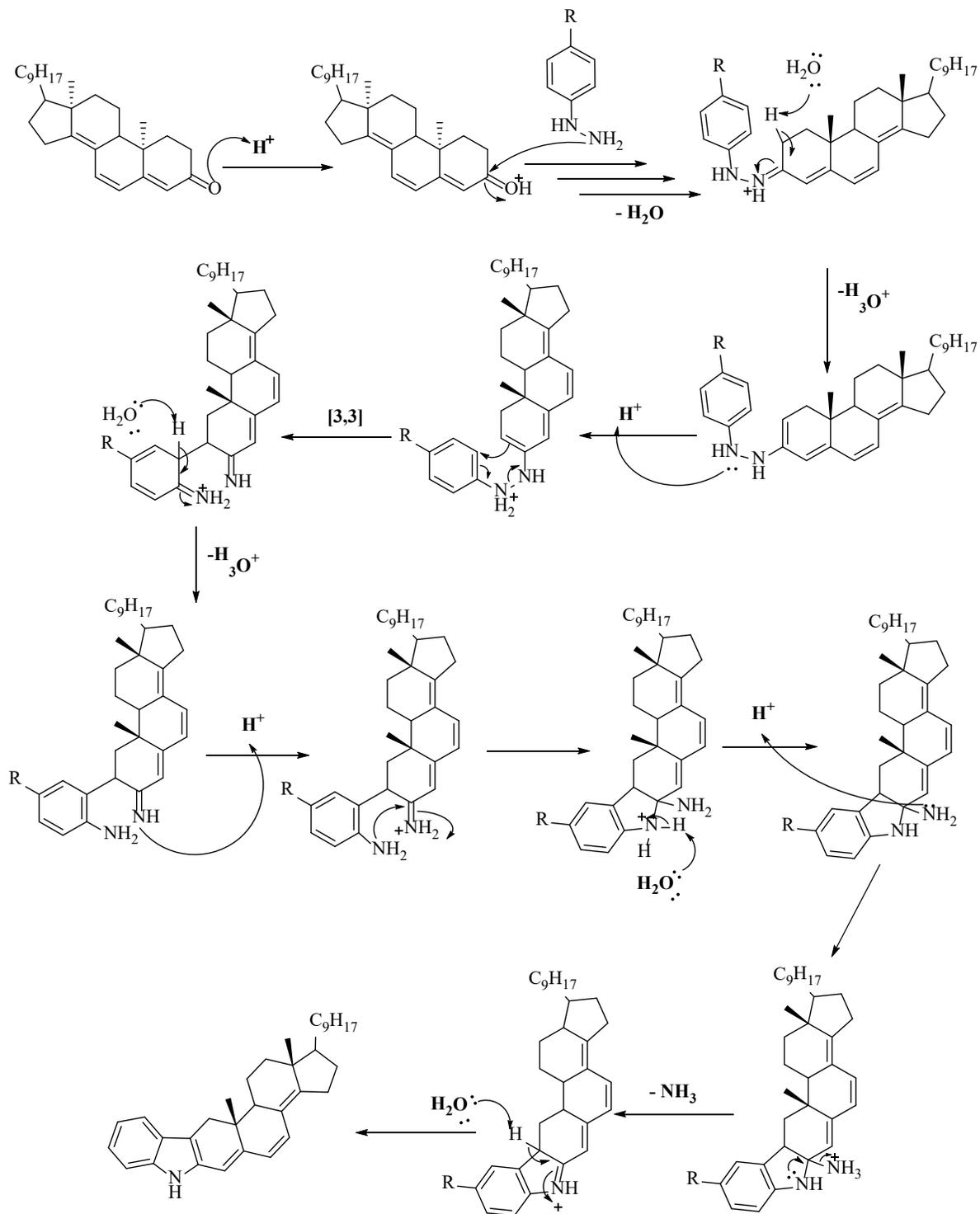


Figura 74. Mecanismo propuesto para la formación de los ergosta-[2,3;b]-1H-indol.

3.5.4.3 Caracterización estructural de 3-metil-1*H*-indol.

Con el fin de generar una estructura base, que contenga tenga cierta relación estructural con los ergosta-1*H*-indol sintetizados, se diseñó la síntesis de un compuesto utilizando 2-propanona o propanal, en las mismas condiciones de reacción detalladas anteriormente, para obtener como producto 3-metil-1*H*-indol o skatole. La síntesis anterior se encuentra descrita en la figura 73.

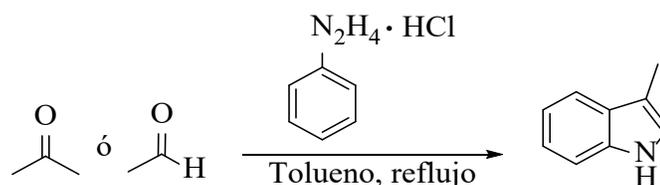


Figura 75. Esquema sintético para la obtención de 3-metil-1*H*-indol a partir de 2-propanona/etanal utilizando la indolización de Fischer.

La posterior purificación del extracto crudo, utilizando cromatografía en columna en un gradiente hexano/acetato de etilo con incremento en el porcentaje de este último, posibilitó la obtención, en un 66% de rendimiento, de 3-metil-1*H*-indol (**In 0**). La caracterización estructural se realizó empleando espectroscopía FT-IR. Se observó una banda intensa en 3518 cm⁻¹ correspondiente al *stretching* ν (N-H) como también otra señal asociada al *stretching* de ν (C-H) en 3070 cm⁻¹. Asimismo, se observa en la zona de 1700 cm⁻¹ la completa ausencia de la señal atribuida al *stretching* correspondiente al grupo carbonilo presente en la 2-propanona. Adicionalmente, la banda observada en 734 cm⁻¹ corresponde al patrón de sustitución 1,2 presente en el grupo fenilo del fragmento 3-metil-1*H*-indol. Esta evidencia, en contraste con lo informado por *d'Ischia et al.*, confirma que la estructura de compuesto sintetizado corresponde a 3-metil-1*H*-indol ⁹⁴.

3.6 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los compuestos frente a bacterias Gram positivas y negativas.

3.6.1 Ensayo de difusión en disco.

Los estudios de susceptibilidad antimicrobiana fueron llevados a cabo utilizando una concentración de 300 µg/disco del metabolito secundario **CM 1** y los compuestos semisintéticos **OX 1-7** e **In 0-3**, exceptuando **OX 5** que no se testeó por el bajo rendimiento durante la transformación química. La aplicación del disco, según protocolo descrito en el apartado 2.11.1, sobre el medio de cultivo sólido que contiene *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Salmonella species*. Después de la incubación, el diámetro de las zonas inhibitorias circulares formadas, alrededor de cada pocillo, fueron medidas y registradas en mm. Los resultados obtenidos fueron tabulados y presentados como el promedio de las medidas en término de su desviación estándar, los cuales están contenidos en las tablas 10-15.

3.6.2 Susceptibilidad antimicrobiana para CM 1 y OX 1-3.

Para la primera serie de compuestos testeados, que corresponde a **CM 1** y sus respectivos derivados **OX 1-3**, se observaron halos de inhibición promedios con valores del orden de 8,3 a 13,3 mm de inhibición. Adicionalmente, **CM 1** no presentó inhibición del crecimiento bacteriano sobre todos los organismos ensayados a la concentración utilizada. La tabla 10 resumen los promedios obtenidos del proceso en términos de su desviación estándar.

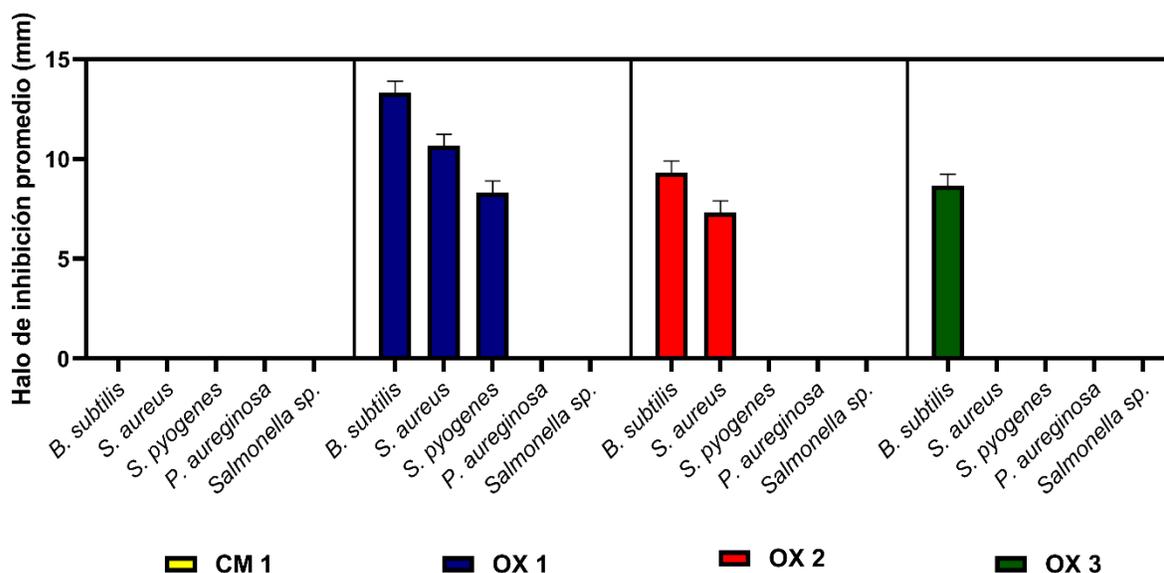
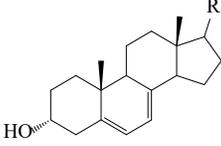
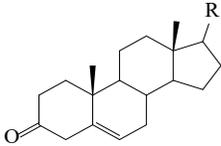
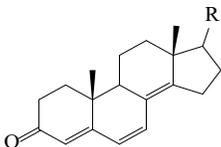
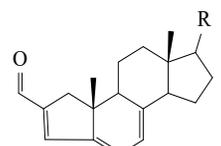


Figura 76. Halo de inhibición promedio observado para **CM 1** y **OX 1-3** frente a las bacterias estudiadas.

Para comparar el efecto antimicrobiano de la primera serie, **CM 1** y **OX 1-3**, la utilización del análisis ANOVA unidireccional, en conjunto con la prueba de *Turkey* a $\alpha = 0,05$, mostraron que existían diferencias significativas entre **CM 1** y sus análogos semi-sintéticos **OX 1-2**. Adicionalmente, se observaron diferencias significativas entre los compuestos **OX 1** y **OX 2-3** siendo únicamente no significativa la diferencia, en estas pruebas, para la comparación de **CM 1** y **OX 3** en el ensayo antimicrobiano frente a *S. aureus*. Asimismo, para *B. subtilis*, se realizó la comparación en similares condiciones estadísticas. Se mostraron diferencias significativas entre **CM 1** y **OX 1-3**; **OX 1** y **OX 2-3** y diferencias no significativas entre los datos obtenidos para **OX 2** y **OX 3**. Para *S. pyogenes*, en análisis ANOVA en una dirección mostró diferencias significativas entre **CM 1** y **OX 1** como también **OX 1** y **OX 2**. Para los promedios de **CM 1** y **OX 2-3** no se encontraron diferencias significativas en los resultados obtenidos. Para las bacterias Gram negativas estudiadas no se encontraron diferencias significativas entre los compuestos ensayados. La figura 75 muestra un resumen de los resultados obtenidos desde las pruebas ANOVA.

Tabla 10. Halo de inhibición observado, en términos del $\bar{X} \pm DS$, para los compuestos **CM-1** y **OX 1-3** mediante el uso del método de difusión en disco.

Código	Estructura	Halo de inhibición (mm \pm DS)					
		<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella sp.</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
CM 1		-	-	-	-	-	-
OX 1		10,8 \pm 0,58	13,3 \pm 0,59	8,30 \pm 0,34	-	-	-
OX 2		7,30 \pm 0,58	9,30 \pm 0,58	-	-	-	-
OX 3		-	8,80 \pm 0,58	-	-	-	-
+	Estreptomina	17,0 \pm 0,00	18,0 \pm 0,00	n.e	12,0 \pm 0,00	20,0 \pm 0,00	16,0 \pm 0,00
-	DMSO	-	-	-	-	-	-

n.e no ensayado. – sin inhibición observada.

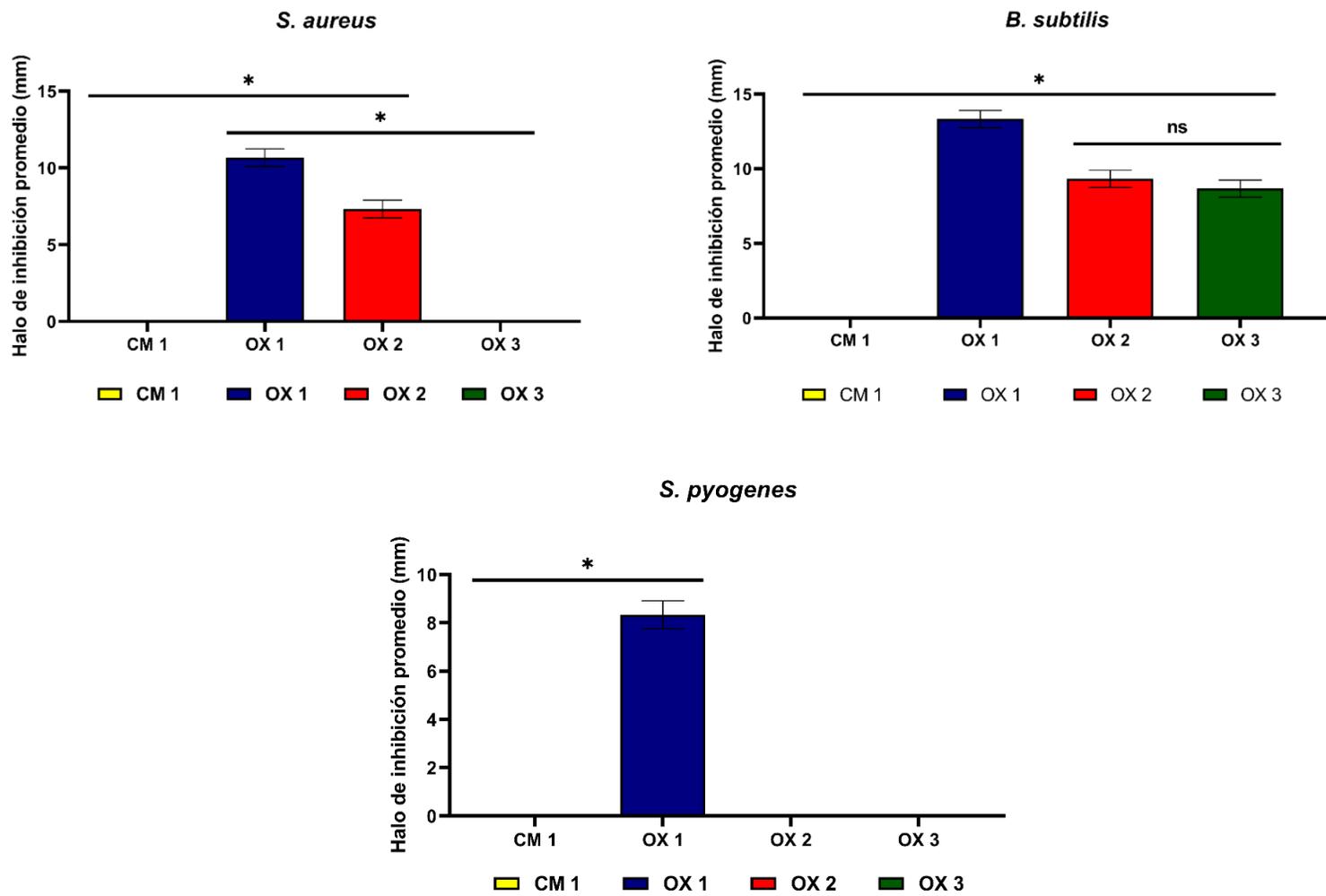


Figura 77. Diferencias significativas observadas, para **CM 1** y **OX 1-3**, mediante el análisis ANOVA en una vía. * representa diferencias significativas y **ns** representa diferencias no significativo entre los valores señalados.

3.6.3 Susceptibilidad antimicrobiana para OX 2 e In 0-3.

Para la segunda serie, que incluye **OX 2** e **In 0-3**, se midieron halos de inhibición que van desde los 7,33 a 16,4 mm y estos se encuentran contenidos en la tabla 11. La figura 76 muestra los resultados obtenidos en términos de su promedio y su desviación estándar.

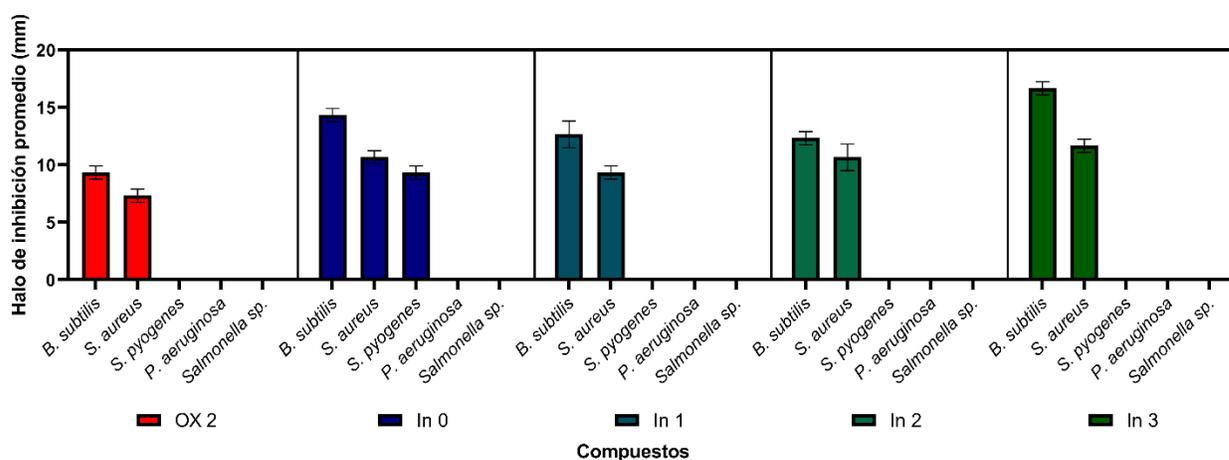
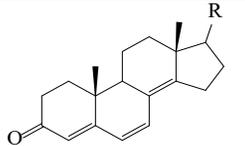
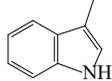
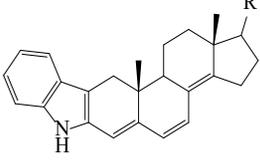
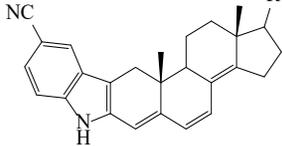
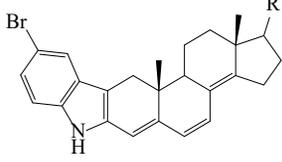


Figura 78. Halo de inhibición promedio observado, para **OX 2** e **In 0-3**, frente a las bacterias estudiadas.

El análisis estadístico para esta serie se realizó en igual condiciones que para la serie anterior. Para *S. aureus*, se apreciaron diferencias significativas entre **OX 2** y los 1*H*-indol **In 0-3**. Paralelamente, no se observaron diferencias significativas entre **In 0** e **In 1-3** pero si se observaron diferencias entre **In 1** e **In 3**. Los datos recopilados para *B. subtilis*, se observaron diferencias significativas entre **OX 2** y **In 0-3** como también, la comparación de **In 0** con sus contrapartes que contienen el núcleo 1*H*-indol mostraron diferencias significativas con **In 2-3**. En la misma condición de ensayo utilizada, no se encontraron diferencias significativas entre **In 0** e **In 1** como también, **In 1** con **In 2**. En los mismos términos, para *S. pyogenes*, se encontraron diferencias significativas entre **OX 2** e **In 0** como también, entre **In 0** e **In 1-3**. De los valores observados para **OX 2** y contrastados con **In 1-3**, no se apreciaron diferencias significativas para estos. En la figura 77 es posible apreciar las diferencias significativas, como también las diferencias no significativas, entre los distintos compuestos en las condiciones estudiadas.

Tabla 11. Halo de inhibición observado, en términos del $\bar{X} \pm DS$, para los compuestos **OX 2** e **In 0-3** mediante el uso del método de difusión en disco.

Clave	Compuesto	Halo de inhibición (mm \pm DS)					
		<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella sp.</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
OX 2		7,30 \pm 0,58	9,30 \pm 0,58	-	-	-	-
In 0		10,7 \pm 0,58	14,3 \pm 0,58	9,30 \pm 0,57	-	-	-
In 1		9,30 \pm 0,58	12,7 \pm 1,15	-	-	-	-
In 2		10,7 \pm 1,16	12,3 \pm 0,58	-	-	-	-
In 3		11,7 \pm 0,58	16,7 \pm 0,58	-	-	-	-
+	Estreptomina	17,0 \pm 0,00	18,0 \pm 0,00	n.e	12,0 \pm 0,00	20,0 \pm 0,00	16,0 \pm 0,00
-	DMSO	-	-	-	-	-	-

n.e no ensayado. – sin inhibición observada.

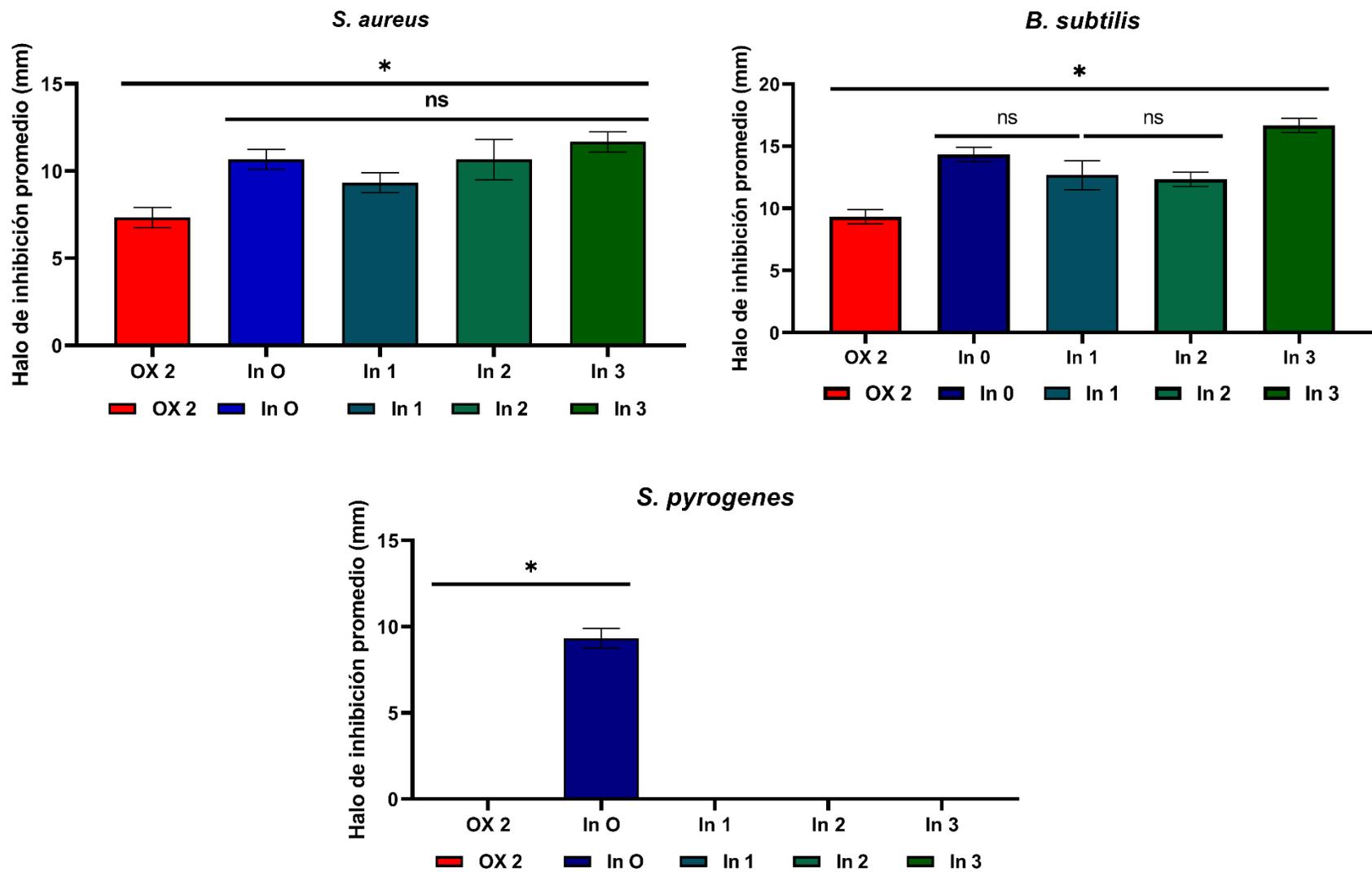


Figura 79. Diferencias significativas observadas, para OX 2 e In 0-3, mediante el análisis ANOVA en una vía para las bacterias estudiadas. * representa diferencias significativas y ns representa diferencias no significativas entre los valores señalados.

3.6.4 Susceptibilidad antimicrobiana para OX 4 y OX 6-7.

Para la tercera serie se utilizó, como posibles agentes antimicrobianos los compuestos **OX 4 6-7**, frente a un set de distintas bacterias tales como *S. aureus*, *S. mutans*, *Pseudonoma sp.* y *E. coli*, a una concentración de 300 µg/disco. Los resultados obtenidos se encuentran contenidos en la figura 78.

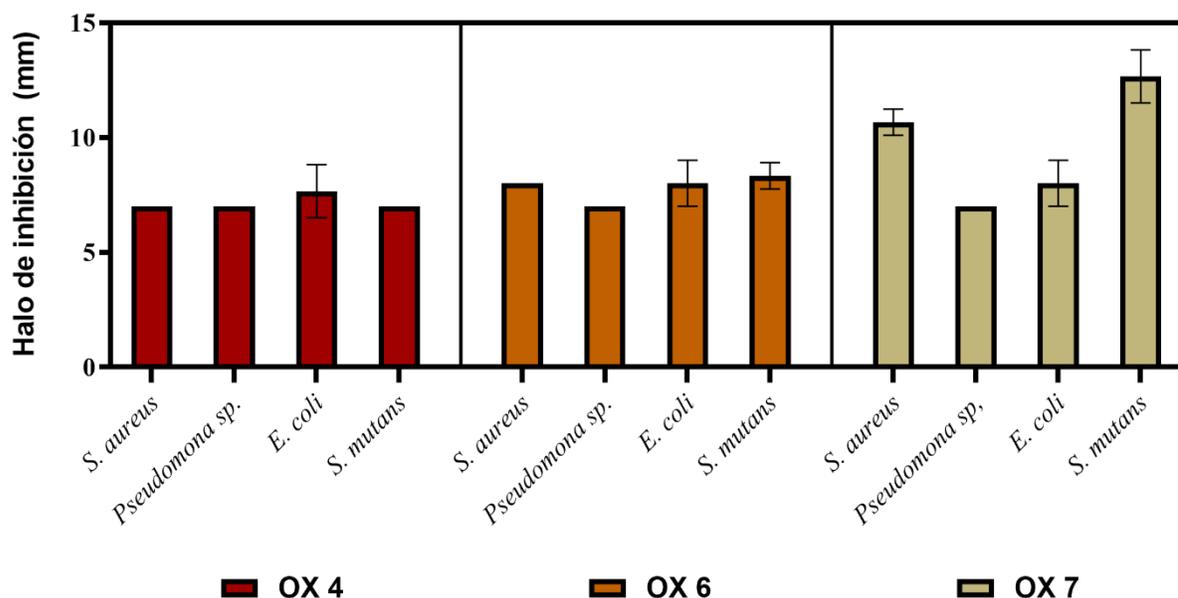
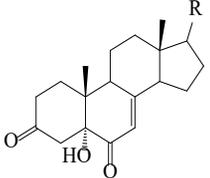
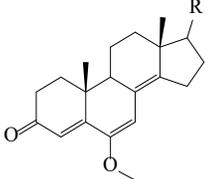
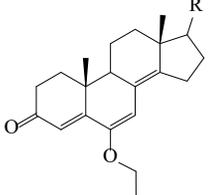


Figura 80. Halo de inhibición promedio observado, para **OX 5-7**, frente a las bacterias estudiadas.

El análisis ANOVA unidireccional, en conjunto con la prueba de Turkey a $\alpha = 0,05$, de los datos mostraron, para *S. aureus*, diferencias significativas entre los valores obtenidos para **OX 4** y **OX 6-7** como también, variaciones significativas al comparar **OX 6** y **OX 7**. Para *S. mutans*, se observaron diferencias significativas en los valores de **OX 4** con **OX 7** y **OX 6** con **OX 7** mientras que el análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre **OX 4** y **OX 6**. Para los resultados obtenidos en los sistemas *E. coli* y *Pseudomonas sp.* no se observaron diferencias significativas entre los valores obtenidos para **OX 4** y **OX 6-7**. Lo antes expuesto se puede observar

en las gráficas para cada bacteria de la figura 79. Desde el punto de vista estructural, la modificación del anillo B que contiene una α -hidroxicetona, mediante catálisis ácida, a un enoléter conjugado posibilitó un incremento en el halo de inhibición observado para esta serie. El rango observado fue de $7,0 \pm 0,0$ a $12,7 \pm 1,15$ mm de inhibición. Dentro de las transformaciones químicas producidas, la introducción de una cadena mayor en la función éter mejoró la respuesta en las condiciones ensayadas. Asimismo, es posible comparar, dentro de los compuestos sintetizados, la respuesta obtenida por **OX 2** con lo obtenido con **OX 6-7**. Los valores observados, al considerar como bacteria *S. aureus*, se desprende que el análisis de la varianza muestra que existen diferencias entre los valores percibidos para **OX 2** y **OX 7** como también **OX 7** y **OX 6**. Esto demuestra que, a pesar de la existencia de similitudes estructurales, la introducción de sustituyentes del tipo éter en la posición C6 genera un incremento en el halo de inhibición observado en bacterias Gram-positivas, en compuestos del tipo ergosta-3,5,7(14),22-tetraen-3-ona, asociada principalmente a la naturaleza electrónica de dicho grupo funcional. Adicionalmente es posible observar que, a diferencia de las series 1 y 2, estos compuestos semisintéticos presentan un amplio rango de actividad que considera tanto bacterias Gram-positivas como Gram-negativas. Tal como se comentó anteriormente, los compuestos que poseen un núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno se caracterizan por ser selectivos sobre bacterias Gram-positivas. Particularmente, los datos contenidos en la literatura, tanto para 7-aminocolesterol como escualamina, mostraron que estos actúan en un amplio espectro bacterial. Esta propiedad se puede atribuir principalmente en la sustitución producida en el anillo B por grupos dadores de electrones como $-\text{OH}$; $-\text{NH}_2$; $-\text{OMe}$; entre otros. Específicamente, este incremento de acción es observado si la sustitución, de los grupos antes mencionados, están preferentemente en las posiciones 5, 6 o 7 del anillo B del núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno.

Tabla 12. Halo de inhibición observado, en términos del $\bar{X} \pm DS$, para los compuestos **OX 4-6-7** mediante el uso del método de difusión en disco.

Clave	Estructura	Halo de inhibición (mm \pm DS)			
		<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas sp.</i>
OX 4		7,00 \pm 0,00	7,00 \pm 0,00	7,70 \pm 1,20	7,00 \pm 0,00
OX 6		8,00 \pm 0,0	8,30 \pm 1,20	8,00 \pm 0,00	7,00 \pm 0,00
OX 7		10,7 \pm 0,58	12,7 \pm 1,15	8,00 \pm 1,00	7,00 \pm 0,00
+	Estreptomycin	17,0 \pm 0,00	n.e	12,0 \pm 0,00	16,0 \pm 0,00
-	DMSO	-	-	-	-

n.e no ensayado. – sin inhibición observada.

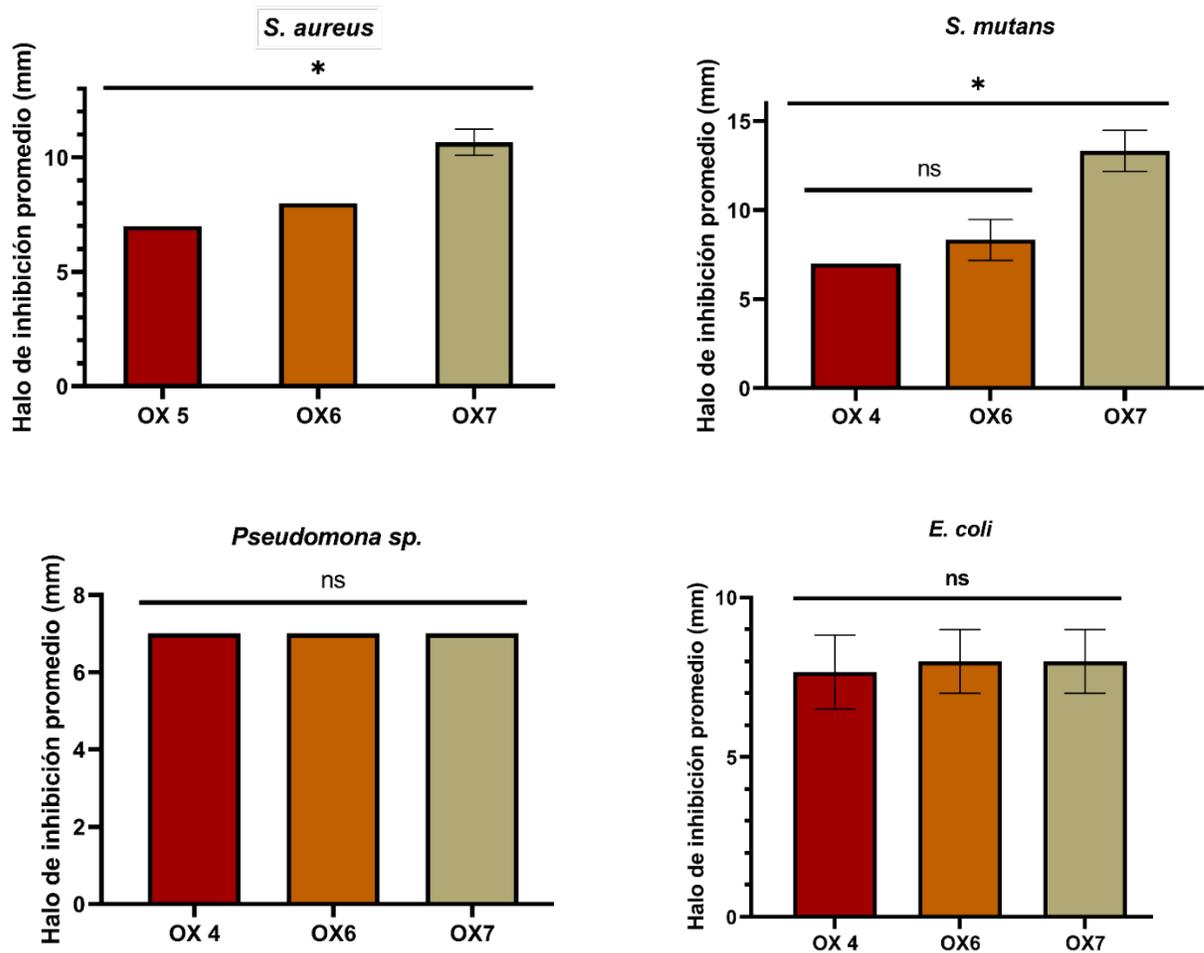


Figura 81. Diferencias significativas observadas, para OX 4 - 7, mediante el análisis ANOVA en una vía para las bacterias estudiadas. * representa diferencias significativas y ns representa diferencias no significativas de los valores.

3.6.5 Comparación y discusión de la susceptibilidad antimicrobiana de CM 1, OX 1-7 e In 0-3 frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.

El análisis estadístico demostró que existen diferencias significativas entre los valores de inhibición para los metabolitos precursores, de las distintas síntesis ejecutadas en esta tesis doctoral, como los productos obtenidos en las series 1-3. En este sentido, al comparar los

resultados del antibiograma de **CM 1**, con sus respectiva ergosta-3-onas **OX 1-3** (Tabla 10), se observó un incremento en la sensibilidad, que poseen estos compuestos semisintéticos, sobre las bacterias estudiadas, en relación con la actividad nula observada para ergosterol. Asimismo, se observan que las medidas de las zonas de inhibición, para **OX 1-3**, presentan selectividad sobre bacterias Gram positivas, en un rango de $7,30 \pm 0,58$ a $13,3 \pm 0,59$ mm, siendo las bacterias Gram negativas resistentes al actuar de estos compuestos semisintéticos. Desde el punto de vista estructural, la principal diferencia observada, para el conjunto **CM 1** y **OX 1-3**, es el grado de insaturación presente en los anillos A, B y C del núcleo ergostano. Tomando como ejemplo, los valores obtenidos al evaluar la capacidad antimicrobiana sobre *B. subtilis*, es posible generar una correlación entre la menor rigidez del sistema y el halo de inhibición observado. De tal manera, al considerar este aspecto, y sumando las diferencias significativas analizadas previamente, es posible ordenar, de manera decreciente, el efecto antimicrobiano para esta serie como: **OX 1 > OX 2 \approx OX 3**.

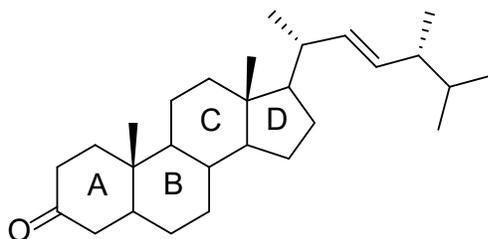


Figura 82. Cuatro dominios asociados al anillo ciclopentanoperhidrofenantreno.

En la segunda serie, que comprende los compuestos **OX 2** e **In 0-3**, se observaron mayores valores de halo de inhibición sobre bacterias Gram positivas y, similar a la primera serie, una resistencia sobre bacterias Gram-negativas. En términos del halo registrado, para **In 0-3**, se observa una medición que va desde los $9,30 \pm 0,58$ a $16,7 \pm 0,58$ mm de inhibición

bacterial. Este *screening*, de la potencial actividad antimicrobiana de **OX 2** e **In 0-3**, mostró que la variación de los sustituyentes, en los anillos aromáticos del grupo 1*H*-indol, mejoraron la susceptibilidad antimicrobiana de **OX 2** sobre bacterias Gram positivas y que fue confirmado mediante la comparación estadística, entre **OX 2** e **In 0-3**, mediante el ANOVA en una vía. Por otra parte, si consideramos el resultado del análisis estadístico, al comparar solo los compuestos que posean en su estructura el núcleo 1*H*-indol, es decir, **In 0** con **In 1-3**, es posible identificar que no existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos para *S. aureus* mientras que, para *B. subtilis*, solo se observaron diferencias significativas entre **In 0** e **In 3**. En términos de analizar las ergosta-[2,3;*b*]-1*H*-indol derivados, para *B. subtilis*, solo existen diferencias significativas entre **In 3** con **In 1-2** mientras que, para *S. aureus*, sólo se observaron parámetros significativamente distintos al asociar **In 3** con **In 1**. Esta tendencia observada en los datos posibilita la generación de una tendencia en base a la estructura de dichos compuestos. Debido a que la sustitución en los anillos aromáticos es: **In 1** = 4-H; **In 2** = 4-CN; **In 3** = 4-Br, el halo de inhibición, para sistemas ergosta-[2,3;*b*]-1*H*-indol, se verá favorecido con un incremento en el halo de inhibición por la sustitución de grupos dadores de electrones mientras que, a grupos atractores de electrones, se verá disminuido el valor respecto a la otra serie. Al considerar todos los aspectos anteriores, es posible ordenar, de manera decreciente, el efecto antimicrobiano para esta serie como: **In 3** > **In 2** ≈ **In 1** ≈ **In 0** > **OX 2**.

Tomando en cuenta los aspectos estructurales asociados a la serie **CM 1 – OX 1-4** y **OX 2 – In 0-3**, existe una relación con distintos compuestos encontrados en la literatura y que han sido descritos en el “estado del arte”. Principalmente, podemos relacionar la unidad básica ciclopentanoperhidrofenantreno con los compuestos 4-aminocolesterol, ácido fusídico y escualamina detallados en la figura 83. Para los primeros, en término de su actividad

antimicrobiana, se ha observado selectividad en la inhibición de bacterias Gram-positivas, tal como lo observado para los compuestos sintetizados de las series antes señaladas ^{52,53,95}.

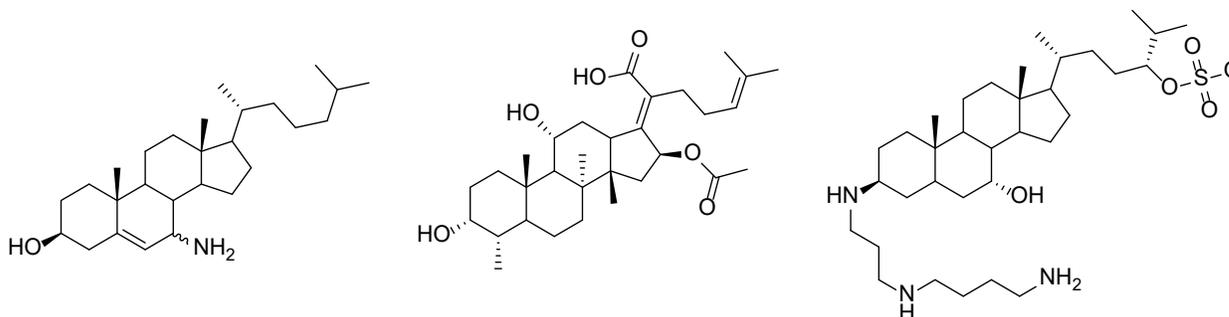


Figura 83. 4-aminocolesterol, ácido fusídico y escualamina como agentes antimicrobianos.

Las bacterias Gram-positivas tienen una pared celular relativamente gruesa que contiene varias capas de peptidoglicano. Se ha sugerido que estos compuestos, al unirse físicamente a la célula, pueden actuar como bactericidas. Si por la unión, la membrana de la bacteria es curvada, provocará una deformación que comprometerá la supervivencia de la célula que finalmente morirá. En este sentido, *Kaminski y Venegas* han propuesto una representación del proceso que ocurre cuando un esteroide, que puede ser colesterol o bien ergosterol, interactúa con la bicapa de fosfolípidos generando un poro. Esta deformación es atribuida principalmente a la propiedad anfipática que presentan estos esteroides y que provoca que este se adhiera a los fosfolípidos que componen la pared celular mediante interacciones de *Van der Waals* ^{96,97}. De esta manera, la variación de la fluidez y permeabilidad de la pared celular repercute en la generación de medios poros como también poros completos, que posibilita el escape de iones K^+ como también pequeñas moléculas orgánicas vitales para el funcionamiento de la célula procariota. Esta cualidad que presenta ergosterol posibilita que otras moléculas, como la amfotericina B, puedan provocar un mejoramiento de la permeabilidad del antibiótico. Este efecto sinérgico puede ser

observado mediante el modelo de canal iónico propuesto por *Kaminski* y que se encuentra contenido en la figura 84.

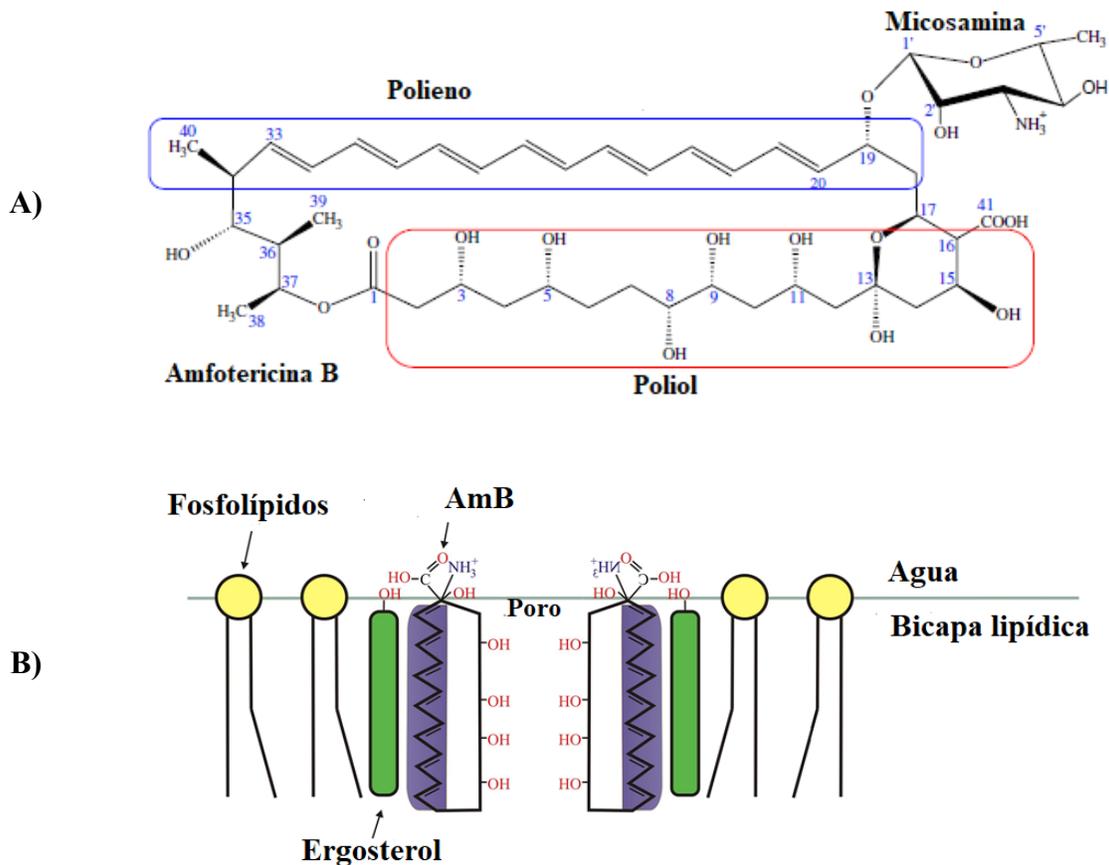


Figura 84. A) Estructura de la amfotericina B (AmB). B) Modelo de canales iónicos en que la amfotericina B se une, por interacciones de vdW, con ergosterol ⁹⁶.

El efecto sinérgico esterol-antibiótico se encuentra débilmente descrito en la literatura, donde principalmente se hayan artículos que relacionan dicho efecto asociado a la inhibición de especies fúngicas, en especial, a hongos oportunistas como es *Candida albicans* entre otros miembros pertenecientes a este reino ⁹⁸⁻¹⁰⁰. Un estudio reciente, desarrollado por *Andrade y colaboradores*, muestra el efecto sinérgico como antagónico que producen colesterol, ergosterol y colesterciferol frente a antibióticos del tipo aminoglucósidos, como la amikacina, gentamicina

y neomicina, sobre cepas resistentes de *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *E. coli*. Los tres agentes pro-sinérgicos fueron testeados con las bacterias resistentes arrojando vales de CMI >1024 µg/mL. Al mezclar estos aminoglucósidos con concentraciones de 512, 256 y 128 µg/mL de colesterol, ergosterol y colecalciferol, en forma separada, donde se ha mostrado sinergia a menores concentraciones, para bacterias Gram-negativas, y mayores para las bacterias Gram-positivas ⁵⁹. Para ergosterol, se obtuvo un número mayor de eventos moduladores que se encuentran asociados a un mayor número de veces del proceso sinérgico. A raíz de esto, se obtuvo una reducción del 75-85% sobre el CMI observado para los aminoglucósidos en las condiciones ensayadas ⁵⁹.

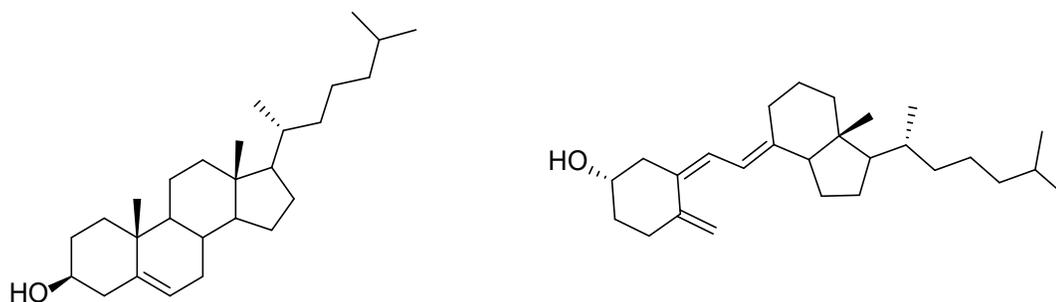


Figura 85. Colesterol y colecalciferol como agentes sinérgicos antimicrobianos.

Otra aproximación que se puede establecer sobre el modo de acción es asociar la posible inhibición de la síntesis de la pared celular. Los estudios relacionan que hay inhibición de la actividad de la glicosiltransferasa y transpeptidasa de PBP1B por aminoesteroles que contienen el anillo ciclopentanoperhidrofenantreno funcionalizaciones en las posiciones C17, como una cadena apolar, y en el C3, C6 o C7 con un grupo polar ¹⁰¹. Esta inhibición provoca la formación de nuevas cadenas de peptidoglicano debilitado, que se traduce en un entrecruzamiento inferior, lo cual genera la lisis celular. Asimismo, tal como se describió anteriormente, se ha observado que uno de los posibles mecanismos de acción relaciona la interacción electroestática que genera

depolarización en la membrana celular. Esta medida está directamente relacionada con la generación poros/lesiones y que por el efecto mecánico de tensión osmótica interna, provoca la ruptura de la membrana en cuestión ¹⁰². Considerando también que los derivados de ergosterol poseen propiedades anfipáticas, que posibilitan un traspaso eficiente de él a través de la pared celular, hace sentido que la depolarización como también la posible inhibición de las transpeptidasas de la PBP1b, pueden explicar el efecto antibacteriano que presentarían los análogos **OX 1-4** e **In 1-3** sobre bacterias Gram-positivas.

Por otra parte, la inexistente inhibición bacteriana de los compuestos esteroideos de la serie 1 y 2, contra las bacterias Gram-negativas, se asocia principalmente a la baja interacción que se produce con la pared celular, principalmente por las capas de lipopolisacárido, y pocas capas de peptidoglicano, que se encuentran asociadas a dicha estructura ¹⁰³. Un segundo mecanismo que se ha propuesto para derivados que contienen el anillo ciclopentanoperhidrofenantreno, como también para colesterol, ergosterol y aminocolesterol derivados, ha sido la directa interacción que tienen estos compuestos con los distintos fosfolípidos, y que repercuten en la pérdida de la composición específica de estas membranas. Dentro de los contactos moleculares observados, principalmente por estudios de dinámica molecular, se han planteado varios modelos de interacciones, entre los que destaca 1-estearoil-2-oleil-sn-glicero-3-fosfocolina, dipalmitoilfosfatidilcolina, 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina como fosfolípidos frente a colesterol ¹⁰⁴⁻¹⁰⁶ y ergosterol ¹⁰⁷. La figura 84 muestra el empaquetamiento generado cuando colesterol interactúa con la palmitoil-oleil-fosfatidilcolina (POPC), donde el grupo OH no está inserto en el complejo (Figura A) mientras que, al interactuar colesterol con la esfingomielina, se forma un puente de hidrógeno entre el grupo hidroxilo y el grupo NH del esfingolípido.

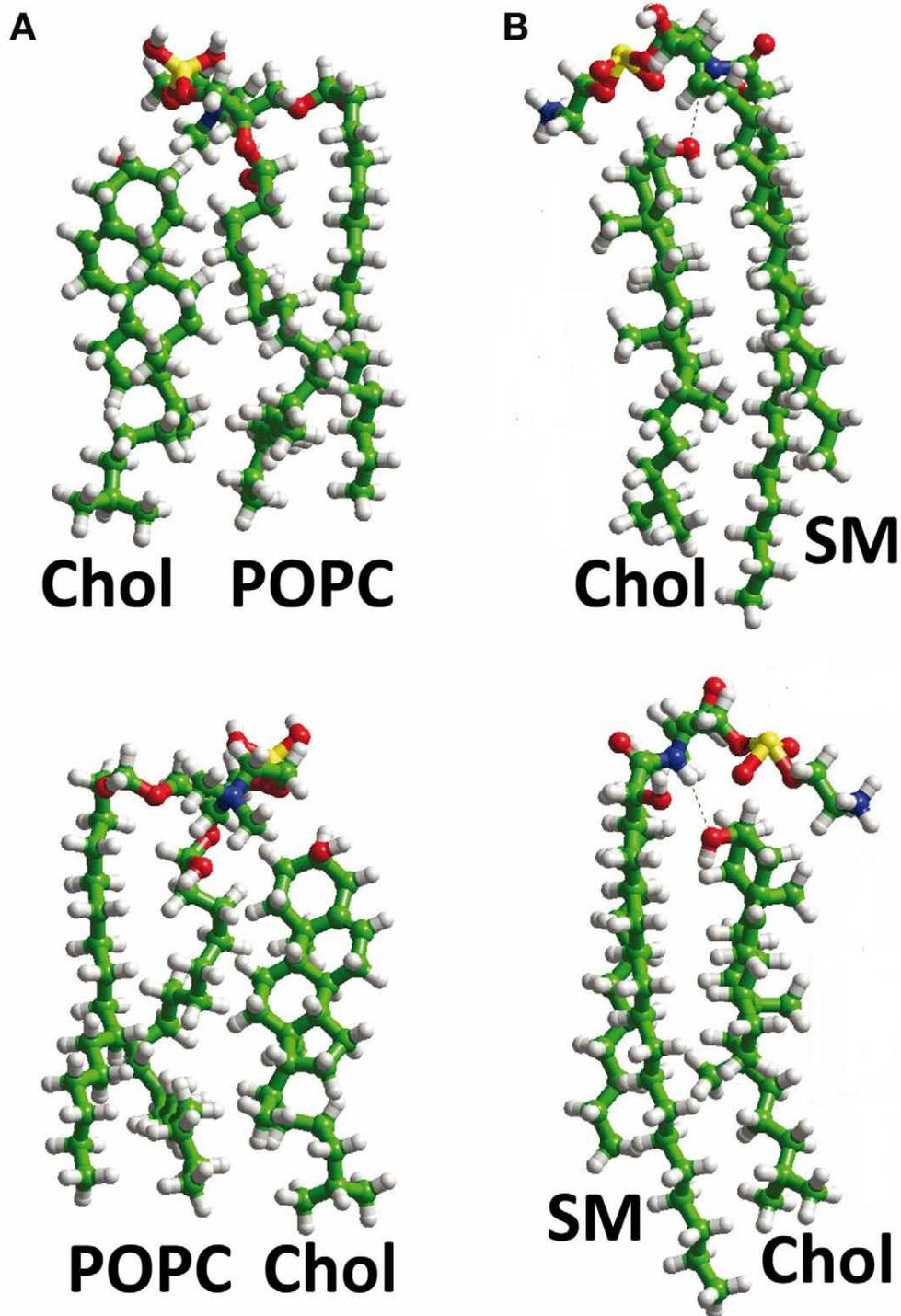


Figura 86. Interacciones lípido-colesterol. En la membrana plasmática, el colesterol (Chol) puede interactuar con la fosfatidilcolina, por ejemplo, palmitoil-oleil-fosfatidilcolina (POPC) o esfingolípidos como la esfingomielina (SM) ¹⁰⁵.

En ese sentido, podemos decir que los compuestos hemisintetizados en esta tesis doctoral pueden presentar una mayor afinidad sobre los fosfolípidos, y que se traduce en contactos más eficientes, del tipo *Van der Waals* y fuerzas hidrófobas, respecto a colesterol y ergosterol. Esta característica se puede traducir finalmente en la generación de una emulsión capaz de agrupar los fosfolípidos con nuestros derivados esteroidales, posibilitando cambios estructurales importantes en la fluidez y permeabilidad de la pared celular, que desencadenará en la no supervivencia de la célula bacterial ¹⁰⁸. Se plantea las probables interacciones descritas previamente utilizando como modelo lo expuesto por *Alhanout y colaboradores* ⁵⁶.

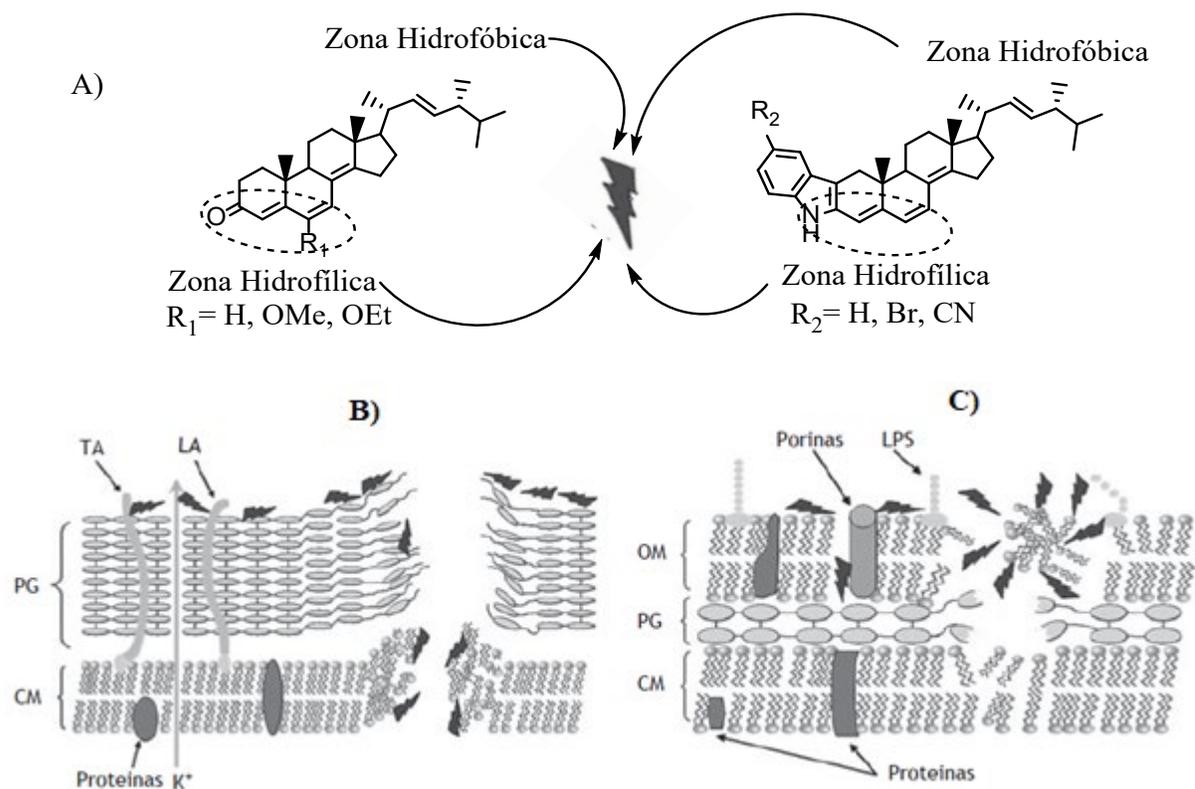
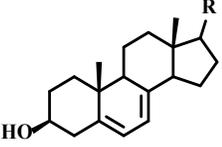
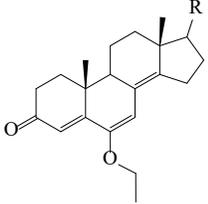


Figura 87. A) Identificación de la zona hidrofílica e hidrofóbica encontradas en las principales ergosta-3-onas como las ergosta-[2,3; b]-1*H*-indol. B) Principal interacción propuesta para bacterias Gram-positivas. C) Principal interacción propuesta para los compuestos hemisintetizados frente a bacterias Gram-positivas ⁵⁶.

3.7 Determinación de la concentración mínima inhibitoria para OX 7.

La determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) fue realizada sobre *S. aureus* y *S. mutans*, siendo utilizado como agente antimicrobiano el compuesto que presentó mayor susceptibilidad de la serie 3. Luego del desarrollo del ensayo, se obtuvieron los siguientes valores de CMI para OX 7 y que se encuentran contenidos en la tabla 13^{58,59}.

Tabla 13. Concentración mínima inhibitoria para 6-etoxi-ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona sobre bacterias Gram-positivas.

Clave	Estructura	CMI* (µg/mL)	
		<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
CM 1		> 1024	n.e
OX 7		200	160

n.e = no ensayado.

*CMI representa el rango de concentración más bajo en el que no se pudo observar el crecimiento de microorganismos.

Las magnitudes obtenidas muestran que OX 7 es más activo sobre *S. mutans* que *S. aureus* y que esta tendencia se puede correlacionar con los datos obtenido en la prueba de susceptibilidad realizados previamente. En términos de la información descrita en la literatura, los valores CMI para los compuestos de la figura 83 son: 7-aminocolesterol presenta un CMI de 1,2 µg/mL; escualamina presenta un CMI 1-2 µg/mL y ácido fusídico posee un CMI de 0,03-0,25 µg/mL, todos

estos valores asociados a *S. aureus*. Dentro de la variabilidad estructural, la cetona endocíclica presente, en los derivados **OX 1-7**, reduce la potencial susceptibilidad de estos derivados. De esta manera, se puede plantear alternativas sintéticas para mejorar la susceptibilidad en términos de la magnitud obtenida. En relación a análogos similares, Andrade y colaboradores sugieren que las bacterias Gram-positivas como a Gram-negativas son resistentes a ergosterol, precursor sintético de **OX 1-7**, y donde su CMI asociado es superior a 1024 µg/mL⁵⁸. De esta manera, la modificación estructural de este metabolito secundario ya sea, la generación de una cetona endocíclica en C3 como también la consecuente transformación a enoléteres posibilita un incremento en la susceptibilidad que presentan estos ergosta-derivados y que se traduce en la reducción de la cantidad de compuesto necesaria para inhibir bacterias Gram-positivas en las condiciones utilizadas. Asimismo, como se mencionó anteriormente, la introducción de grupos en el anillo B del ciclopentanoperhidrofenantreno, posibilita la generación de compuestos de amplio espectro bacterial asociado a bacterias Gram-positivas como a Gram-negativas.

3.8 Relación estructura/actividad de los derivados esteroidales.

Luego del análisis exhaustivo de los resultados obtenidos en las distintas pruebas realizadas en esta tesis doctoral, es posible establecer una relación estructura/actividad considerando las modificaciones estructurales sufridas en el núcleo ergostano y que han posibilitado mejorar el efecto antimicrobiano de los compuestos hemisintetizados frente a lo descrito para ergosterol. A partir de ello, es posible establecer las siguientes relaciones:

A. La modificación estructura de ergosterol, utilizado PCC como oxidante, condujo al incremento de la susceptibilidad microbiana, en términos de la magnitud del halo de inhibición observado, para los compuestos **OX 1-3** frente a bacterias Gram-positivas.

B. A pesar de tener mayores valores de inhibición los compuestos oxidados, según la información contenida en la literatura, preferentemente es ideal mantener el grupo hidroxilo, o en su defecto un grupo amino, en la posición 3 de cualquier esterol, donde esta acción provocará un incremento en la susceptibilidad sobre bacterias Gram-positivas.

C. La introducción del fragmento 1*H*-indol, por medio de la síntesis de Fischer, posibilitó el incremento en la magnitud del halo de inhibición, para In 1-3 con relación a **OX 2**, preferentemente sobre bacterias Gram-positivas. Tomando en cuenta la no diferencia significativa obtenida con **In 0**, no se observó un incremento sustancial debido a la no derivatización presentada sobre el anillo B del cicloperhidrofenantreno. Se espera que, los análogos sustituidos en C6, por OEt y OMe, generen indoles con una mayor actividad antimicrobiana, en término de su halo de inhibición, que los **In 1-3** estudiados.

D. La derivatización de **OX 4**, mediante catálisis ácida alcohólica, aumentó el rango de la susceptibilidad bacteriana abarcando especímenes Gram-positivos y Gram-negativos. Esta modificación posibilitará, a futuro, la generación de nuevos análogos adecuados para su derivatización utilizando el método de Fischer.

La figura 88 resume los aspectos descritos anteriormente.

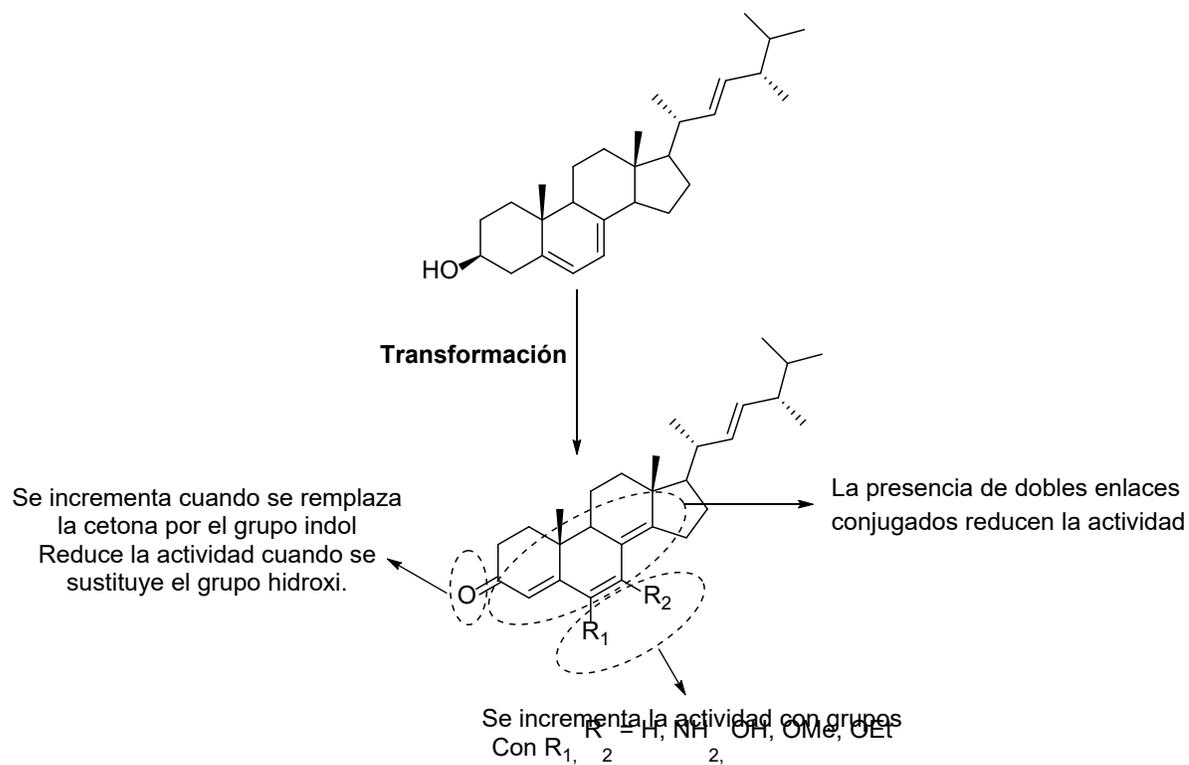


Figura 88. Relaciones estructurales observadas, al modificar sintéticamente ergosta-5,7,22-trien-3β-ol, en términos de la actividad antimicrobiana obtenida.

4 Conclusiones.

Luego del desarrollo de todas las etapas que componen esta tesis doctoral, pudimos llegar a las siguientes conclusiones:

A. Los hongos son un reino complejo y variado, poseen metabolitos secundarios novedosos y con potenciales propiedades terapéuticas. En nuestro caso, el primer estudio fitoquímico para *C. magellanicus* posibilitó la obtención y caracterización de ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol y algunos derivados como compuestos mayoritarios, mientras que para *S. granulatus* se logró aislar e identificar ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol, 4,4'-bovilactona, suillusin mediante la utilización de métodos espectroscópicos clásicos.

B. La identificación, de los principales componentes presentes en los macrohongos estudiados, permitió el planteamiento racional de modificaciones estructurales en el esqueleto ergostano. Estas modificaciones, realizadas mediante la utilización de PCC, fueron necesarias para la oxidación del alcohol a las respectivos ergosta-3-ona como también a sus ergosta-3,6-diona derivados. De esta transformación, posibilitó la síntesis de tres nuevos precursores no descritos en la literatura.

C. La consecutiva derivatización, a través de la metodología expuesta por Fischer, produjo nuevos híbridos ergosta-[2,3;*b*]-1*H*-indol. La detección colorimétrica, en conjunto con la caracterización estructural, posibilitó la identificación de nuevos sets de señales asignados al correspondiente fragmento 1*H*-indol introducido. De esta modificación estructural fue posible la generación de tres nuevos productos semi-sintéticos no descritos en la literatura.

D. La medición de la susceptibilidad antimicrobiana por difusión en disco posibilitó establecer diferencias significativas. Desde el punto de vista estadístico, las ergosta-3-onas como los ergosta-1*H*-indol presentaron reales variaciones numéricas en relación con lo observado para ergosterol en

las condiciones ensayadas. Considerando los parámetros establecidos por la NCLSI, *B. subtilis* presentó una susceptibilidad media frente a **In 2** en las condiciones ensayadas.

E. La medición de la susceptibilidad antimicrobiana por difusión en caldo para **OX 7** mostró valores de CMI inferiores a los presentados para ergosterol en la literatura. Esta variación presenta nuevas posibilidades para mejorar la inhibición bacteriana modificando el grupo cetona ubicado en el anillo A de este derivado, o bien, la generación de nuevos híbridos *1H*-indol.

F. Por último, considerando los resultados obtenidos en el estudio de la susceptibilidad antimicrobiana en difusión en disco para **OX 1-7** e **In 1-3**, se establece que la hipótesis planteada en este trabajo de investigación es válida.

REFERENCIAS.

1. Butler, M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. *J. Nat. Prod.* **67**, 2141–2153 (2004).
2. Chintoju, N., Konduru, P., Kathula, R. L. & Remella, R. Importance of Natural Products in the Modern History. *Res. Rev. J. Hosp. Clin. Pharm.* **1**, 5–10 (2015).
3. Ruggiero, M. A. *et al.* A Higher Level Classification of All Living Organisms. *PLoS One* **10**, e0119248 (2015).
4. Daley, D. K., Brown, K. J. & Badal, S. *Fungal Metabolites. Pharmacognosy* (2017). doi:10.1016/B978-0-12-802104-0.00020-2.
5. Kuhar, F., Castiglia, V. & Papinutt, L. Reino Fungi: morfologías y estructuras de los hongos. *REVISTA BOLETÍN BIOLÓGICA* 10–18 (2013).
6. Ministerio del medio ambiente Chile. Ficha de antecedentes *Cortinarius magellanicus* Spegazzini. 1–5 (2014).
7. Lazo, W. *Hongos de Chile: Atlas micológico*. (2001). doi:10.34720/wfv2-fp12.
8. Hecker, M. & Völker, U. General stress response of *Bacillus subtilis* and other bacteria. in 35–91 (2001). doi:10.1016/S0065-2911(01)44011-2.
9. Deacon, J. *Fungal Biology*. (Blackwell publishing, 2006).
10. Ávalos, J., Díaz-Sánchez, V., García-Martínez, Jorge Castrillo, M., Ruger-Herreros, M. & Limón, M. C. *Biosynthesis and Molecular Genetics of Fungal Secondary Metabolites, Fungal Biology. Biosynthesis and Molecular Genetics of Fungal Secondary Metabolites, Fungal Biology* (2014). doi:10.1007/978-1-4939-1191-2.
11. Lamb, D. C. *et al.* Lanosterol Biosynthesis in the Prokaryote *Methylococcus Capsulatus*: Insight into the Evolution of Sterol Biosynthesis. *Mol. Biol. Evol.* **24**, 1714–1721 (2007).
12. Nes, W. D. Biosynthesis of Cholesterol and Other Sterols. *Chem. Rev.* **111**, 6423–6451 (2011).
13. Brondz, I., Ekeberg, D., Høiland, K., Bell, D. S. & Annino, A. R. The real nature of the indole alkaloids in *Cortinarius infractus*: Evaluation of artifact formation through solvent extraction method development. *J. Chromatogr. A* **1148**, 1–7 (2007).
14. Geissler, T. *et al.* Acetylcholinesterase inhibitors from the toadstool *Cortinarius infractus*. *Bioorganic Med. Chem.* **18**, 2173–2177 (2010).
15. Teichert, A., Schmidt, J., Porzel, A., Arnold, N. & Wessjohann, L. Brunneins A-C, β -

- carboline alkaloids from *Cortinarius brunneus*. *J. Nat. Prod.* **70**, 1529–1531 (2007).
16. Teichert, A., Schmidt, J., Porzel, A., Arnold, N. & Wessjohann, L. N-glucosyl-1H-indole derivatives from *cortinarius brunneus* (Basidiomycetes). *Chem. Biodivers.* **5**, 664–669 (2008).
 17. Teichert, A., Schmidt, J., Porzel, A., Arnold, N. & Wessjohann, L. (Iso)-quinoline alkaloids from fungal fruiting bodies of *Cortinarius subtortus*. *J. Nat. Prod.* **71**, 1092–1094 (2008).
 18. Beattie, K. *et al.* Austrocolorins A1 and B1: Atropisomeric 10,10-linked dihydroanthracenones from an Australian *Dermocybe sp.* *Phytochemistry* **65**, 1033–1038 (2004).
 19. Beattie, K. D. *et al.* Austrocolorone B and austrocolorin B1, cytotoxic anthracenone dimers from the Tasmanian mushroom *Cortinarius vinosipes* Gasparini. *Tetrahedron Lett.* **52**, 5448–5451 (2011).
 20. Beattie, K. D. *et al.* Antibacterial metabolites from Australian macrofungi from the genus *Cortinarius*. *Phytochemistry* **71**, 948–955 (2010).
 21. Zhang, A. L. *et al.* Rufoolivacin B, a novel polyketide pigment from the fruiting bodies of the fungus *Cortinarius rufo-olivaceus* (basidiomycetes). *Chinese Chem. Lett.* **20**, 1324–1326 (2009).
 22. Müller, M. *et al.* Biosynthesis and stereochemistry of phlegmacin-type fungal pigments. *European J. Org. Chem.* 4850–4855 (2004) doi:10.1002/ejoc.200400518.
 23. Gill, M. & Milanovic, N. M. Pigments of Fungi. LVIII. Sinapiquinone and Sinapicolone, Red Pigments from the Toadstool *Cortinarius sinapicolor*. *Australian Journal of Chemistry* vol. 52 1035 (1999).
 24. Gill, M. Pigments of fungi (Macromycetes). *Nat. Prod. Rep.* **20**, 615–639 (2003).
 25. Gill, M. Pigments of Australasian *Dermocybe* Toadstools. *Aust. J. Chem.* **48**, 1–26 (2013).
 26. Wang, F., Tan, J.-W. & Liu, J.-K. Vibratilicin: a Novel Compound from the Basidiomycete *Cortinarius vibratilis*. *Helv. Chim. Acta* **87**, 1912–1915 (2004).
 27. Torres, S. *et al.* Steroidal composition and cytotoxic activity from fruiting body of *Cortinarius xiphidipus*. *Nat. Prod. Res.* **31**, 473–476 (2017).
 28. Aung, H. T., Porta, A., Clericuzio, M., Takaya, Y. & Vidari, G. Two New Ergosterol Derivatives from the Basidiomycete *Cortinarius glaucopus*. *Chem. Biodivers.* **14**, e1600421 (2017).

29. Onajole, O. K. *et al.* Preliminary Structure - Activity Relationships and Biological Evaluation of Novel Antitubercular Indolecarboxamide derivative against drug-susceptible and drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains. *J. Med. Chem.* **56**, 4093–4103 (2013).
30. Du, F. Y., Li, X. M., Li, C. S., Shang, Z. & Wang, B. G. Cristatumins A-D, new indole alkaloids from the marine-derived endophytic fungus *Eurotium cristatum* EN-220. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **22**, 4650–4653 (2012).
31. Lindequist, U., Niedermeyer, T. H. J. & Jülich, W. D. The pharmacological potential of mushrooms. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* **2**, 285–299 (2005).
32. Kremer, D. *et al.* Anthraquinone profiles, antioxidant and antimicrobial properties of *Frangula rupestris* (Scop.) Schur and *Frangula alnus* Mill. bark. *Food Chem.* **131**, 1174–1180 (2012).
33. Suay, I. *et al.* Screening of basidiomycetes for antimicrobial activities. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* **78**, 129–139 (2000).
34. Geraci, C., Piatelli, M., Tringali, C., Verbist, J. F. & Roussakis, C. Cytotoxic activity of tetraprenylphenols related to suillin, an antitumor principle from *Suillus granulatus*. *J. Nat. Prod.* **55**, 1772–1775 (1992).
35. Tringali C., P. M. G. C. & Nicolosi, G. Antimicrobial Tetraprenylphenols from *Suillus-Granulatus*. *J. Nat. Prod.* **52**, 941–947 (1989).
36. Tomasi, S., Lohézic-Le Dévéhat, F., Sauleau, P., Bézivin, C. & Boustie, J. Cytotoxic activity of methanol extracts from Basidiomycete mushrooms on murine cancer cell lines. *Pharmazie* **59**, 290–293 (2004).
37. Huang, Y.-T., Onose, J., Abe, N. & Yoshikawa, K. In vitro inhibitory effects of pulvinic acid derivatives isolated from Chinese edible mushrooms, *Boletus calopus* and *Suillus bovinus*, on cytochrome P450 activity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **73**, 855–860 (2009).
38. Salud, O. mundial de la. Tuberculosis. *Nota descriptiva* 1 (2018).
39. Global, C. La resistencia a los antibióticos matará más que el cáncer en 2050. https://cronicaglobal.elespanol.com/creacion/la-resistencia-a-los-antibioticos-matara-mas-que-el-cancer-en-2050_40821_102.html (2016).
40. Newman, D. J. & Cragg, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.* **79**, 629–661 (2016).

41. Fritz, I. Phylogenetic relationships of the genera *Stella*, *Labrys* and *Angulomicrobium* within the ‘Alphaproteobacteria’ and description of *Angulomicrobium amanitifforme* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**, 651–657 (2004).
42. Tortora, G. J., Funke, B. R. & Case, C. L. Anatomía funcional de las células procariontes y eucariontes. *Introd. a la Microbiol.* 76–99 (2007).
43. Anderson, R. J., Groundwater, P. W., Todd, A. & Worsley, A. J. *Antibacterial Agents*. (John Wiley & Sons, Ltd, 2012). doi:10.1002/9781118325421.
44. Kapoor, G., Saigal, S. & Elongavan, A. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *J. Anaesthesiol. Clin. Pharmacol.* **33**, 300 (2017).
45. Calvo, J. & Martínez-Martínez, L. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **27**, 44–52 (2009).
46. Sarkar, P., Yarlagadda, V., Ghosh, C. & Haldar, J. A review on cell wall synthesis inhibitors with an emphasis on glycopeptide antibiotics. *Medchemcomm* **8**, 516–533 (2017).
47. Knox, J. R. & Pratt, R. F. Different modes of vancomycin and D-alanyl-D-alanine peptidase binding to cell wall peptide and a possible role for the vancomycin resistance protein. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**, 1342–1347 (1990).
48. Vannuffel, P. & Cocito, C. Mechanism of action of streptogramins and macrolides. *Drugs* **51 Suppl 1**, 20–30 (1996).
49. Johnston, N. J., Mukhtar, T. A. & Wright, G. D. Streptogramin antibiotics: mode of action and resistance. *Curr. Drug Targets* **3**, 335–44 (2002).
50. Yoneyama, H. & Katsumata, R. Antibiotic resistance in bacteria and its future for novel antibiotic development. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **70**, 1060–75 (2006).
51. Alves, E. *et al.* Antimicrobial lipids from plants and marine organisms: An overview of the current state-of-the-art and future prospects. *Antibiotics* **9**, 1–88 (2020).
52. Dherbomez, M., Kihel, L. El & Letourneux, Y. Antibacterial activity of 7-aminocholesterol, a new sterol. *FEMS Microbiol. Lett.* **126**, 91–92 (1995).
53. Moore, K. S. *et al.* Squalamine: An aminosterol antibiotic from the shark. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 1354–1358 (1993).
54. Harvey, C. L., Knight, S. G. & Sih, C. J. On the Mode of Action of Fusidic Acid *. *Biochemistry* **5**, 3320–3327 (1966).
55. Baker, Z., Harrison, R. W. & Miller, B. F. Action of synthetic detergents on the metabolism

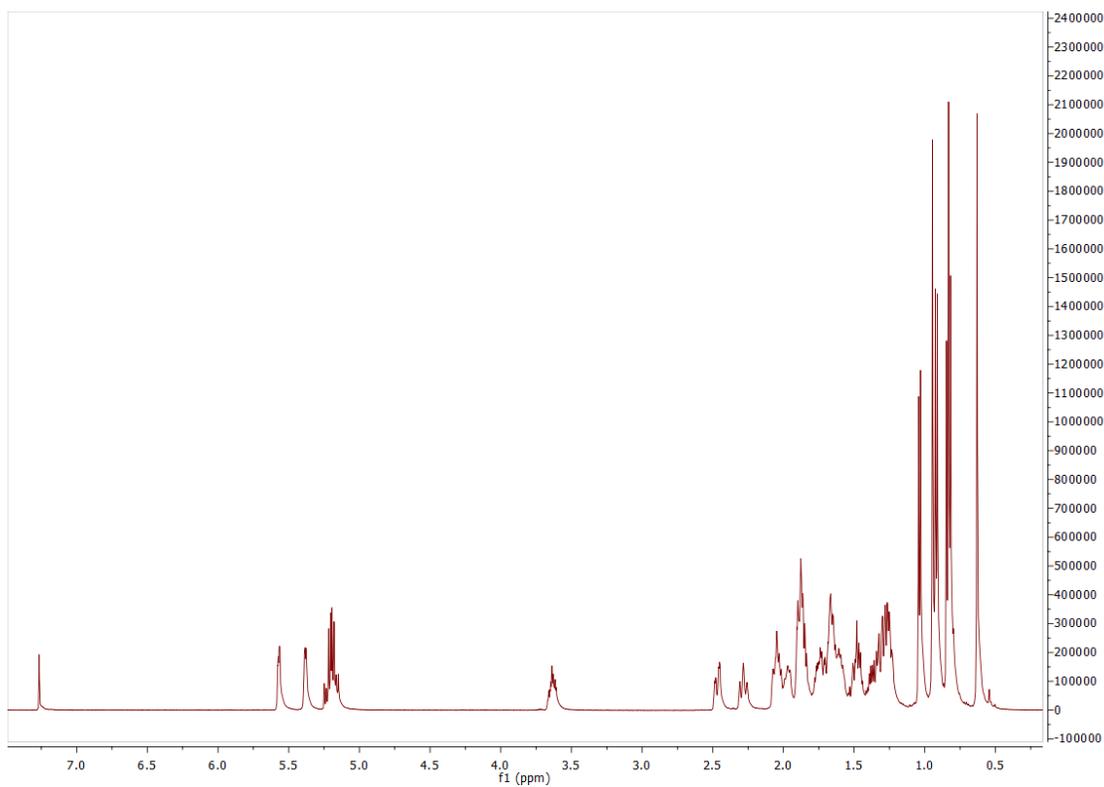
- of bacteria. *J. Exp. Med.* **73**, 249–271 (1941).
56. Alhanout, K. *et al.* New insights into the antibacterial mechanism of action of squalamine. *J. Antimicrob. Chemother.* **65**, 1688–1693 (2010).
 57. Epand, R. F., Pollard, J. E., Wright, J. O., Savage, P. B. & Epand, R. M. Depolarization, bacterial membrane composition, and the antimicrobial action of ceragenins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 3708–3713 (2010).
 58. Andrade, J. C. *et al.* Menadione (vitamin K) enhances the antibiotic activity of drugs by cell membrane permeabilization mechanism. *Saudi J. Biol. Sci.* **24**, 59–64 (2017).
 59. Andrade, J. C. *et al.* Cholecalciferol, ergosterol, and cholesterol enhance the antibiotic activity of drugs. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **88**, 244–250 (2018).
 60. Frézard, F., Schettini, D. A., Rocha, O. G. F. & Demicheli, C. Liposomes: Physicochemical and pharmacological properties, applications in antimony-based chemotherapy. *Quim. Nova* **28**, 511–518 (2005).
 61. Sohlenkamp, C. & Geiger, O. Bacterial membrane lipids: Diversity in structures and pathways. *FEMS Microbiol. Rev.* **40**, 133–159 (2015).
 62. Lang, M., Mühlbauer, A., Jägers, E. & Steglich, W. Studies on the Biosynthesis of Bovilactone-4,4 and Related Fungal Meroterpenoids. *European J. Org. Chem.* **2008**, 3544–3551 (2008).
 63. Mühlbauer, A., Beyer, J. & Steglich, W. The biosynthesis of the fungal meroterpenoids boviquinone-3 and -4 follows two different pathways. *Tetrahedron Lett.* **39**, 5167–5170 (1998).
 64. Yun, B. S., Kang, H. C., Koshino, H., Yu, S. H. & Yoo, I. D. Suillusin, a unique benzofuran from the mushroom *Suillus granulatus*. *J. Nat. Prod.* **64**, 1230–1231 (2001).
 65. Qin, X. & Liu, J. CHEMICAL CONSTITUENTS OF BASIDIOMYCETES *Cortinarius longipes*. *Chem. Nat. Compd.* **48**, 807–808 (2012).
 66. Kim, D. S. *et al.* Anticomplementary activity of ergosterol peroxide from *Naematoloma fasciculare* and reassignment of NMR data. *Arch. Pharm. Res.* **20**, 201–205 (1997).
 67. Jinming, G., Lin, H. & Jikai, L. A novel sterol from Chinese truffles *Tuber indicum*. *Steroids* **66**, 771–775 (2001).
 68. Nieto, I. J. & Carolina Chegwin, A. Triterpenoids and fatty acids identified in the edible mushroom *Pleurotus sajor-cajú*. *J. Chil. Chem. Soc.* **53**, 1515–1517 (2008).

69. Pomin, V. H. Unravelling Glycobiology by NMR Spectroscopy. *Intech* 63–98 (2012).
70. Stein, S. *Mass Spectra by NIST Mass Spec Data Center*. (2005).
71. Eisenbraun, E. J. cyclooctanona. *Org. Synth.* **45**, 28 (1965).
72. Moffatt, J. G. Cholane-24-Al. *Org. Synth.* **47**, 25 (1967).
73. Corey, E. J. & Schmidt, G. Useful procedures for the oxidation of alcohols involving pyridinium dichromate in aprotic media. *Tetrahedron Lett.* **20**, 399–402 (1979).
74. Collins, J. C. & Hess, W. W. Aldehydes From Primary Alcohols By Oxidation With Chromium Trioxide: Heptanal. *Org. Synth.* **52**, 5 (1972).
75. Tojo, G. & Fernández, M. *Oxidation of Alcohols to Aldehydes and Ketones*. Springer (2006).
76. Parish, E. J., Luo, C., Parish, S. & Heidepriem, R. W. Selective Oxidation of Steroidal Homoallylic Alcohols Using Pyridinium Chlorochromate (PCC). *Synth. Commun.* **22**, 2839–2847 (1992).
77. Popova, E. V., Anisimova, O. S., Arsent'ev, A. G. & Grinenko, G. S. Oxidation of the side chains of ergosterol derivatives. *Chem. Nat. Compd.* **14**, 70–72 (1978).
78. Zhao, Y.-Y. *et al.* Ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one isolated from Polyporus umbellatus prevents early renal injury in aristolochic acid-induced nephropathy rats. *J. Pharm. Pharmacol.* **63**, 1581–6 (2011).
79. Russo, A. *et al.* Pro-apoptotic activity of ergosterol peroxide and (22E)-ergosta-7,22-dien-5 α -hydroxy-3,6-dione in human prostate cancer cells. *Chem. Biol. Interact.* **184**, 352–358 (2010).
80. Lee, I.-S. *et al.* Inhibition of human neutrophil elastase by ergosterol derivatives from the mycelium of *Phellinus linteus*. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **65**, 437–440 (2012).
81. Li, A. H. *et al.* One-pot friedlander quinoline synthesis: Scope and limitations. *Synthesis (Stuttg)*. 1678–1686 (2010) doi:10.1055/s-0029-1218701.
82. Chandrappa, S., Vinaya, K., Ramakrishnappa, T. & Rangappa, K. S. An efficient method for aryl nitro reduction and cleavage of azo compounds using iron powder/calcium chloride. *Synlett* **14**, 3019–3022 (2010).
83. Bellamy, F. D. & Ou, K. Selective reduction of aromatic nitro compounds with stannous chloride in non acidic and non aqueous medium. *Tetrahedron Lett.* **25**, 839–842 (1984).
84. Tsukinoki, T. & Tsuzuki, H. Organic reaction in water. Part 5.1 Novel synthesis of anilines by zinc metal-mediated chemoselective reduction of nitroarenes. *Green Chem.* **3**, 37–38

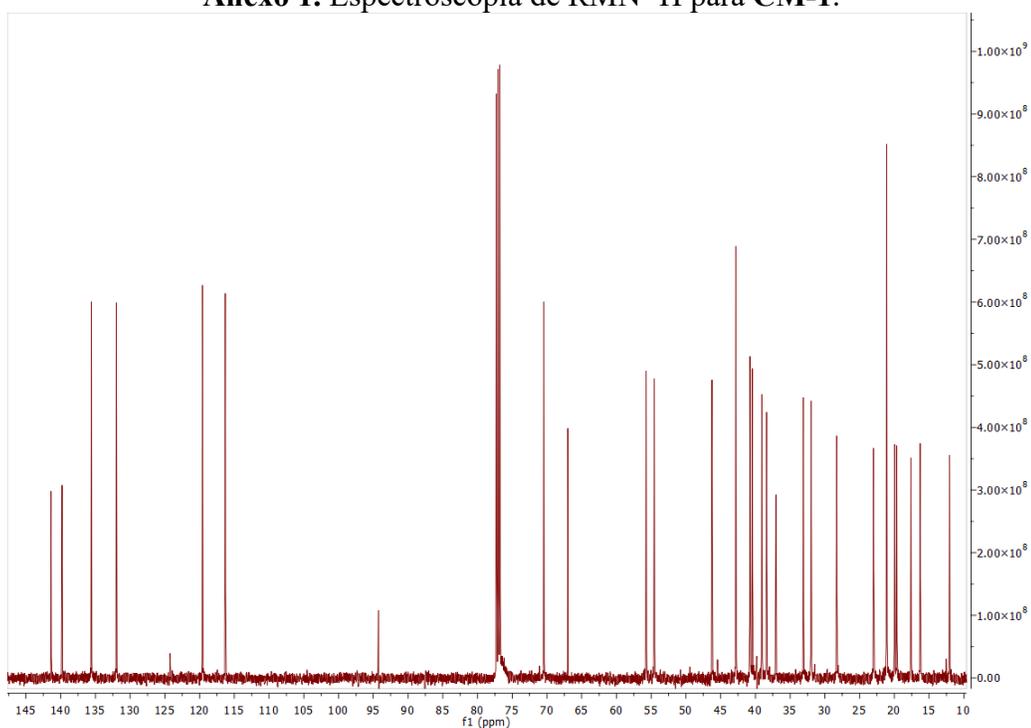
- (2001).
85. Alcolea Palafox, M., Rastogi, V. K. & Vats, J. K. 4-Aminobenzonitrile: ab initio calculations, FTIR and Raman spectra. *J. Raman Spectrosc.* **37**, 85–99 (2006).
 86. Ramasamy, R. Ftir & Ft-Raman Spectral Investigation of p-toluidine. *Int. J. Sci. Eng. Appl. Sci.* **2**, 519–528 (2016).
 87. Bardakçı, B., Kaya, N. & Kalaycı, T. Anisidine adsorption on Co-supported pumice. *Environ. Earth Sci.* **70**, 849–856 (2013).
 88. Begtrup, M. & Rasmussen, L. K. Product Class 34: Arylhydrazines. *Sci. Synth. Houben–Weyl Methods Mol. Transform.* 1773–1826 (2016) doi:10.1055/sos-sd-031-01959.
 89. Bentley, D. J. *et al.* Synthesis of the 2,3,4-trisubstituted indole fragments of nosiheptide and glycothiohexide. *Org. Biomol. Chem.* **2**, 701–708 (2004).
 90. Onajole, O. K. *et al.* Preliminary Structure–Activity Relationships and Biological Evaluation of Novel Antitubercular Indolecarboxamide Derivatives Against Drug-Susceptible and Drug-Resistant Mycobacterium tuberculosis Strains. *J. Med. Chem.* **56**, 4093–4103 (2013).
 91. Stahl, E. *Thin-Layer Chromatography*. vol. 53 (1969).
 92. Robinson, B. The Fischer Indole Synthesis. *Chem. Rev.* **63**, 373–401 (1963).
 93. Inman, M. & Moody, C. J. Indole synthesis – something old, something new. *Chem. Sci.* 29–41 (2013) doi:10.1039/c2sc21185h.
 94. d’Ischia, M., Napolitano, A. & Pezzella, A. Pyrroles and their Benzo Derivatives: Structure. in *Comprehensive Heterocyclic Chemistry III* vols 4–7 1–43 (Elsevier, 2008).
 95. Verbist, L. The antimicrobial activity of fusidic acid. *J. Antimicrob. Chemother.* **25**, 1–5 (1990).
 96. Kamiński, D. M. Recent progress in the study of the interactions of amphotericin B with cholesterol and ergosterol in lipid environments. *Eur. Biophys. J.* **43**, 453–467 (2014).
 97. Venegas, B., González-Damián, J., Celis, H. & Ortega-Blake, I. Amphotericin B channels in the bacterial membrane: Role of sterol and temperature. *Biophys. J.* **85**, 2323–2332 (2003).
 98. Kinoshita, H., Yoshioka, M., Ihara, F. & Nihira, T. Cryptic antifungal compounds active by synergism with polyene antibiotics. *J. Biosci. Bioeng.* **121**, 394–398 (2016).
 99. Xu, Y. *et al.* Requirement for ergosterol in berberine tolerance underlies synergism of

- fluconazole and berberine against fluconazole-resistant *Candida albicans* isolates. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **7**, 1–9 (2017).
100. Azevedo, M. M. *et al.* The effect of antibacterial and non-antibacterial compounds alone or associated with antifungals upon fungi. *Front. Microbiol.* **6**, 1–7 (2015).
 101. Boes, A. *et al.* Squalamine and aminosterol mimics inhibit the peptidoglycan glycosyltransferase activity of *pbp1b*. *Antibiotics* **9**, 1–11 (2020).
 102. Di Pasquale, E. *et al.* Biophysical studies of the interaction of squalamine and other cationic amphiphilic molecules with bacterial and eukaryotic membranes: importance of the distribution coefficient in membrane selectivity. *Chem. Phys. Lipids* **163**, 131–140 (2010).
 103. Geethalakshmi, R. & Sarada, V. L. D. In vitro and in silico antimicrobial activity of sterol and flavonoid isolated from *Trianthema decandra* L. *Microb. Pathog.* **121**, 77–86 (2018).
 104. Ohvo-Rekilä, H., Ramstedt, B., Leppimäki, P. & Peter Slotte, J. Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. *Prog. Lipid Res.* **41**, 66–97 (2002).
 105. Fantini, J. & Barrantes, F. J. How cholesterol interacts with membrane proteins: An exploration of cholesterol-binding sites including CRAC, CARC, and tilted domains. *Front. Physiol.* **4 FEB**, 1–9 (2013).
 106. Ermilova, I. & Lyubartsev, A. P. Cholesterol in phospholipid bilayers: positions and orientations inside membranes with different unsaturation degrees. *Soft Matter* **15**, 78–93 (2019).
 107. Alavizargar, A., Keller, F. & Heuer, A. Effect of cholesterol vs. ergosterol on DPPC bilayer properties: insights from atomistic simulations. *arXiv* 1–32 (2020).
 108. Tintino, S. R. *et al.* Cholesterol and ergosterol affect the activity of *Staphylococcus aureus* antibiotic efflux pumps. *Microb. Pathog.* **104**, 133–136 (2017).

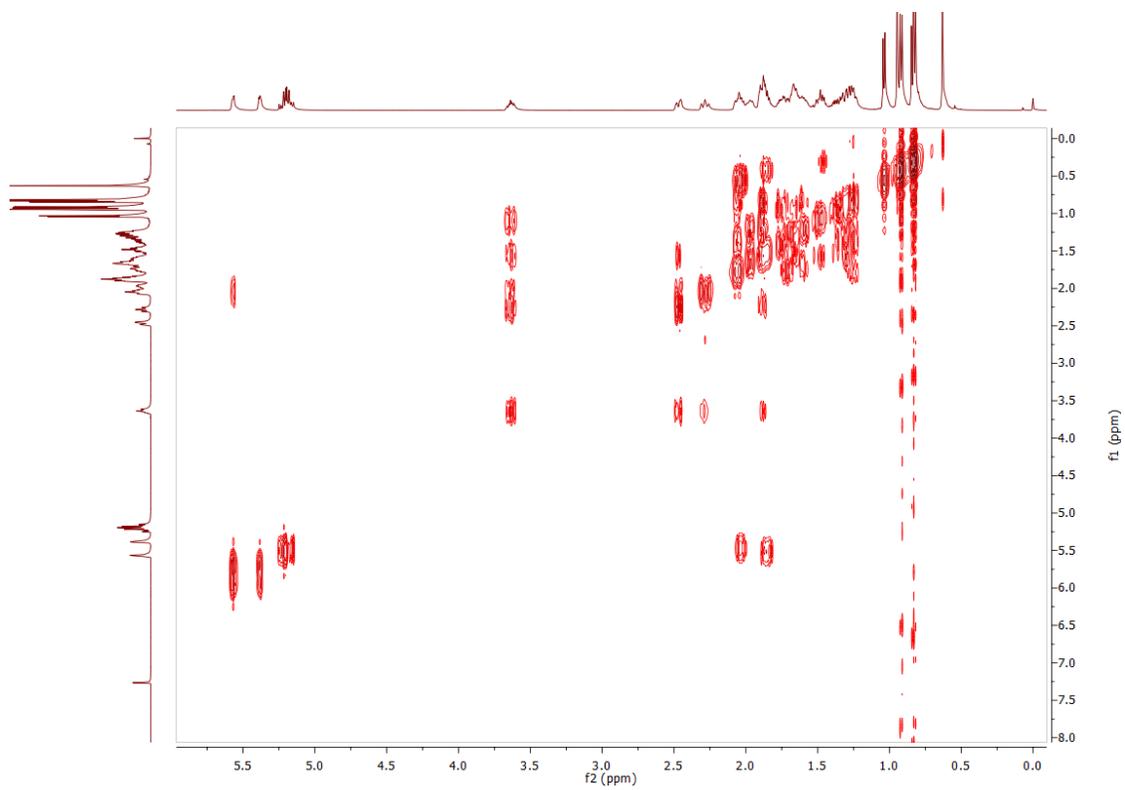
ANEXOS



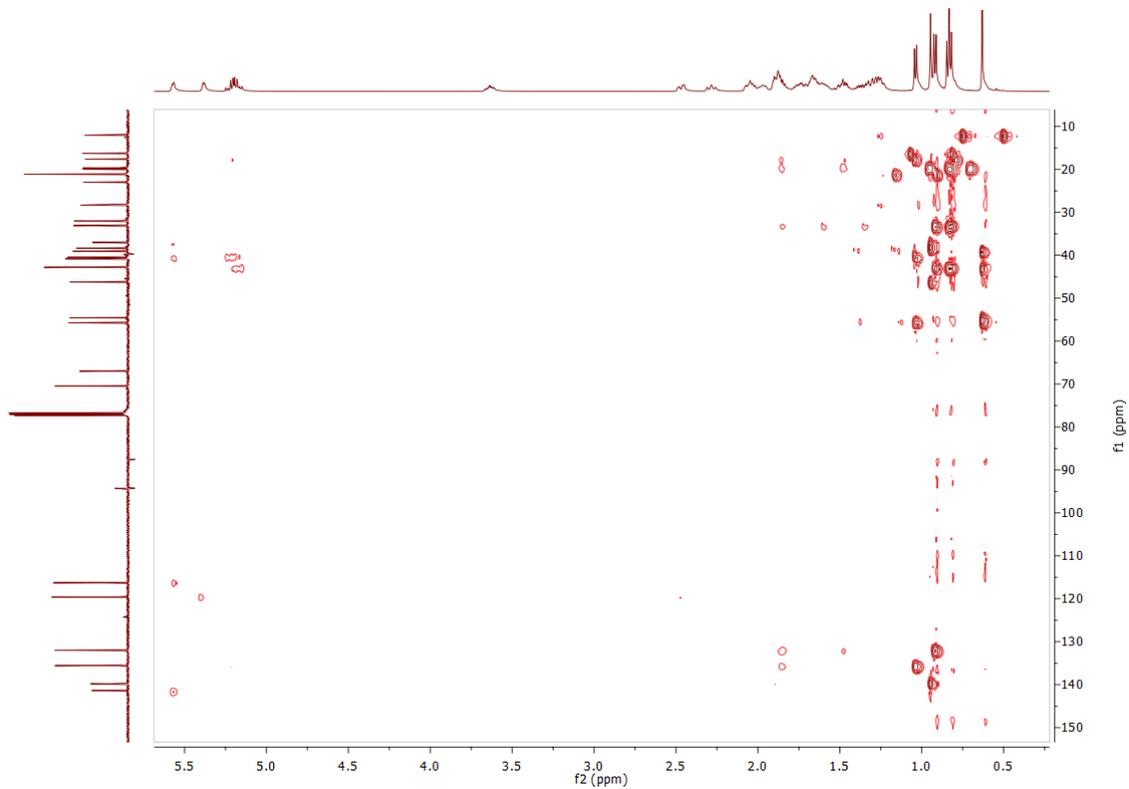
Anexo 1. Espectroscopía de RMN ^1H para CM-1.



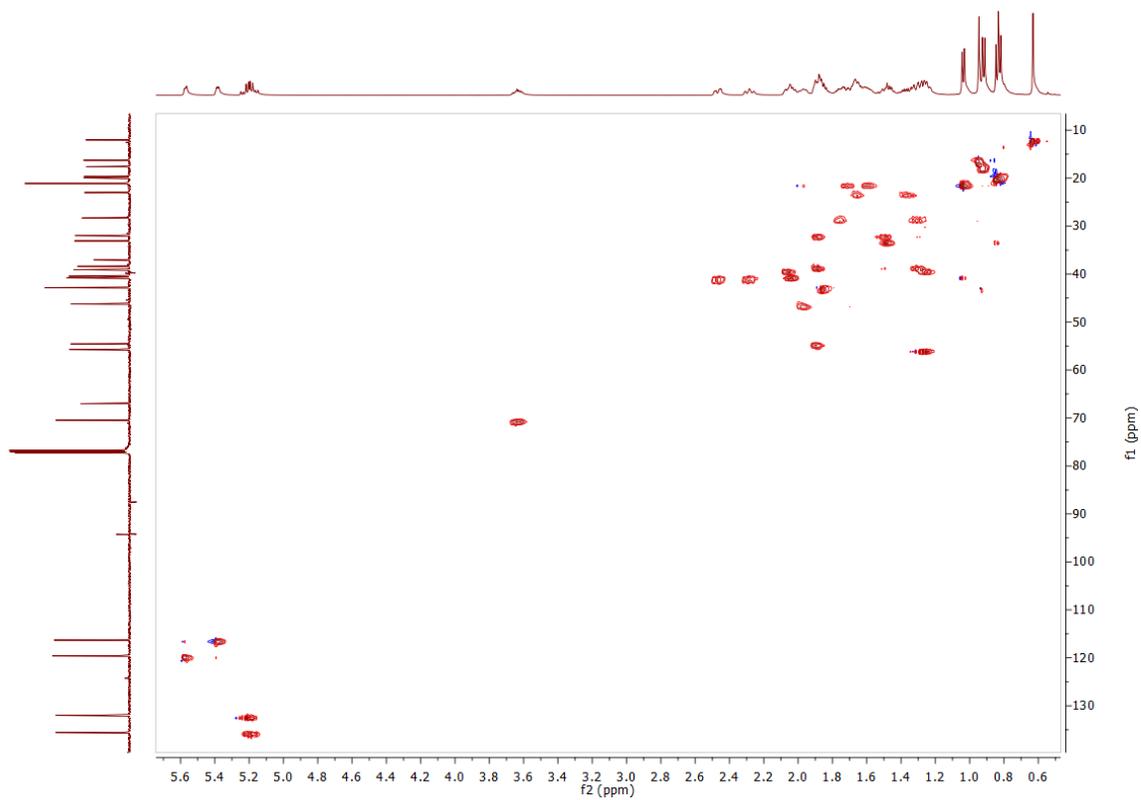
Anexo 2. Espectroscopía de RMN ^{13}C para CM-1.



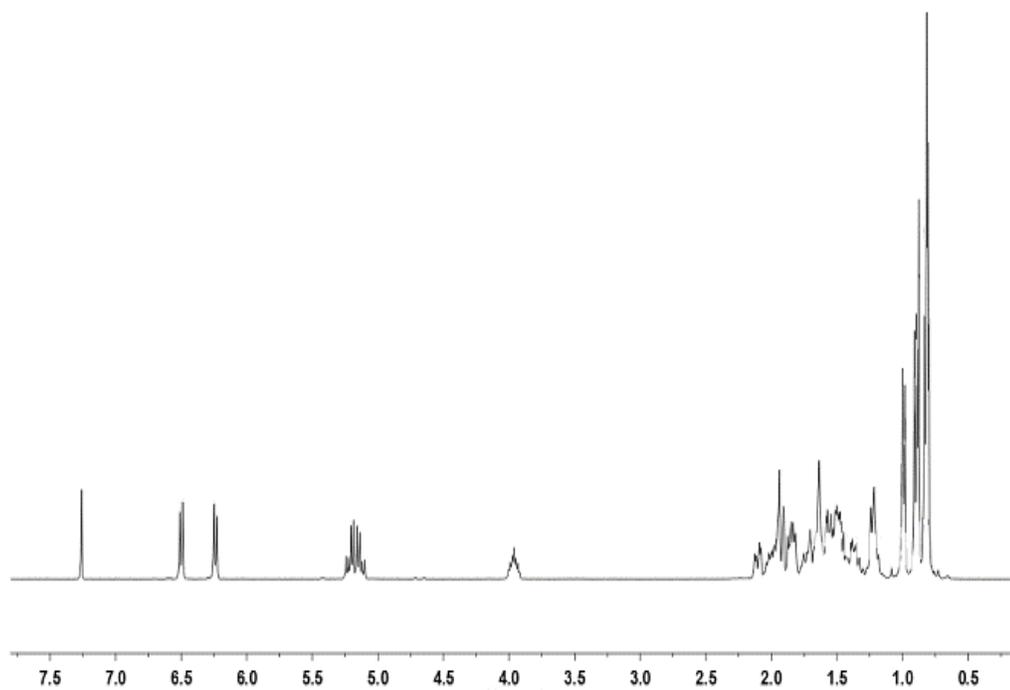
Anexo 3. H-H COSY para CM-1.



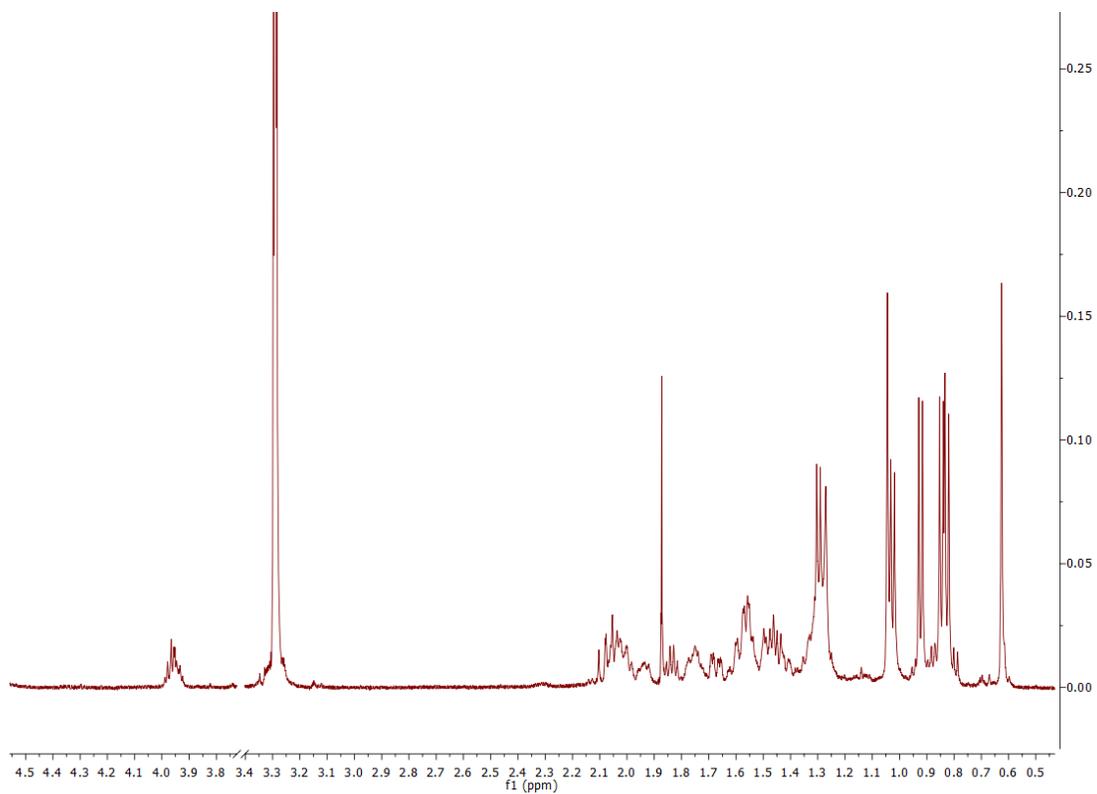
Anexo 4. H-C HMBC para CM-1.



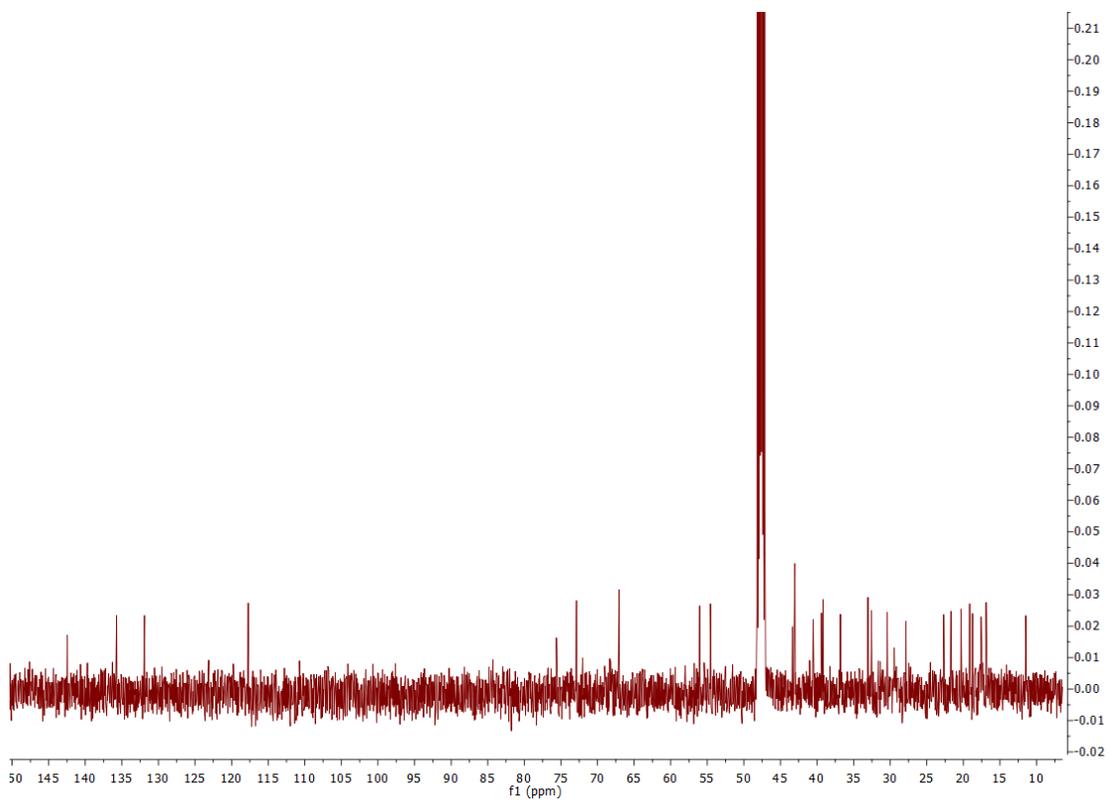
Anexo 5. H-C HSQC para **CM-1**.



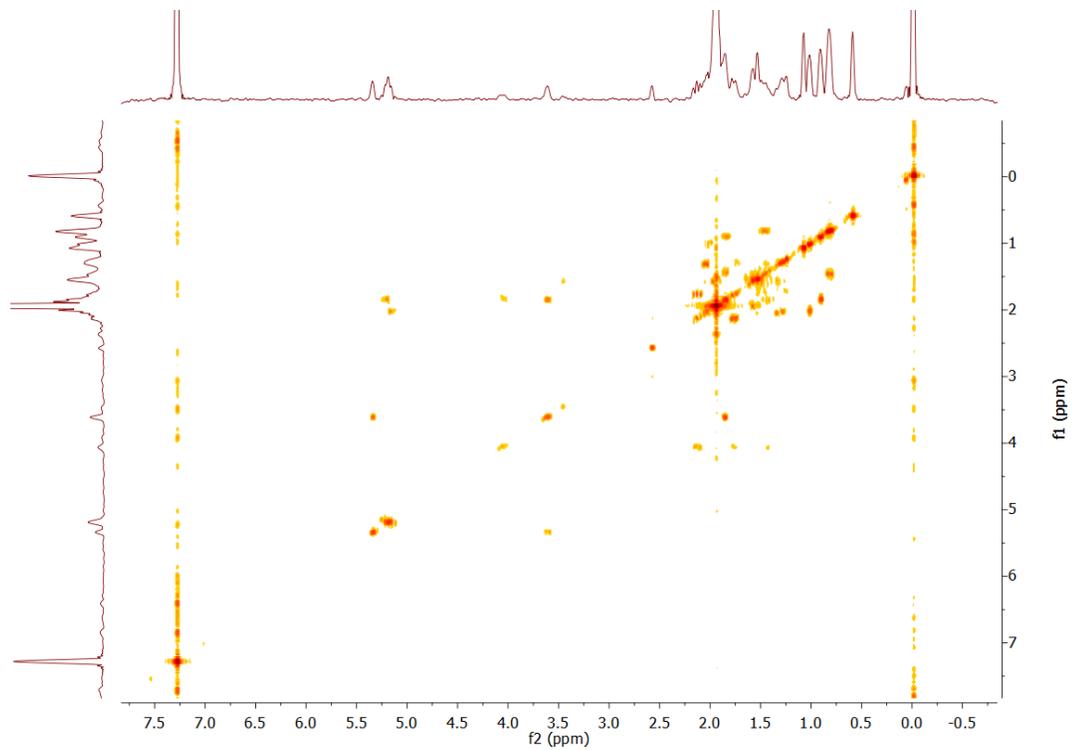
Anexo 6. Espectroscopía de RMN ^1H para **CM-2**.



Anexo 7. Espectroscopía de RMN ^1H para CM-3.

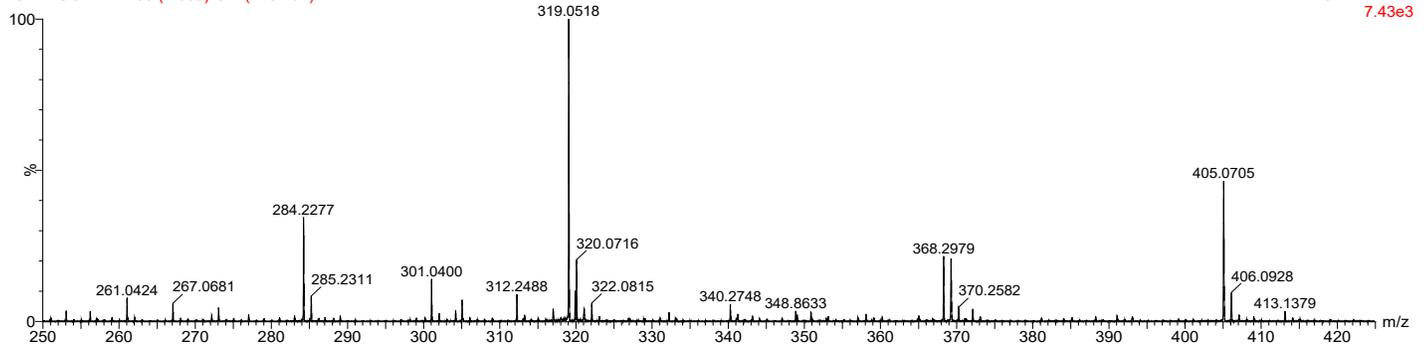


Anexo 8. Espectroscopía de RMN ^{13}C para CM-3.



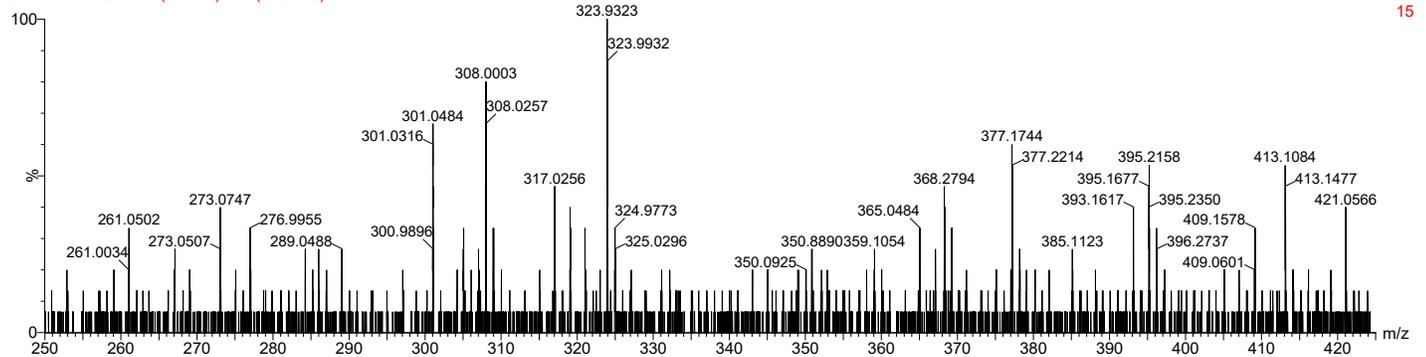
Anexo 9. H-H COSY para CM-3.

LUIS-AUCM-EP 253 (4.680) Cm (248:264)



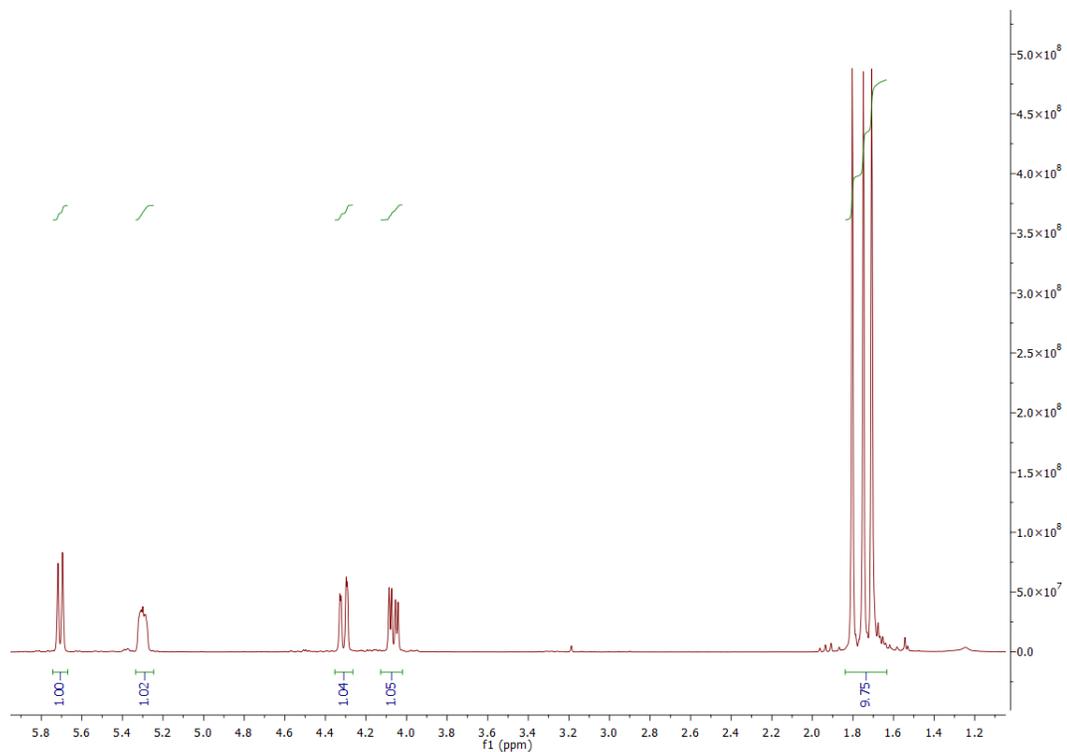
TOF MS ES+
7.43e3

LUIS-AUCM-EP 717 (13.263) Cm (602:718)

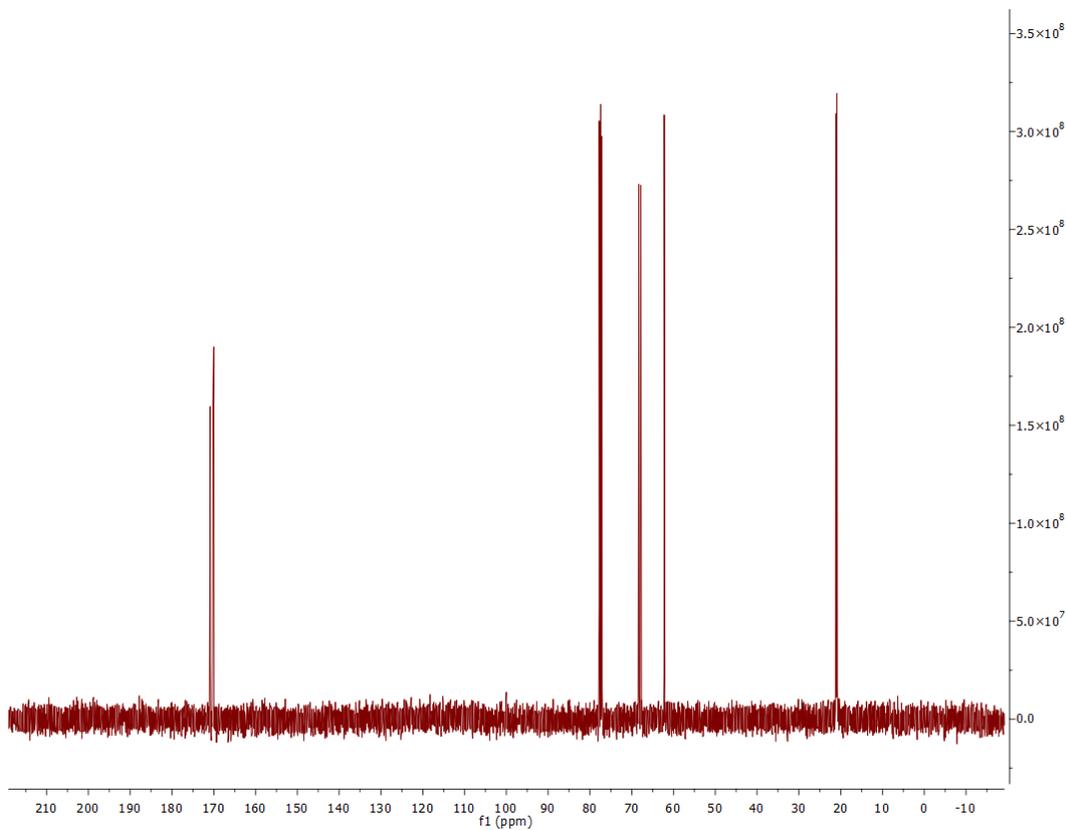


TOF MS ES+
15

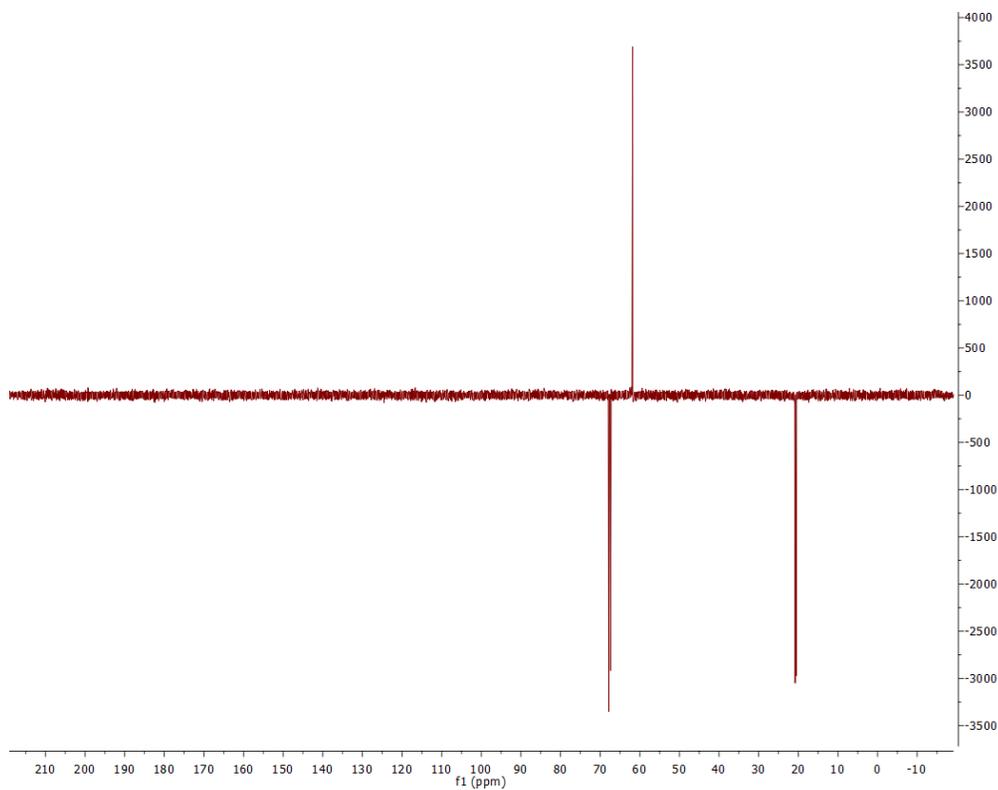
Anexo 10. TOF-MS para CM-3.



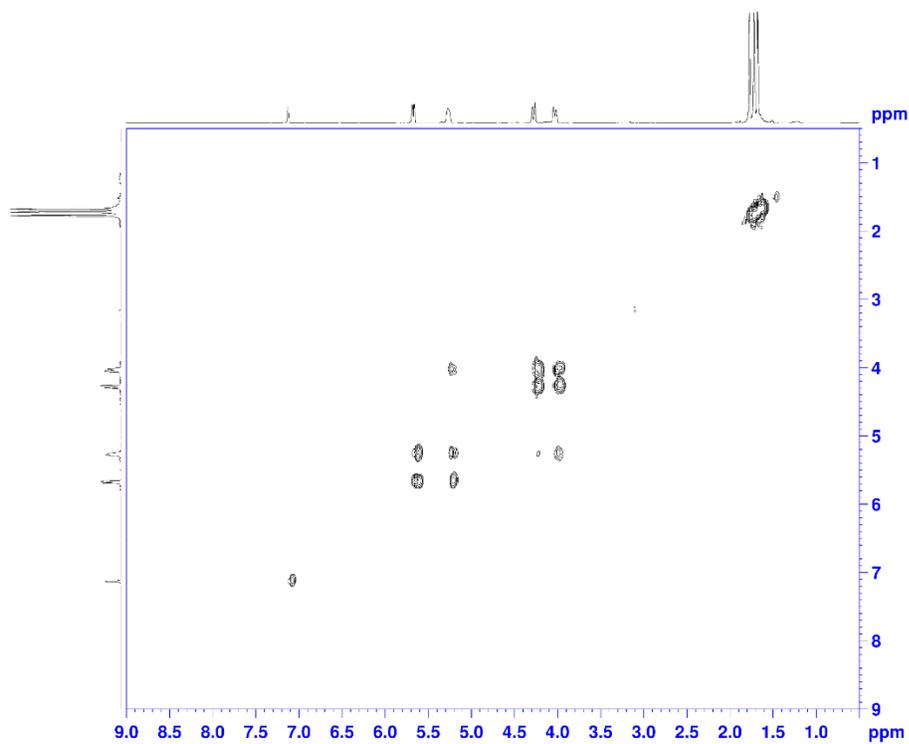
Anexo 11. Espectroscopía de RMN ¹H para CM-4.



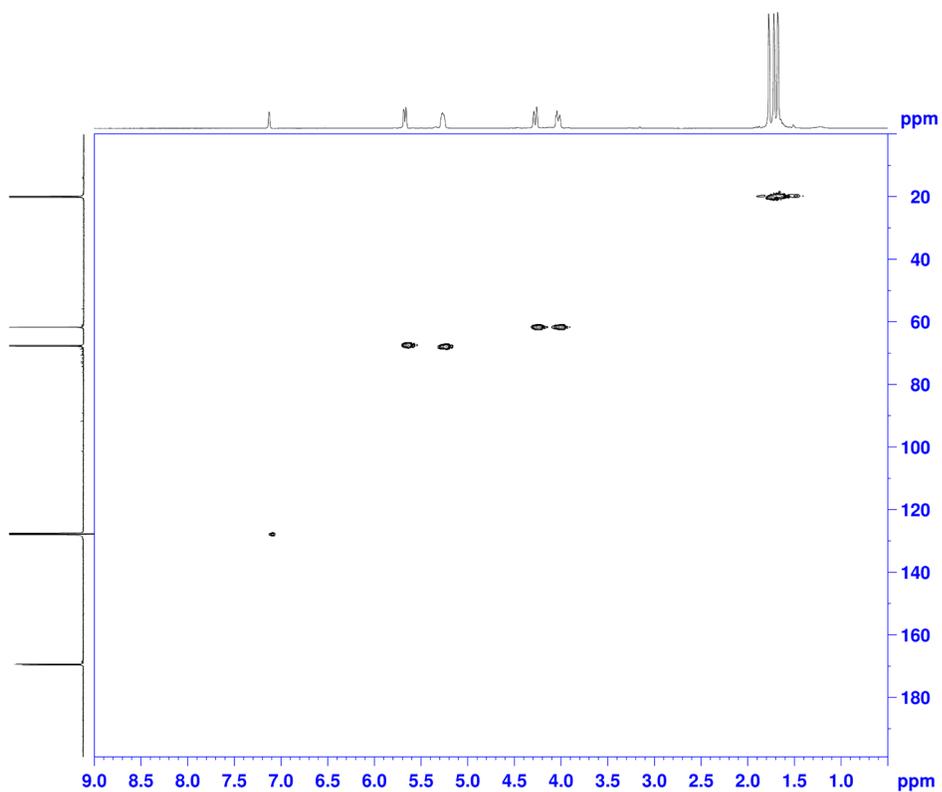
Anexo 12. Espectroscopía de RMN ¹³C para CM-4.



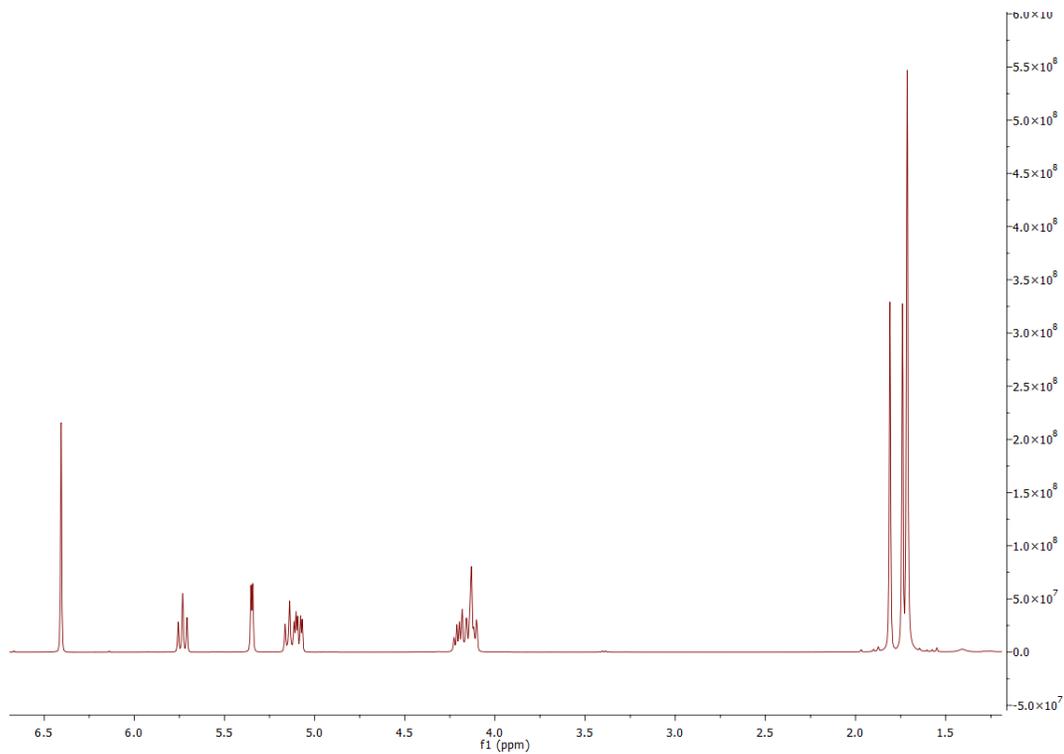
Anexo 13. Espectroscopía de RMN ^{13}C Dept 135 para CM-4.



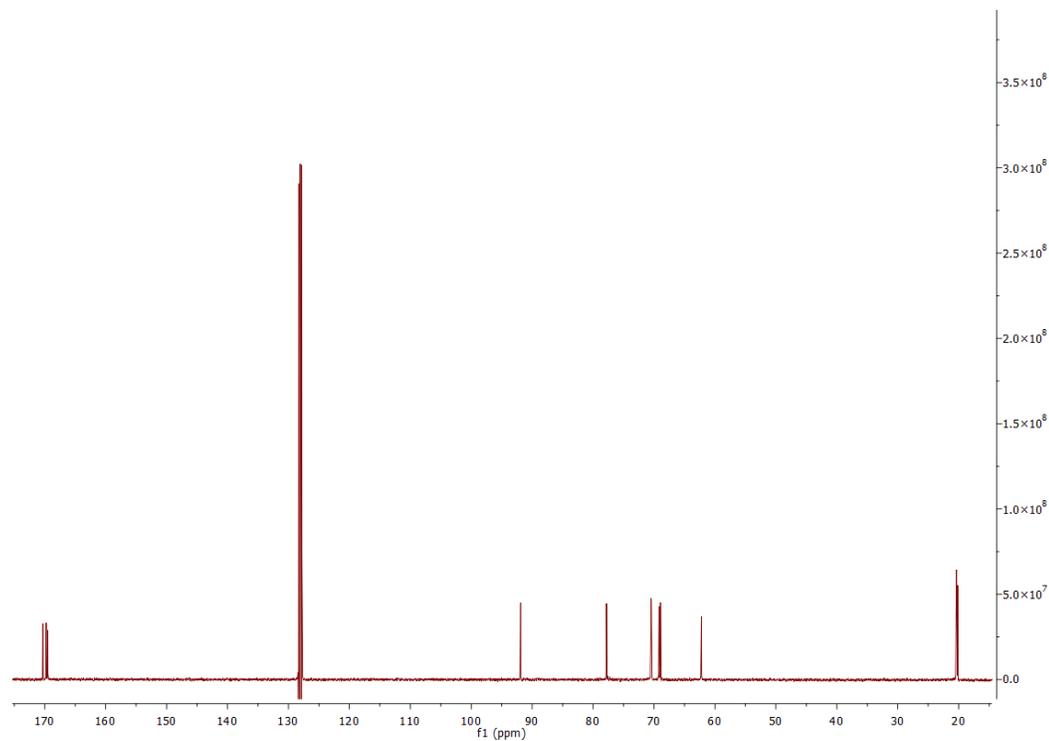
Anexo 14. H-H COSY para CM-4.



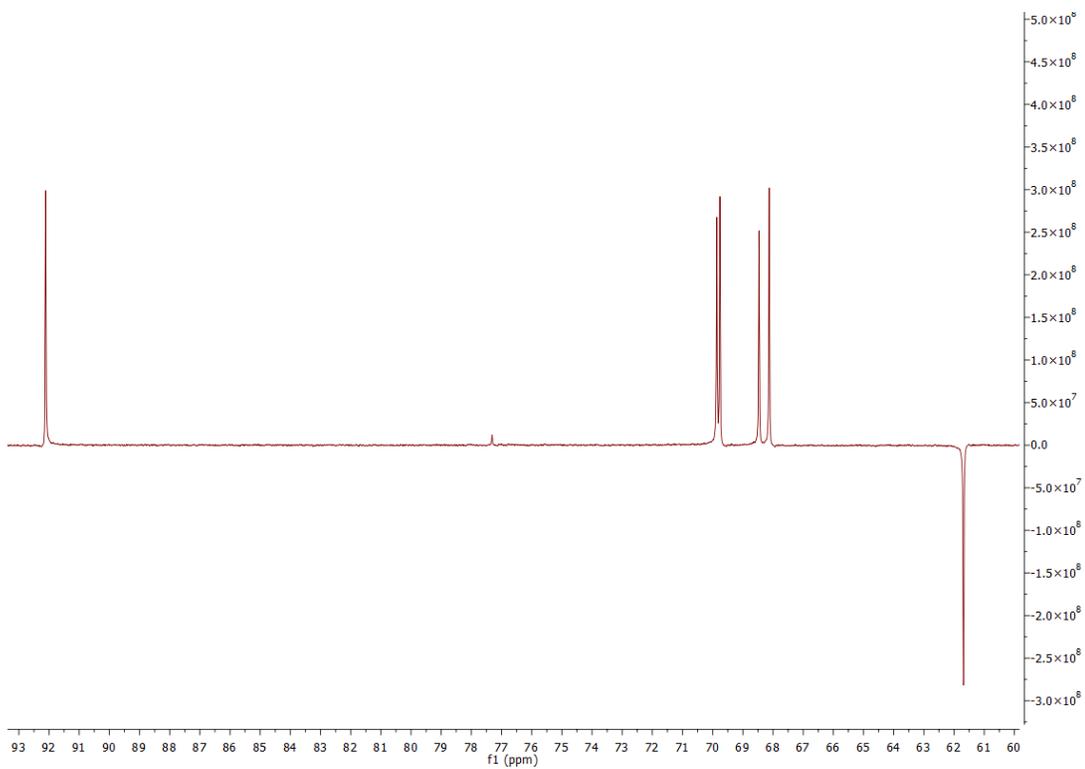
Anexo 15. H-C HSQC para CM-4.



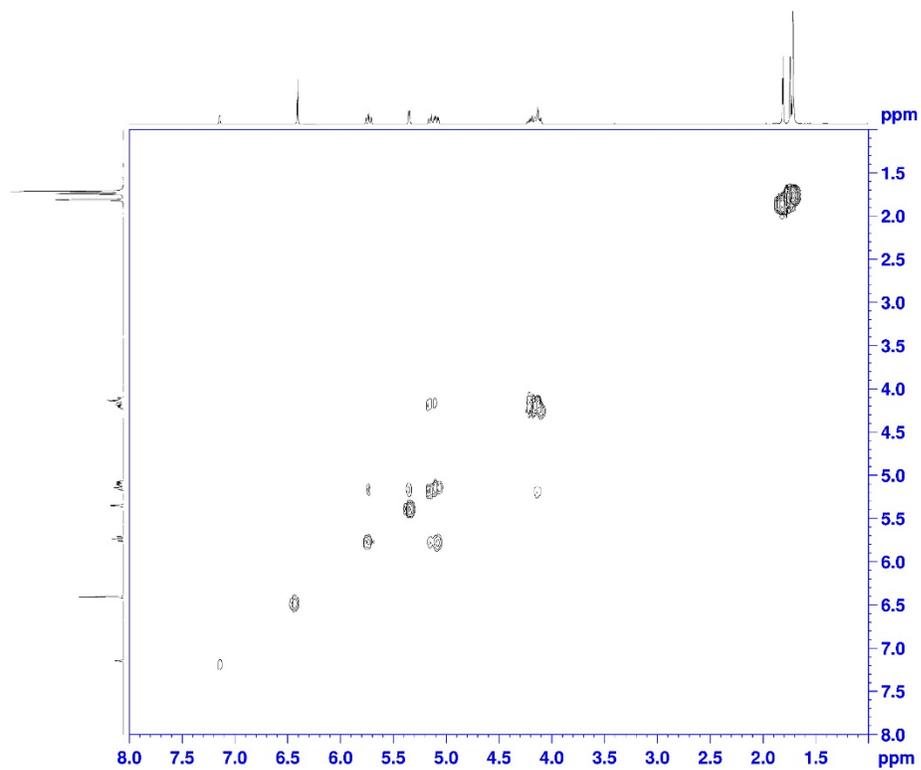
Anexo 16. Espectroscopía de RMN ¹H para CM-5.



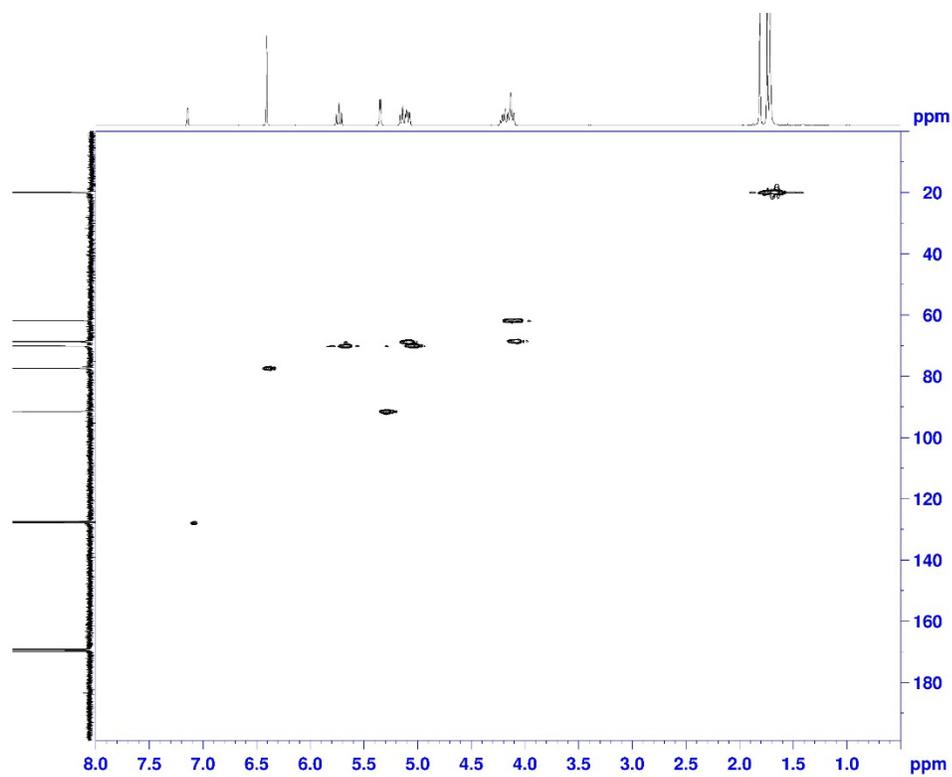
Anexo 17. Espectroscopía de RMN ^{13}C para CM-5.



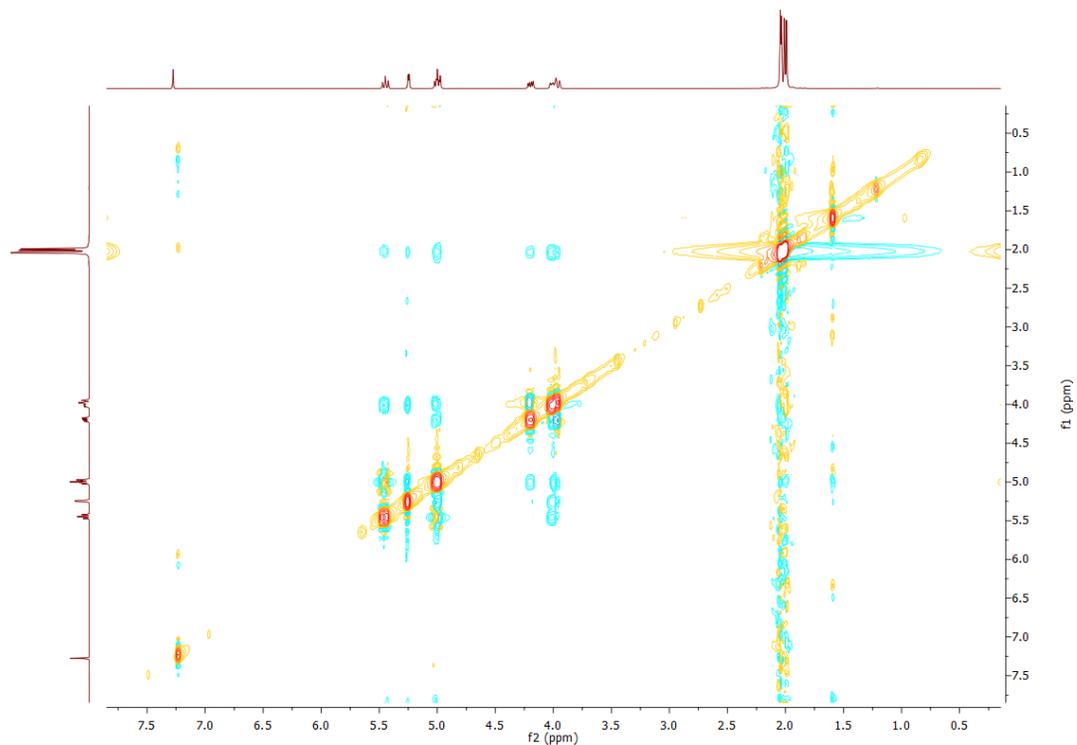
Anexo 18. Espectroscopía de RMN ^{13}C Dept 135° para CM-5.



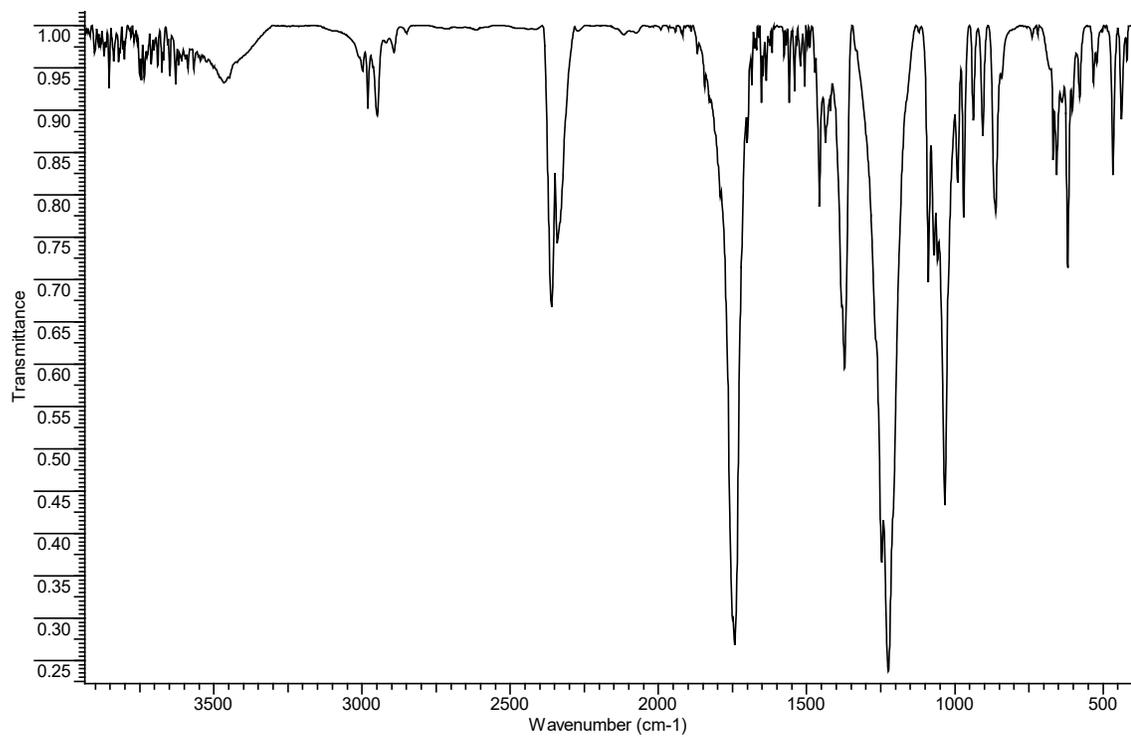
Anexo 19. H-H COSY para CM-5.



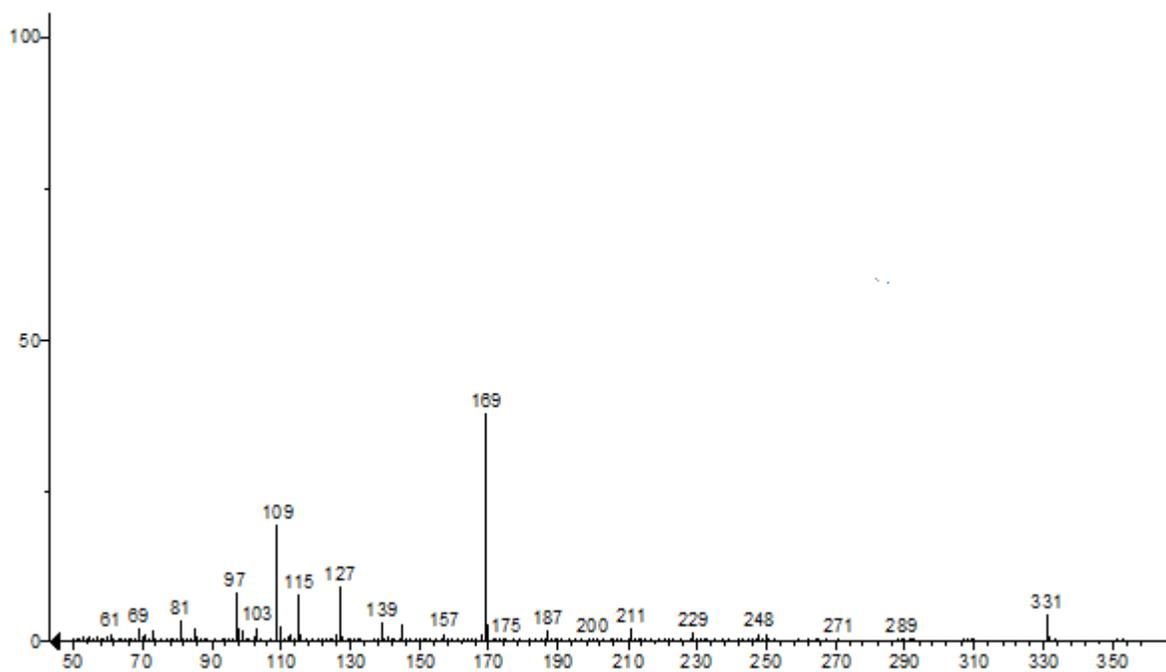
Anexo 20. H-H HSQC para CM-5.



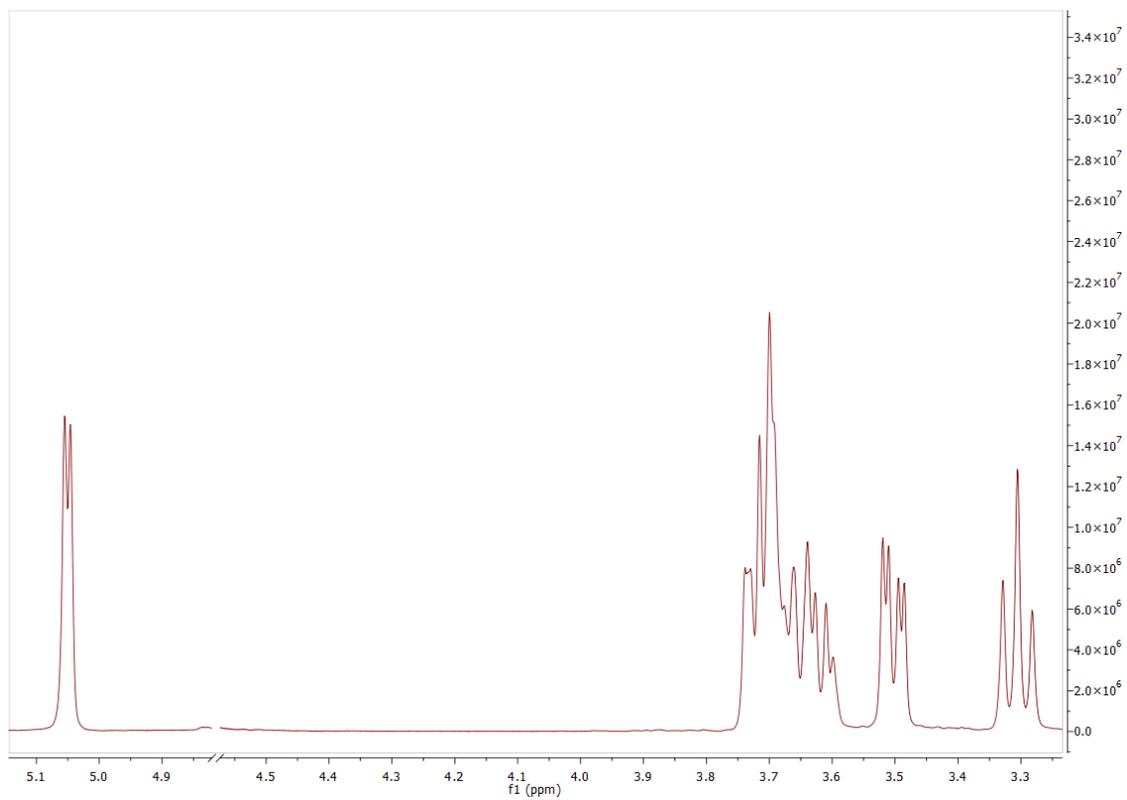
Anexo 21. Espectroscopía NOESY para CM-5.



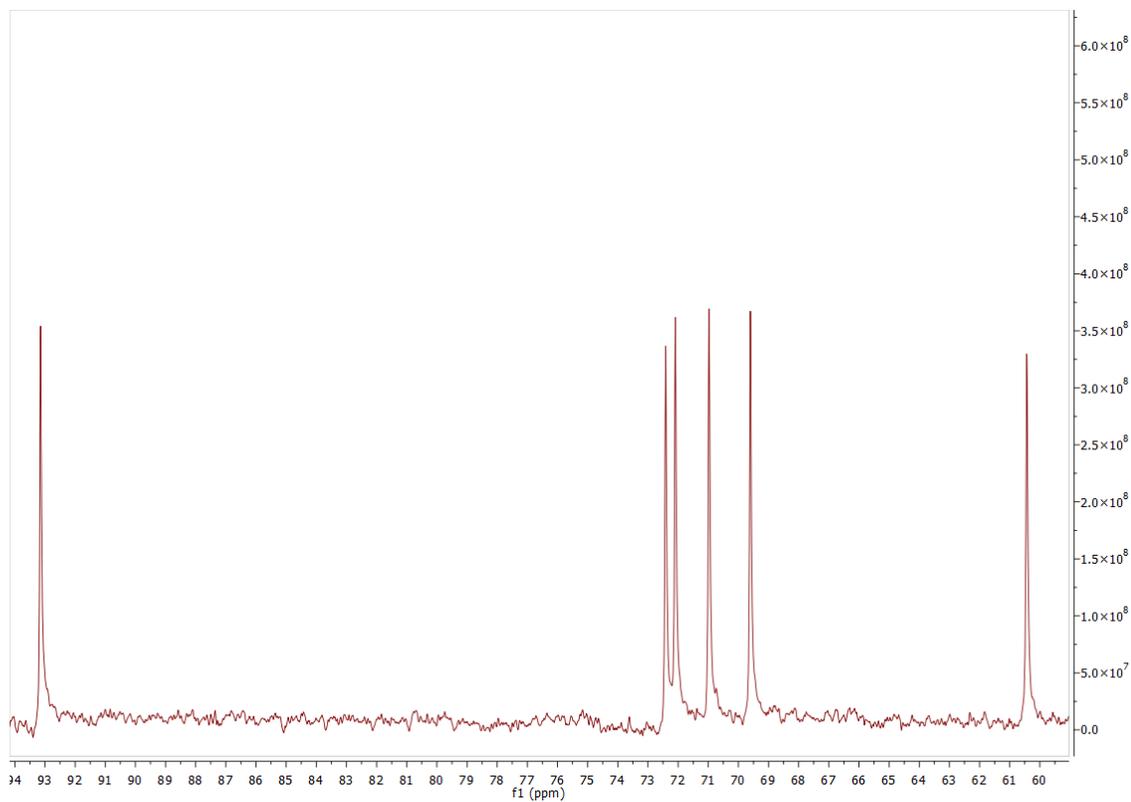
Anexo 22. Espectroscopía FT-IR para CM-5.



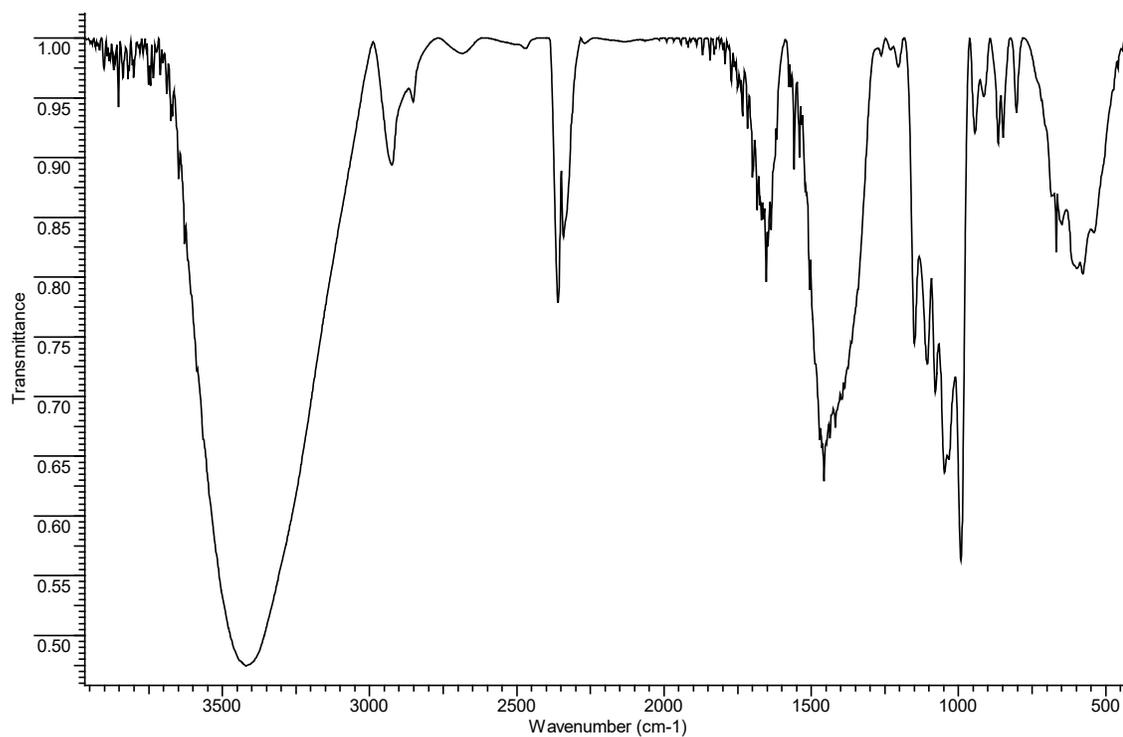
Anexo 23. IE-EM para CM-5.



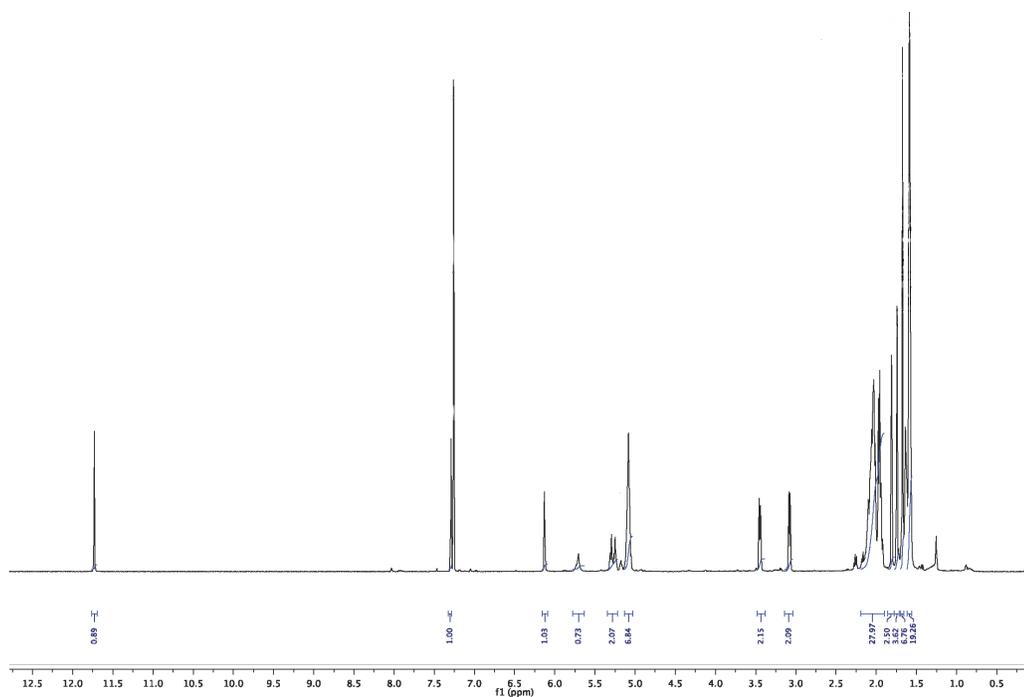
Anexo 24. RMN ^1H para CM-6.



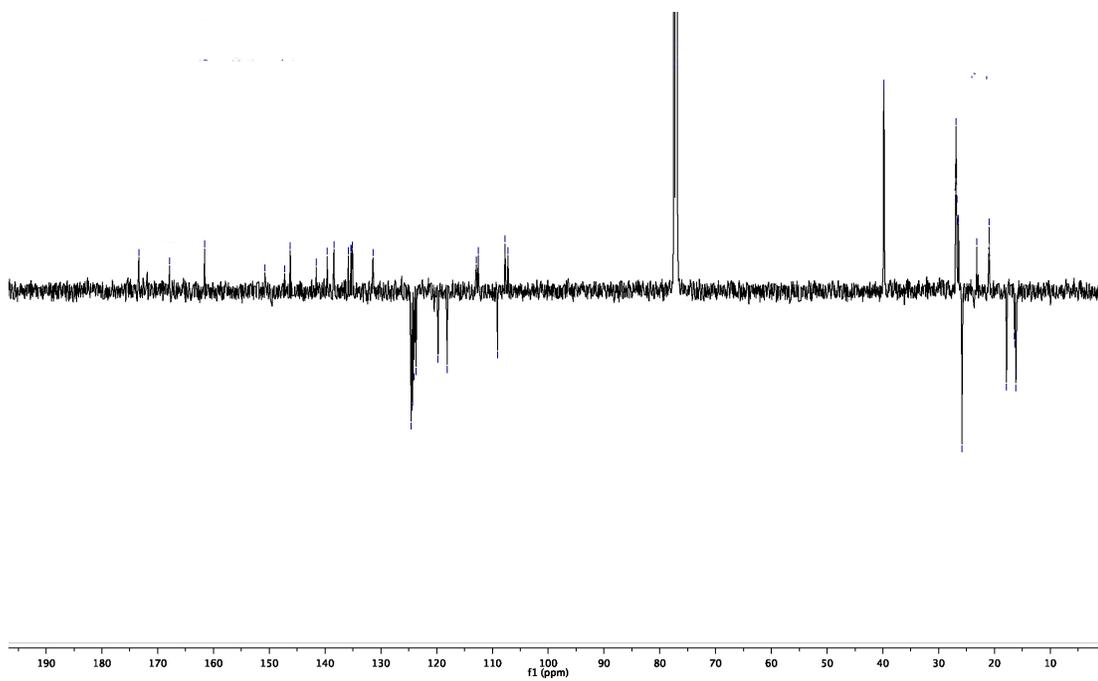
Anexo 25. Espectroscopía de RMN ^{13}C para CM-6.



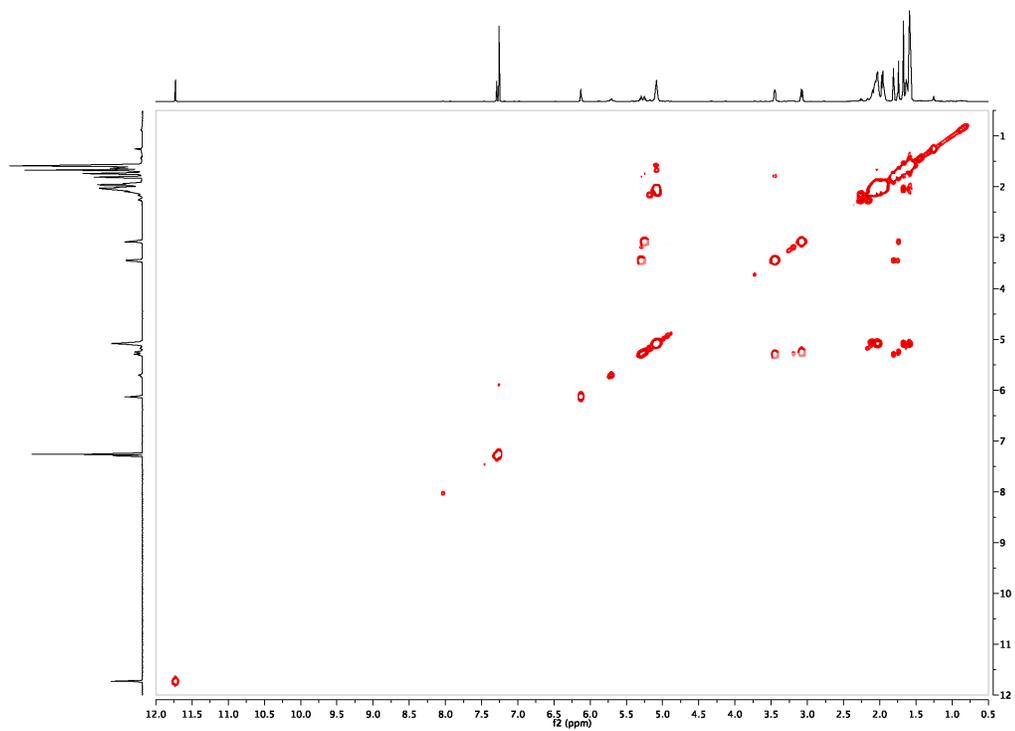
Anexo 26. Espectroscopía FT-IR para CM-6.



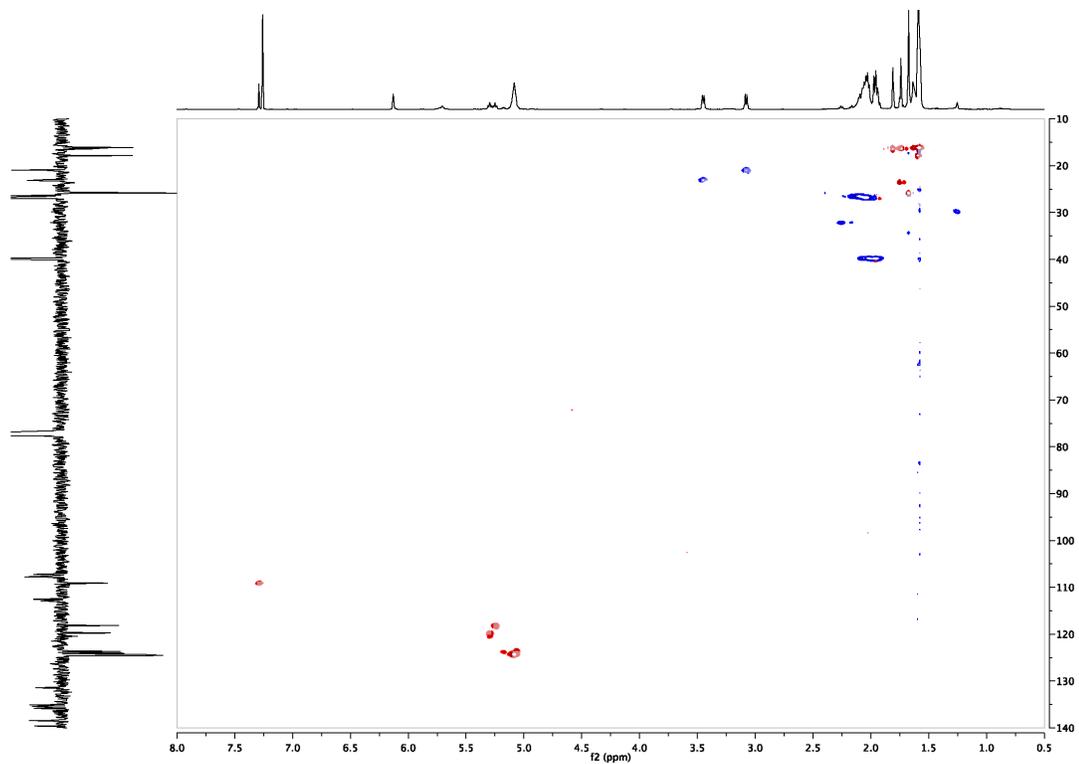
Anexo 27. Espectroscopía de RMN ^1H para SG-1.



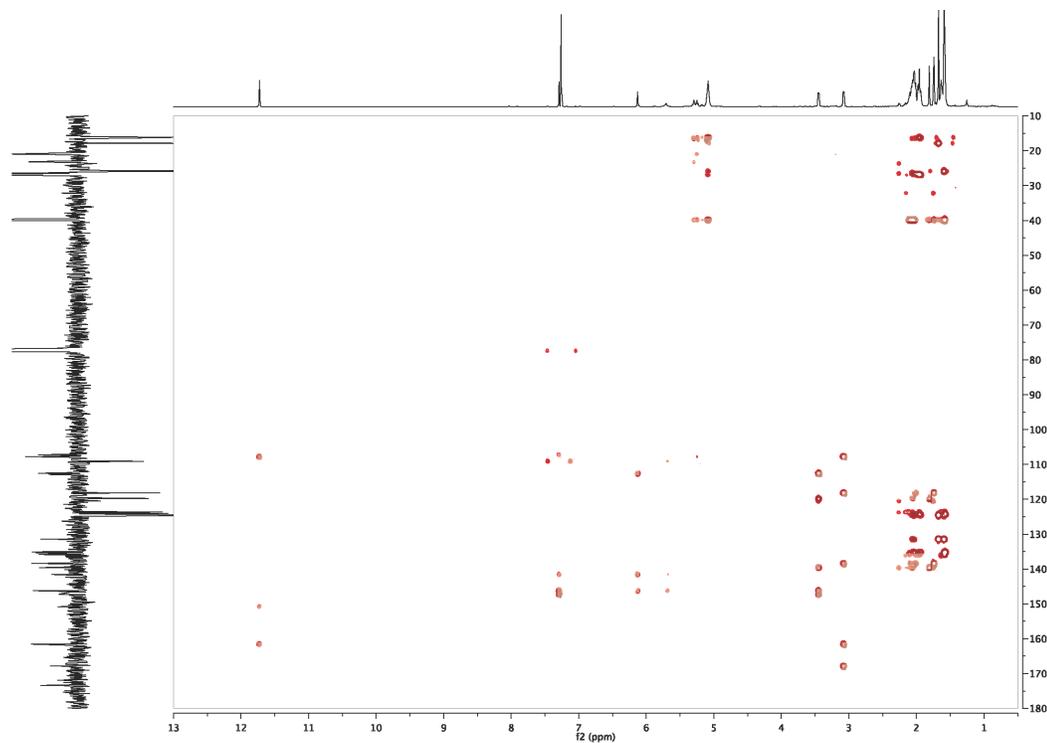
Anexo 28. Espectroscopía de RMN ^{13}C Dept 135° para SG-1



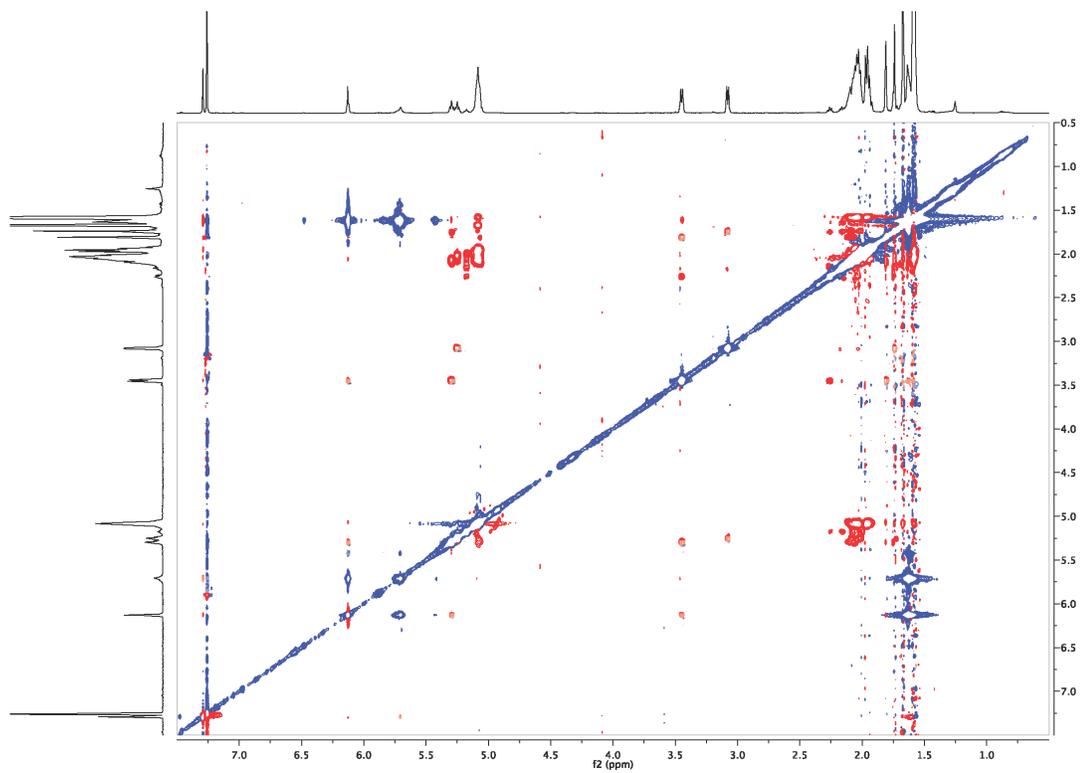
Anexo 29. H-H COSY para SG-1.



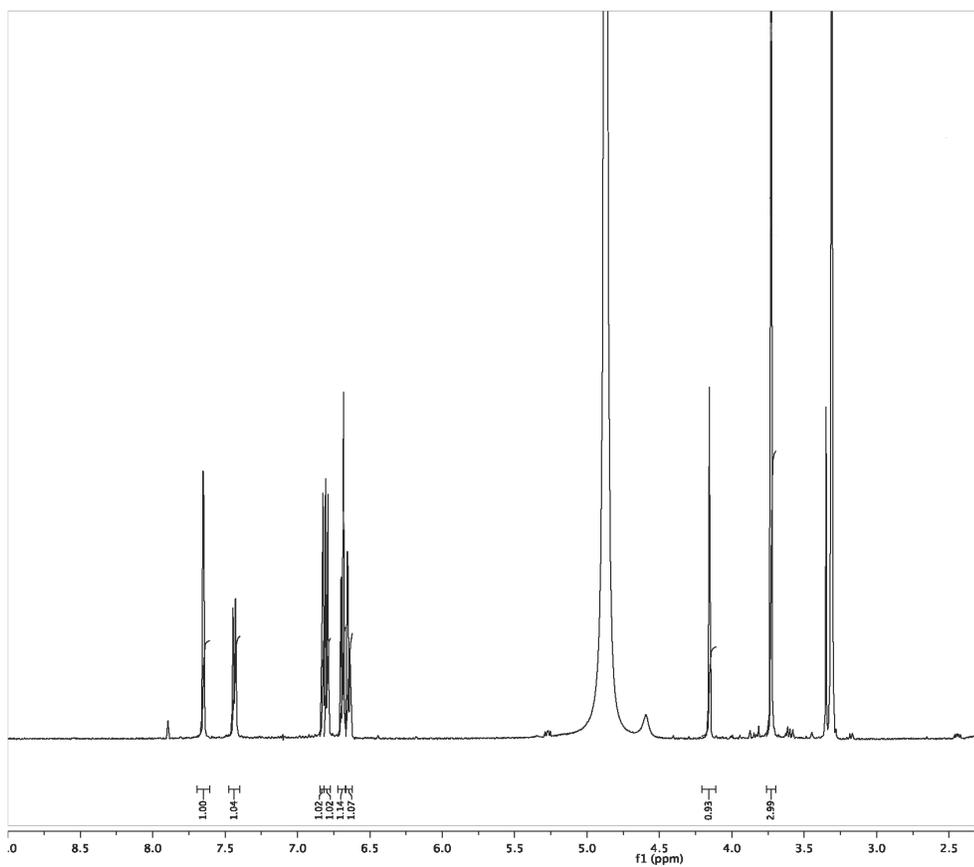
Anexo 30. H-C HSQC para SG-1.



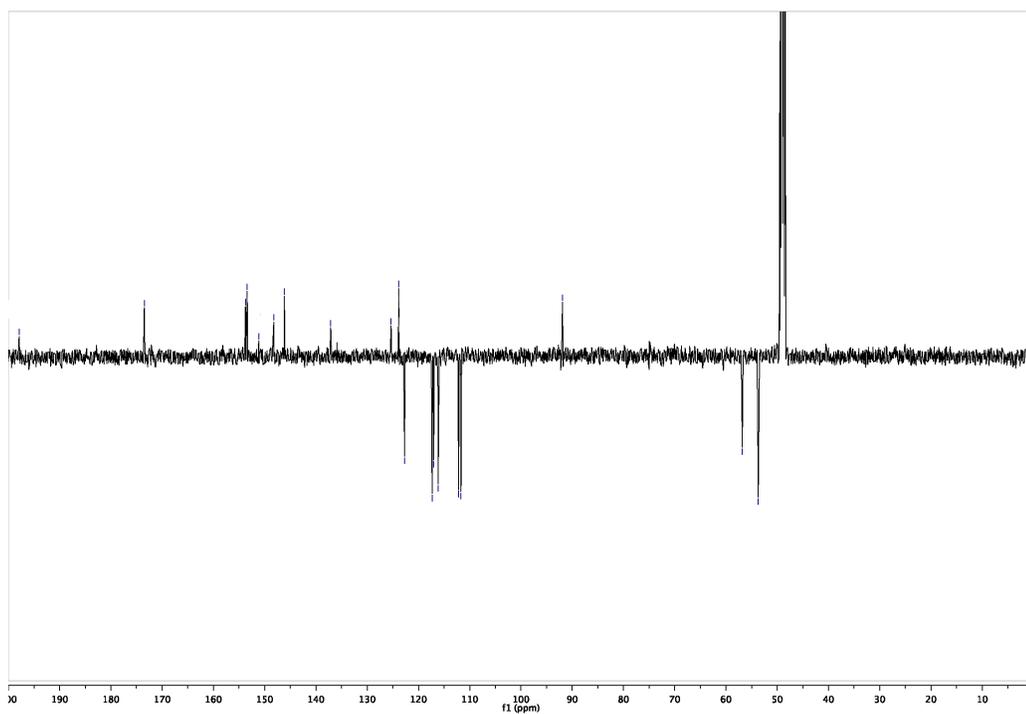
Anexo 31. H-C HMBC para SG-1.



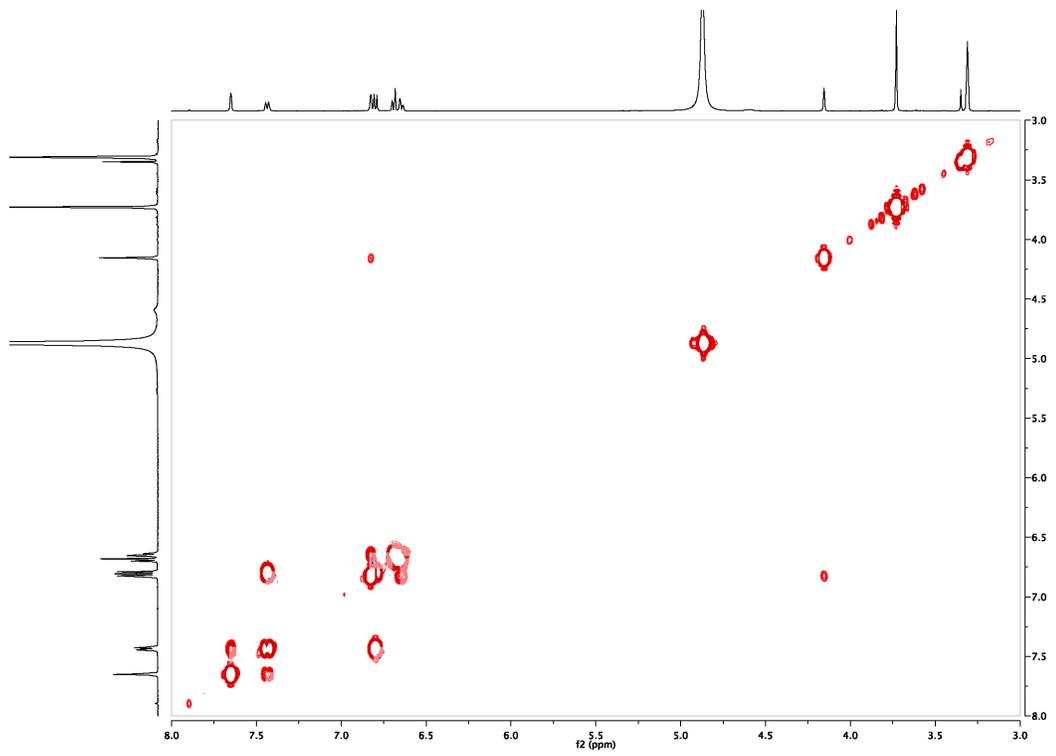
Anexo 32. Espectroscopía NOESY para SG-1.



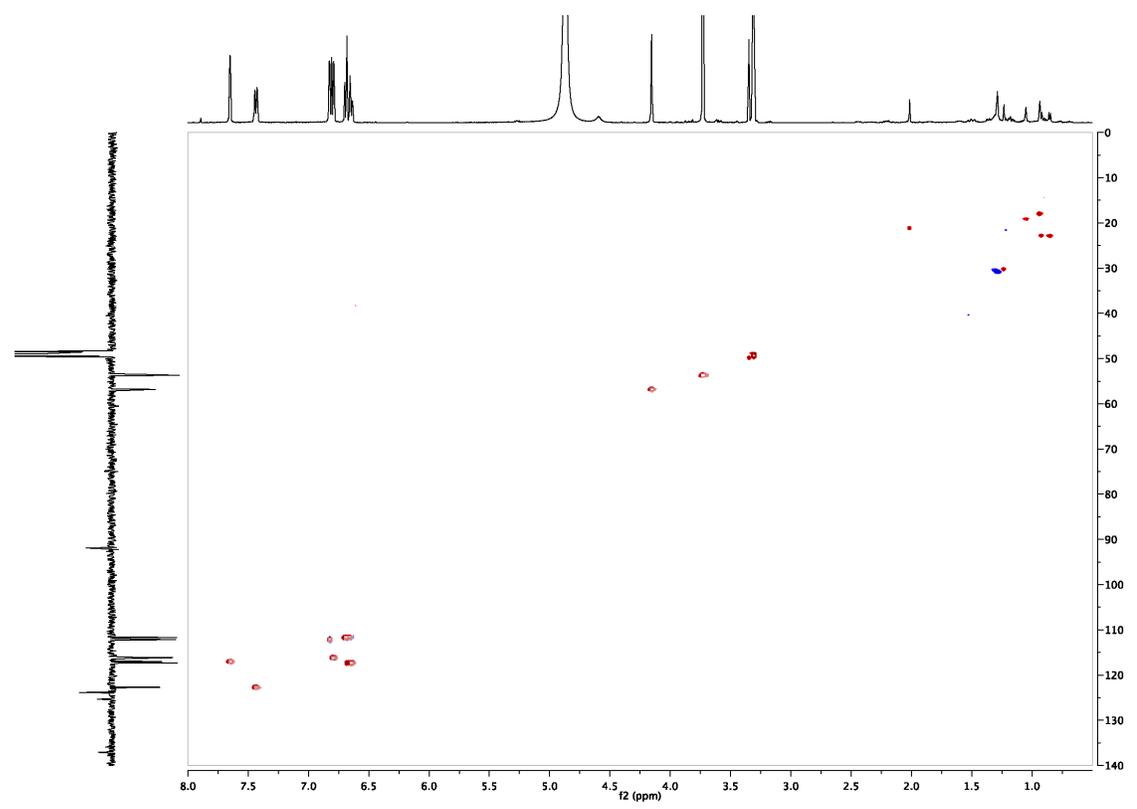
Anexo 33. Espectroscopía de RMN ^1H para SG-3.



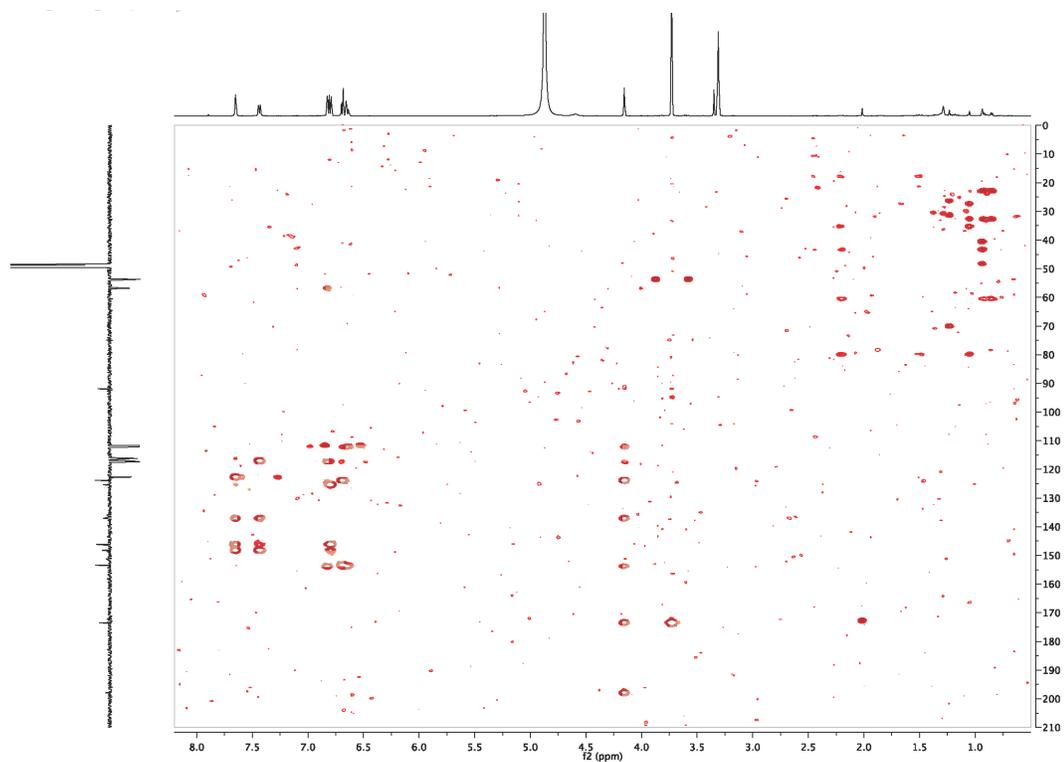
Anexo 34. Espectroscopía de RMN ^{13}C Dept 135° para SG-3.



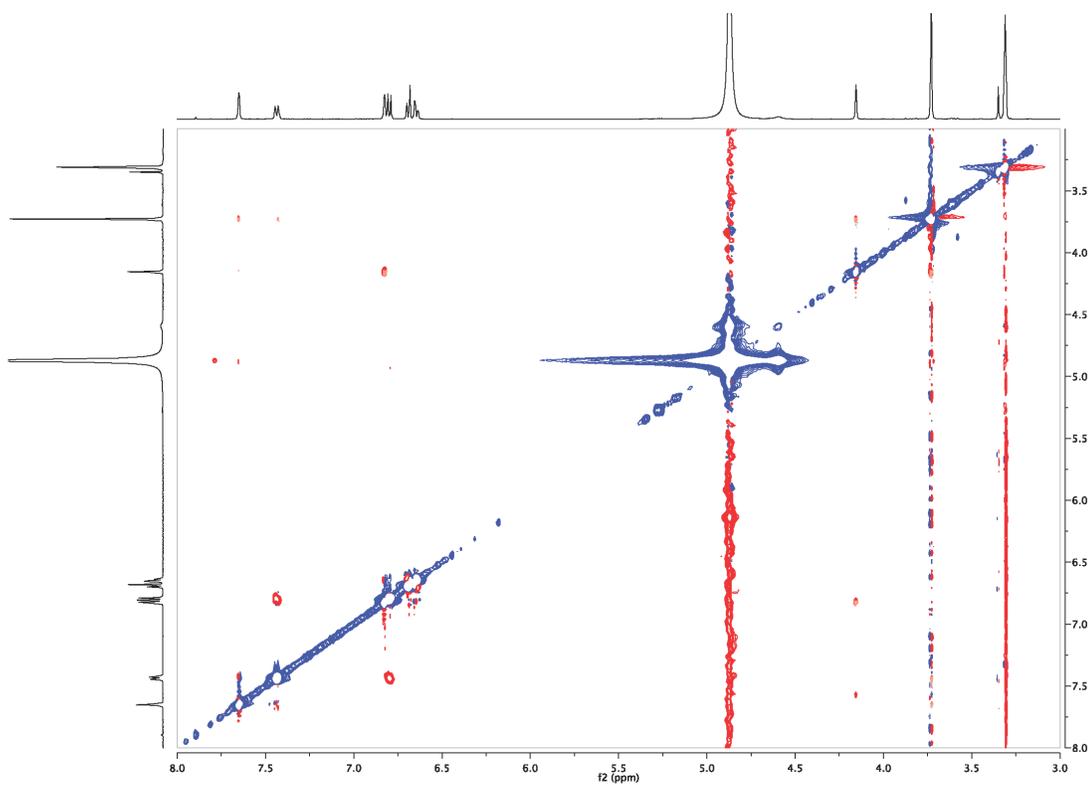
Anexo 35. H-H COSY para SG-3.



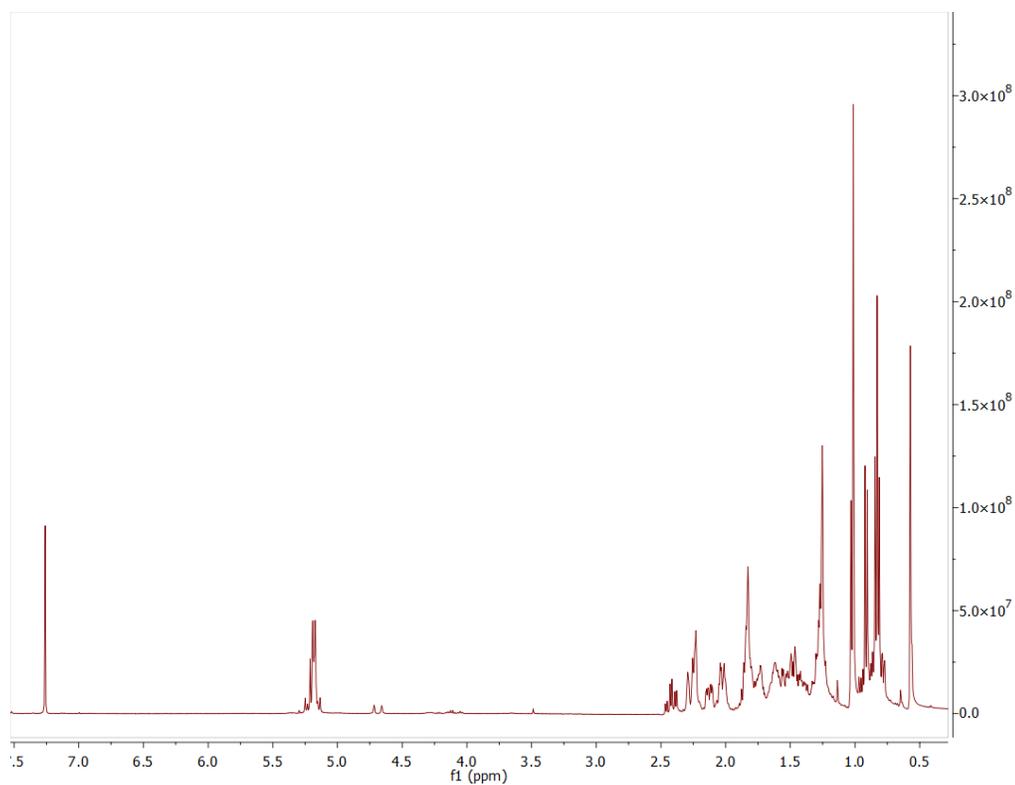
Anexo 36. H-C HSQC para SG-3.



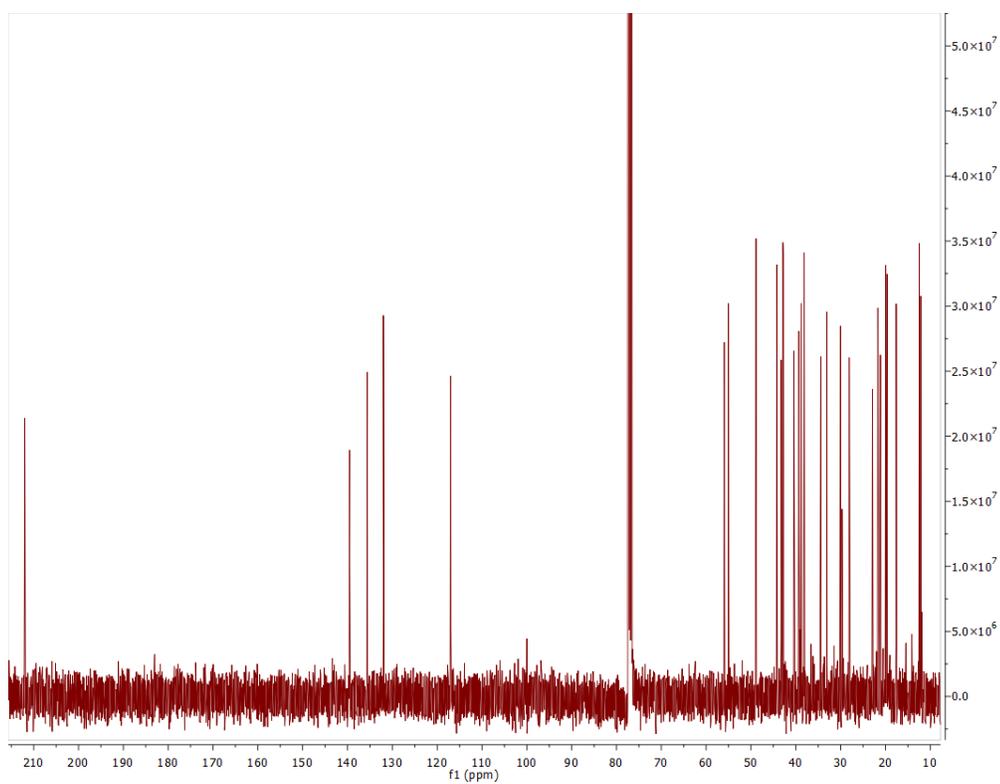
Anexo 37. H-C HMBC para SG-3.



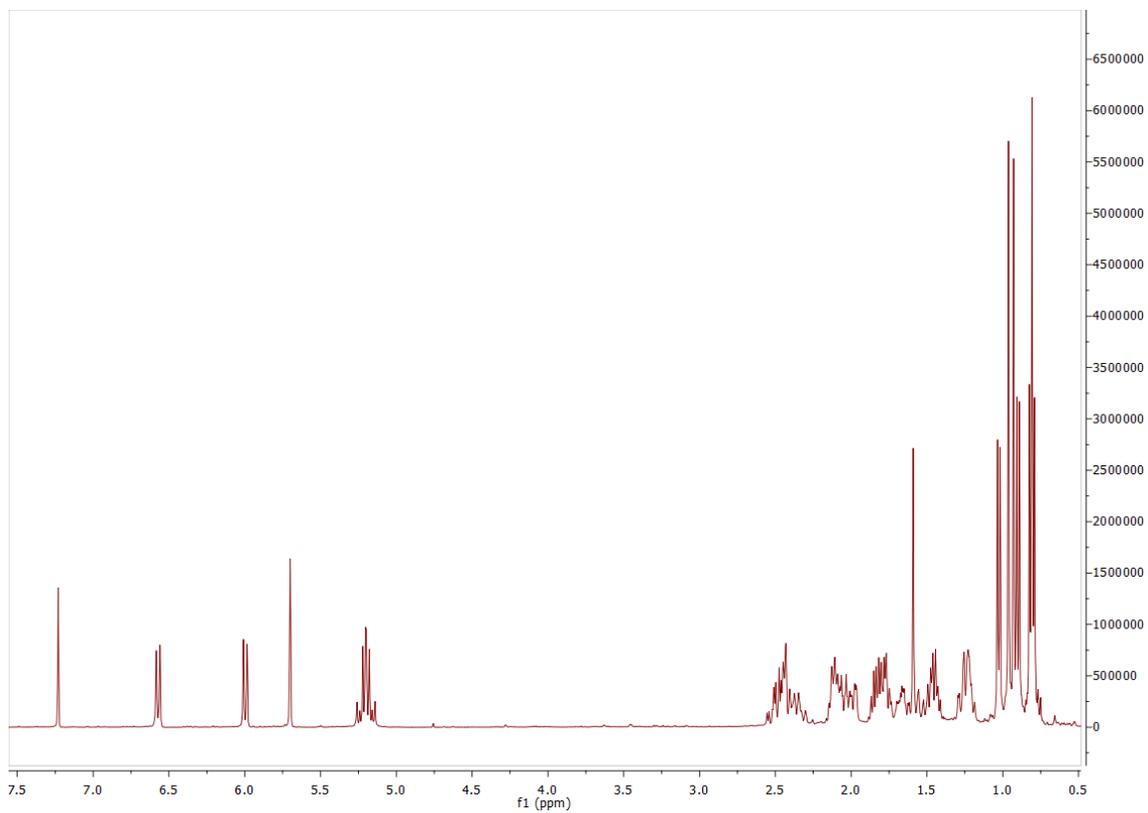
Anexo 38. NOESY para SG-3.



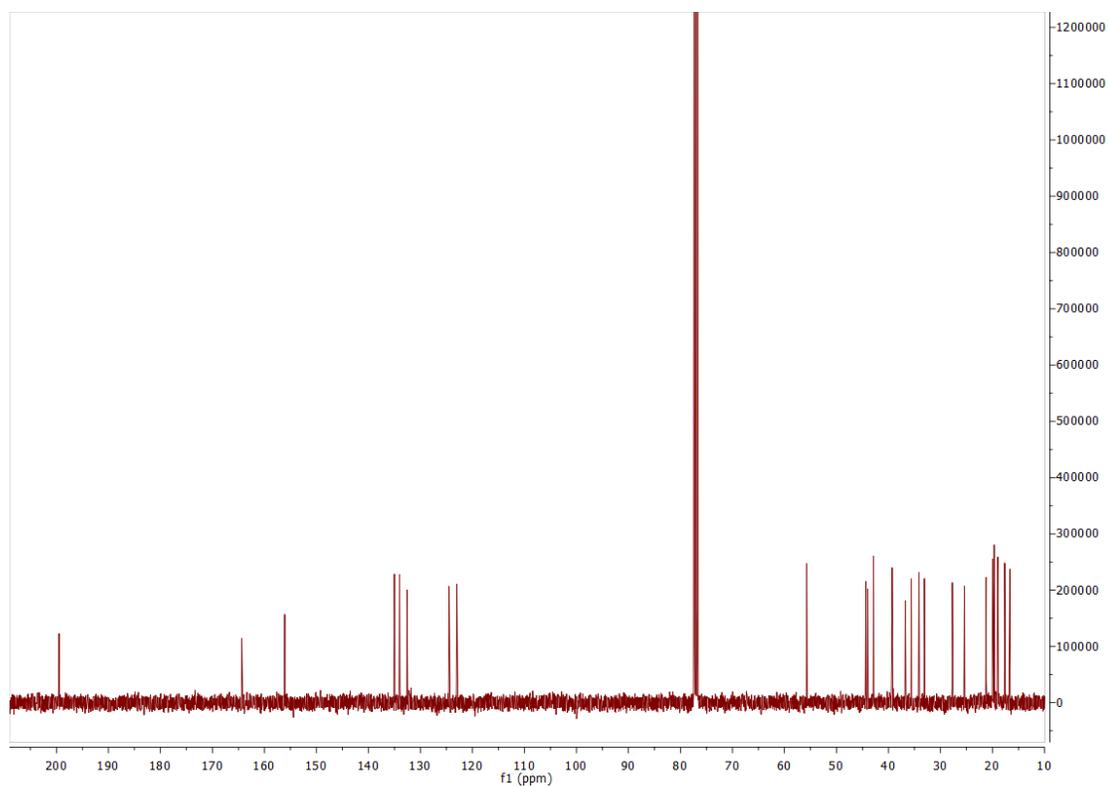
Anexo 39. Espectroscopía de RMN ^1H para OX-1.



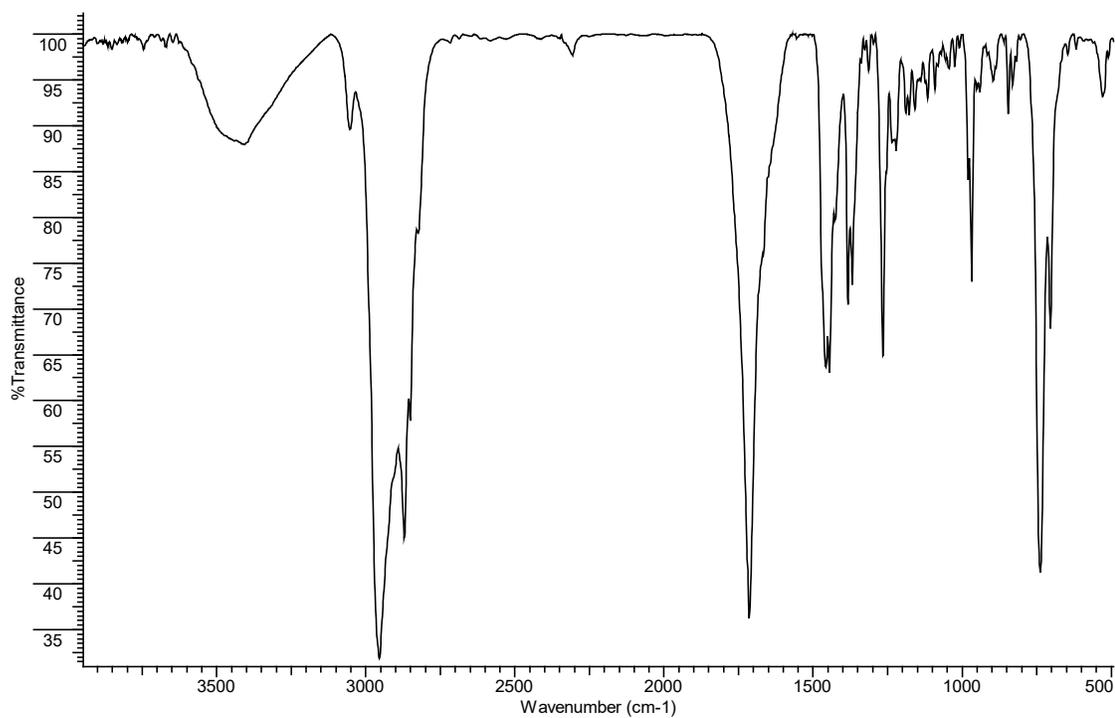
Anexo 40. Espectroscopía de RMN ^{13}C para OX-1.



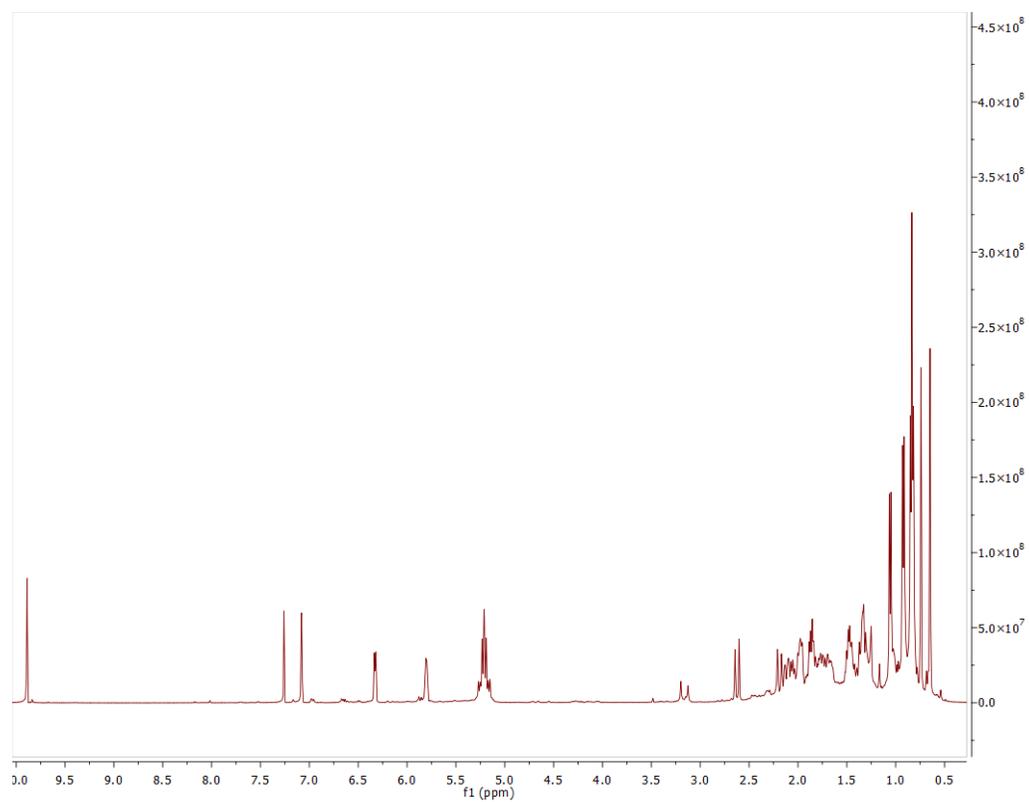
Anexo 41. Espectroscopía de RMN ^1H para **OX-2**.



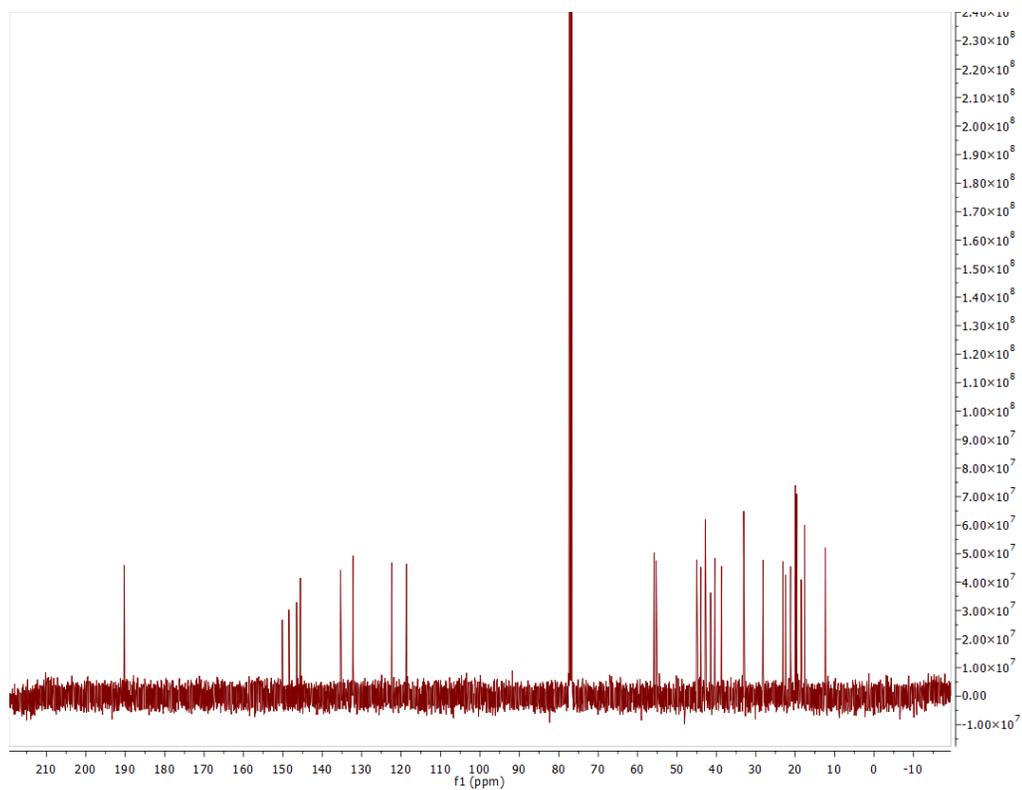
Anexo 42. Espectroscopía de RMN ^{13}C para **OX-2**.



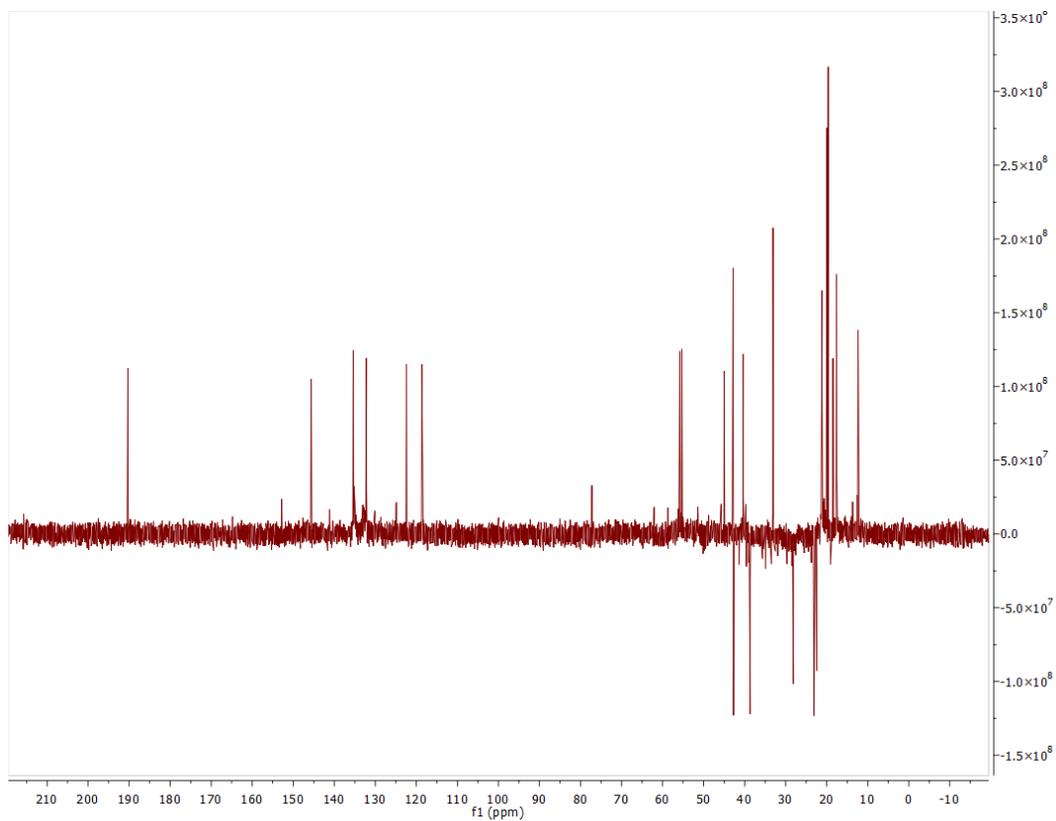
Anexo 43. TF-IR para OX-2 en film.



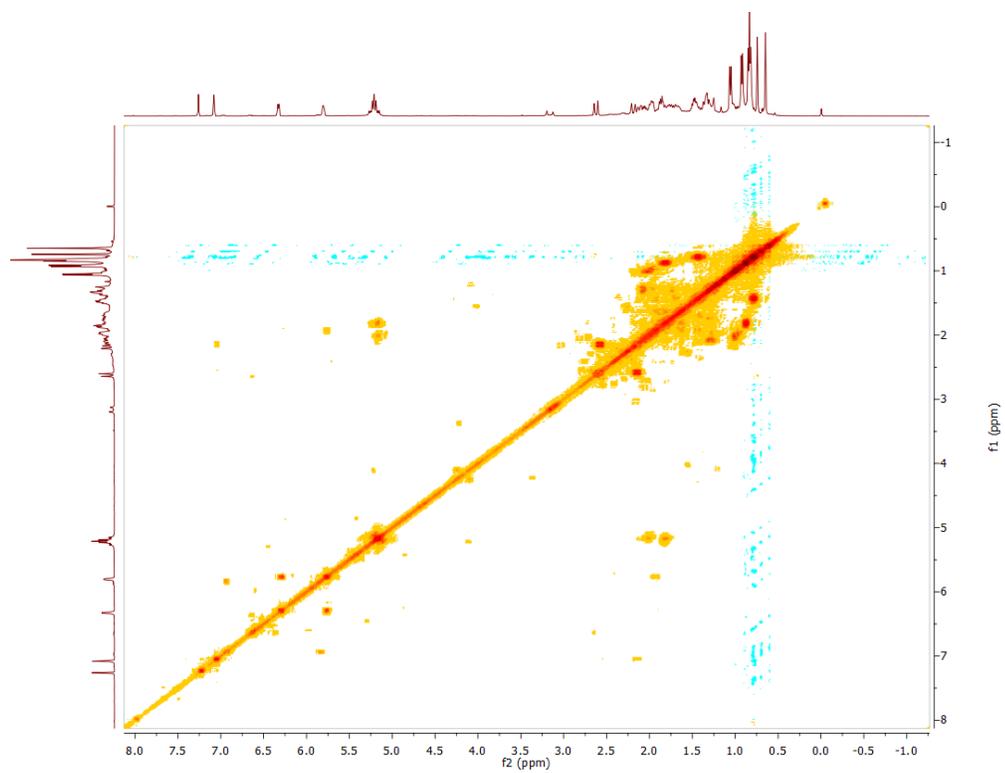
Anexo 44. Espectroscopía de RMN ¹H para OX-3.



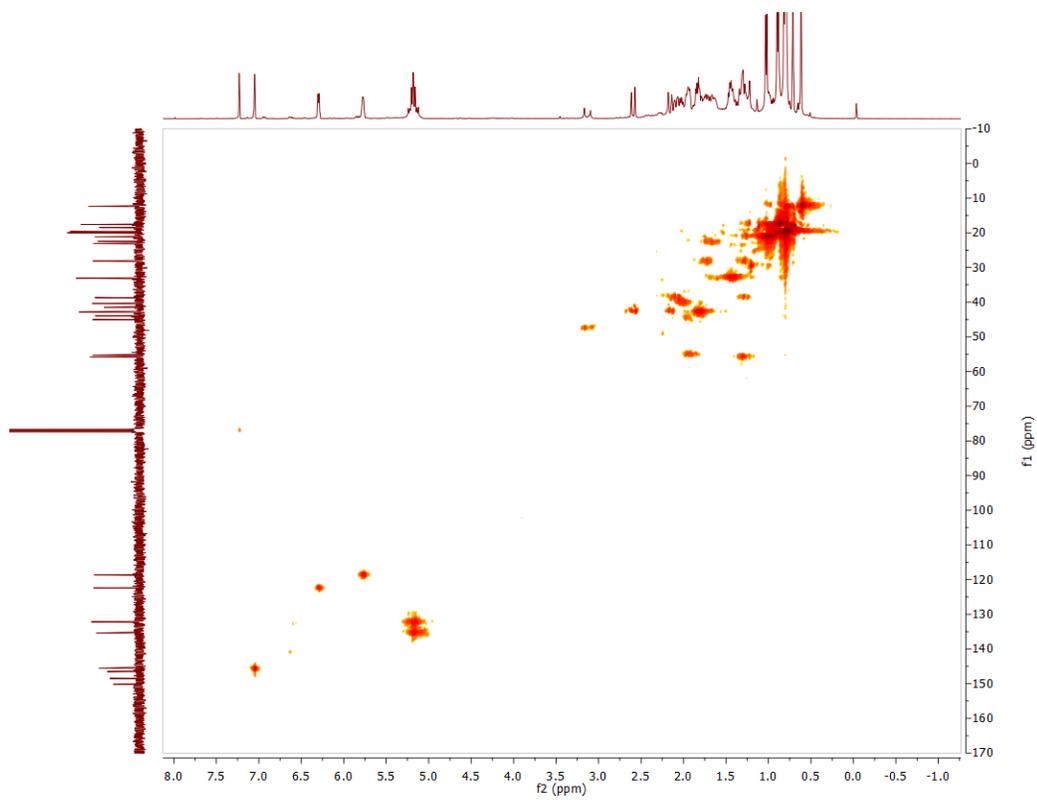
Anexo 45. Espectroscopía de RMN ^{13}C para OX-3.



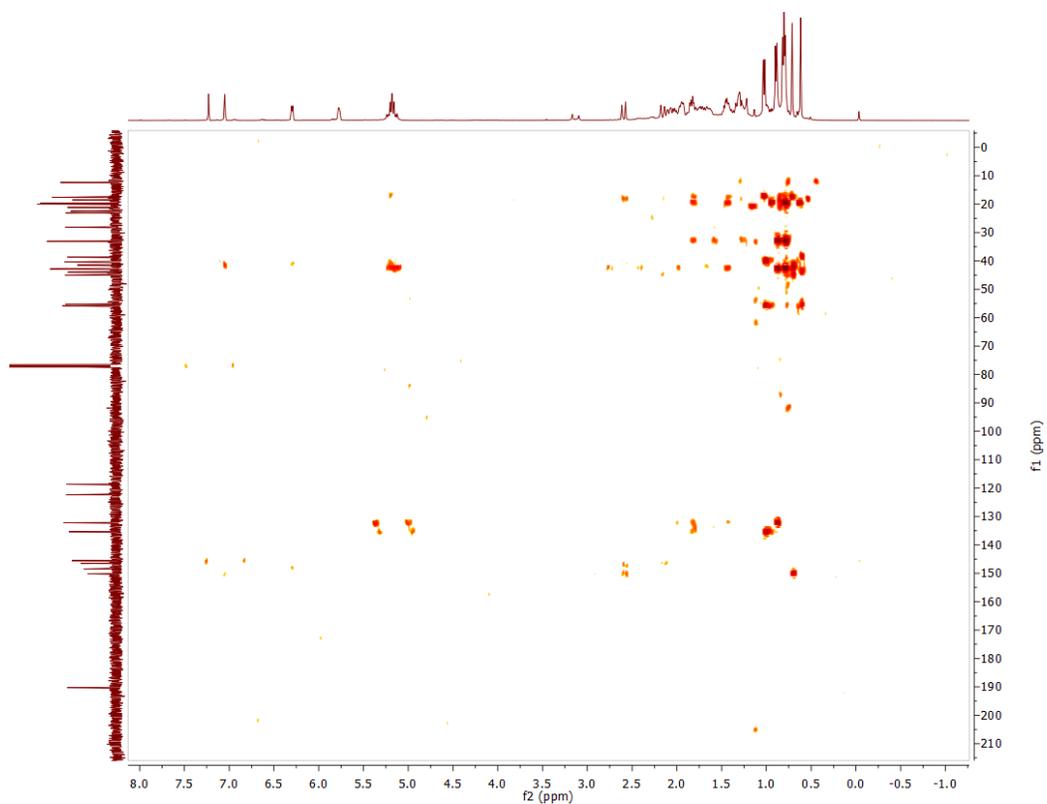
Anexo 46. Espectroscopía de RMN ^{13}C Dept 135° para OX-3.



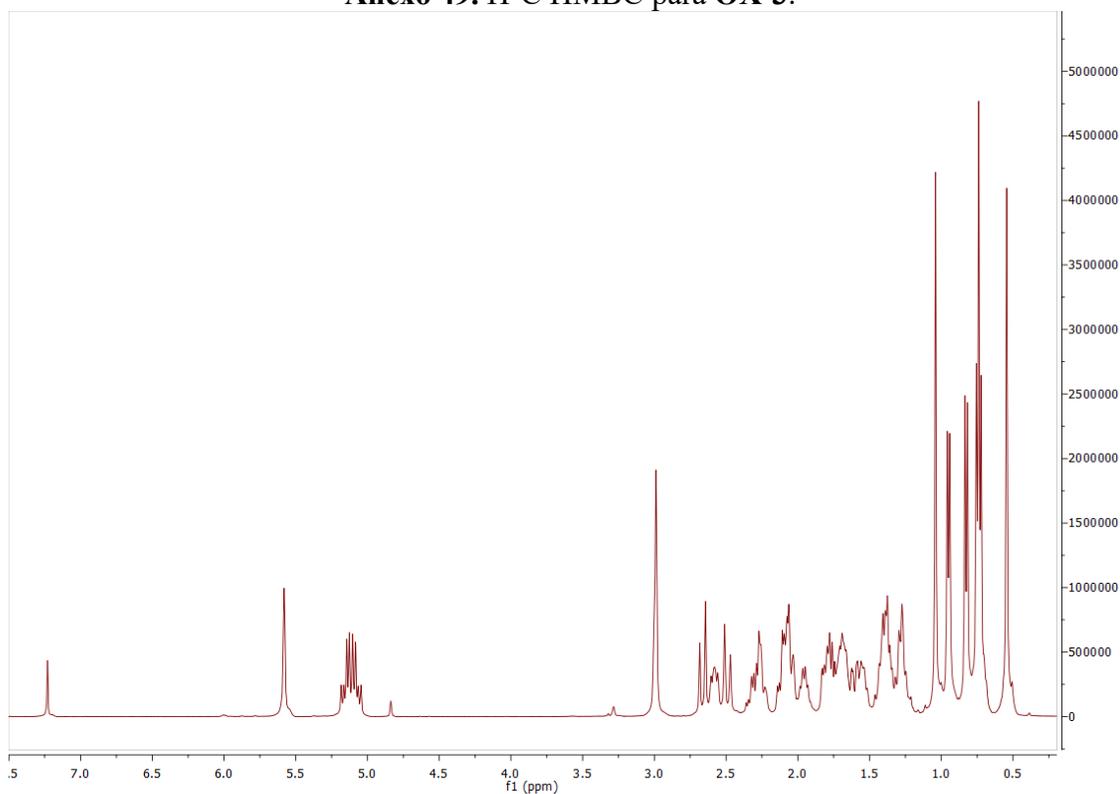
Anexo 47. H-H COSY para OX-3.



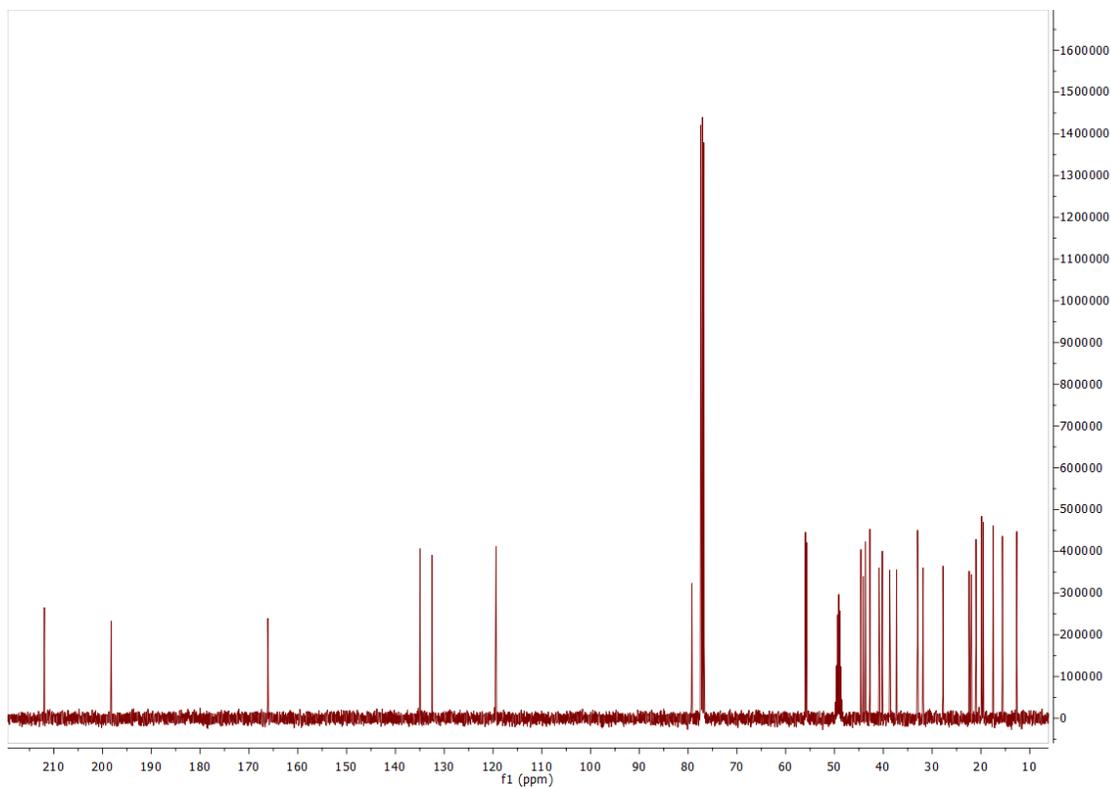
Anexo 48. H-C HSQC para OX-3.



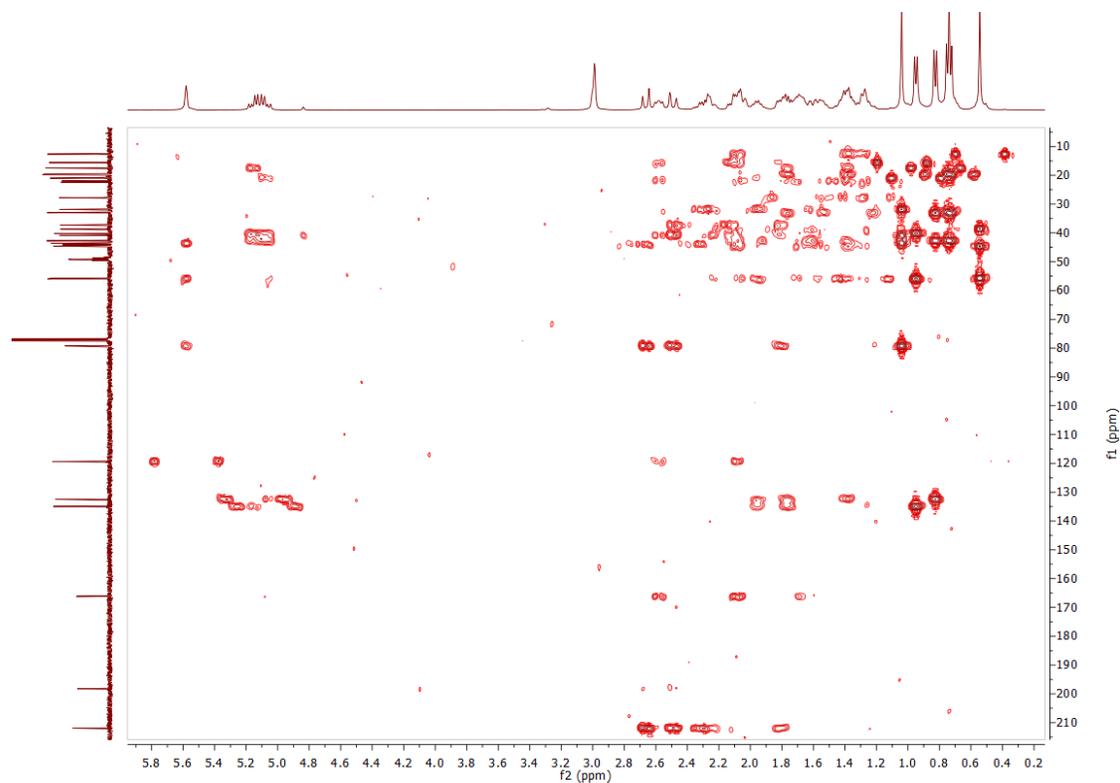
Anexo 49. H-C HMBC para OX-3.



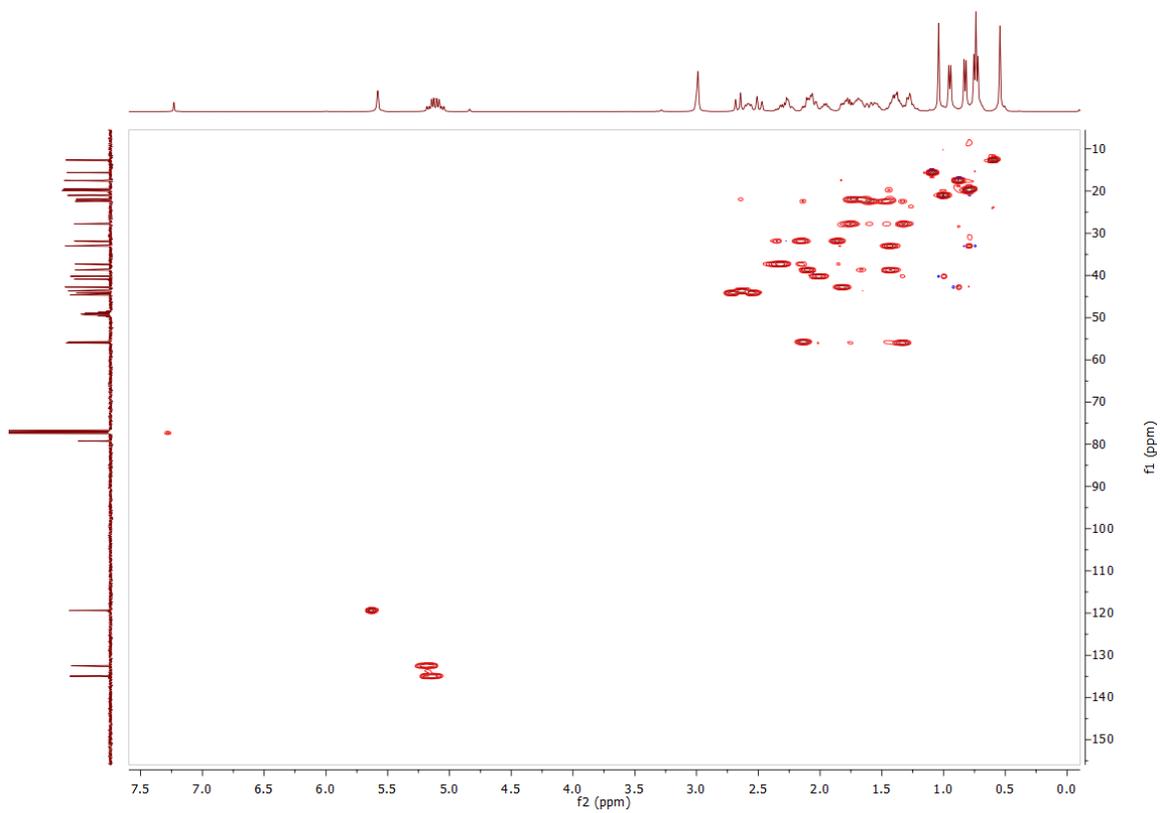
Anexo 50. Espectroscopía de RMN ^1H para OX-4.



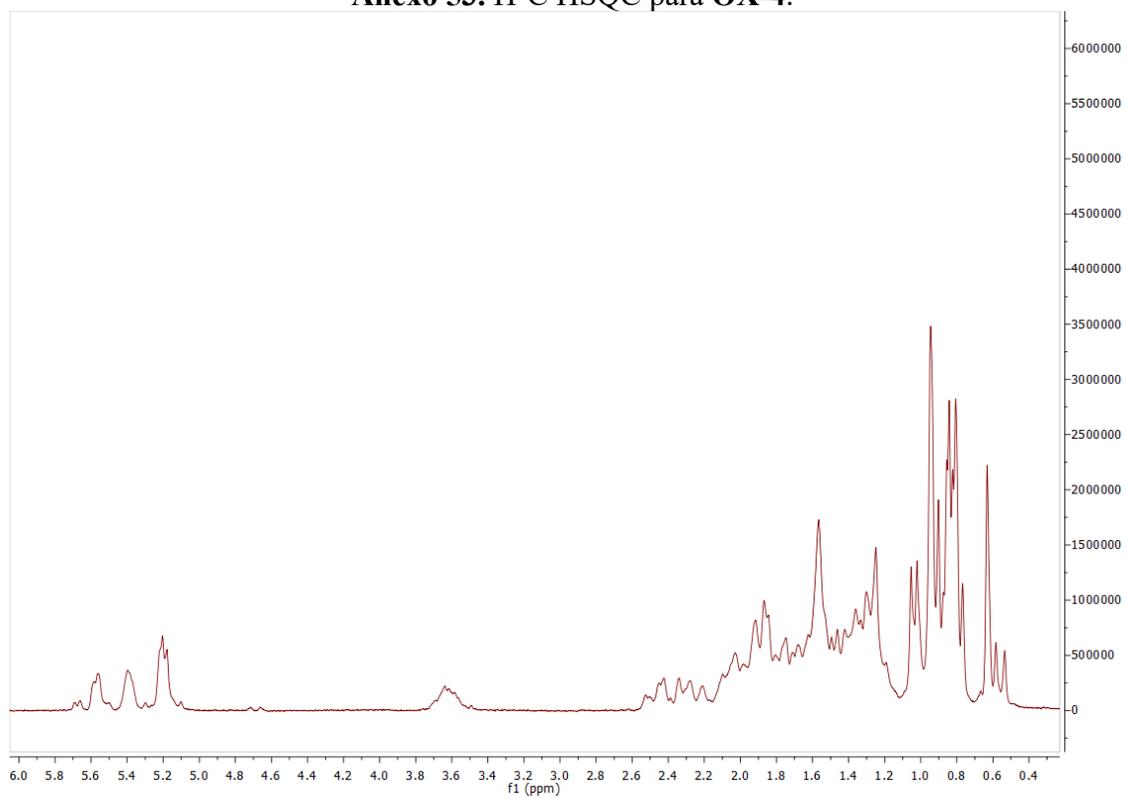
Anexo 51. Espectroscopía de RMN ^{13}C para OX-4.



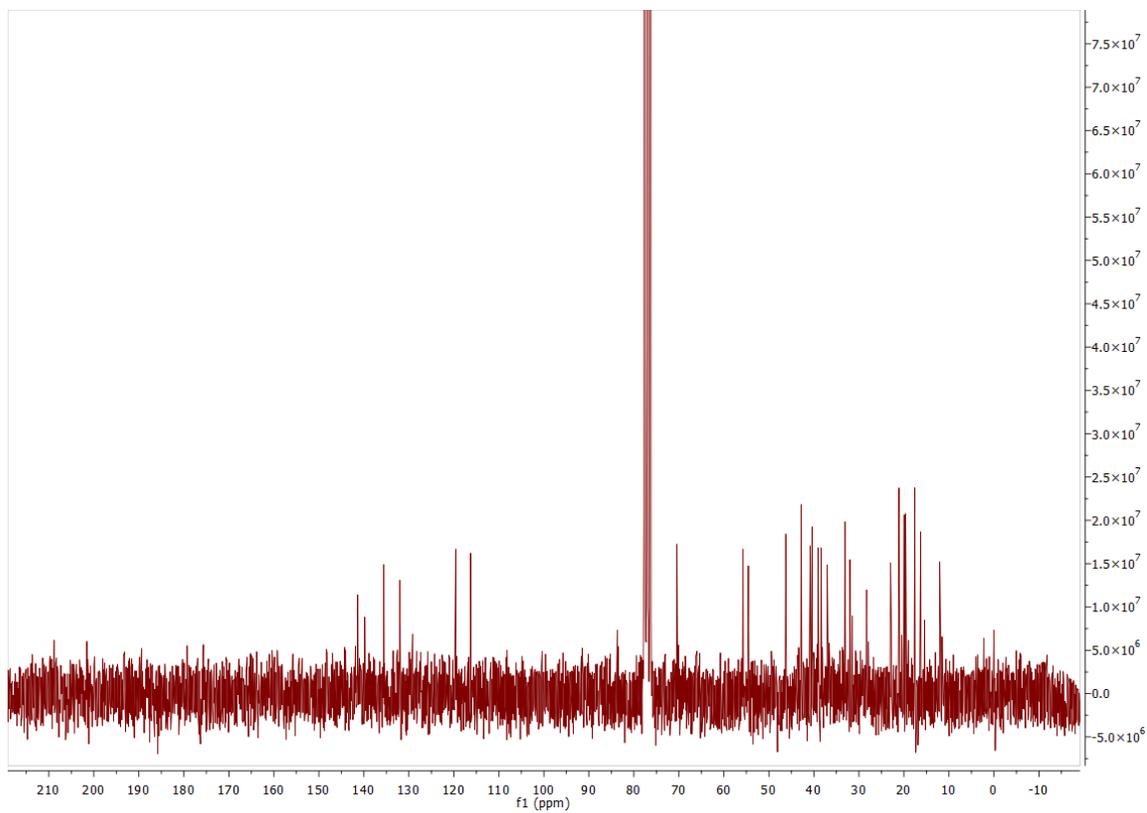
Anexo 52. H-C HMBC para OX-4.



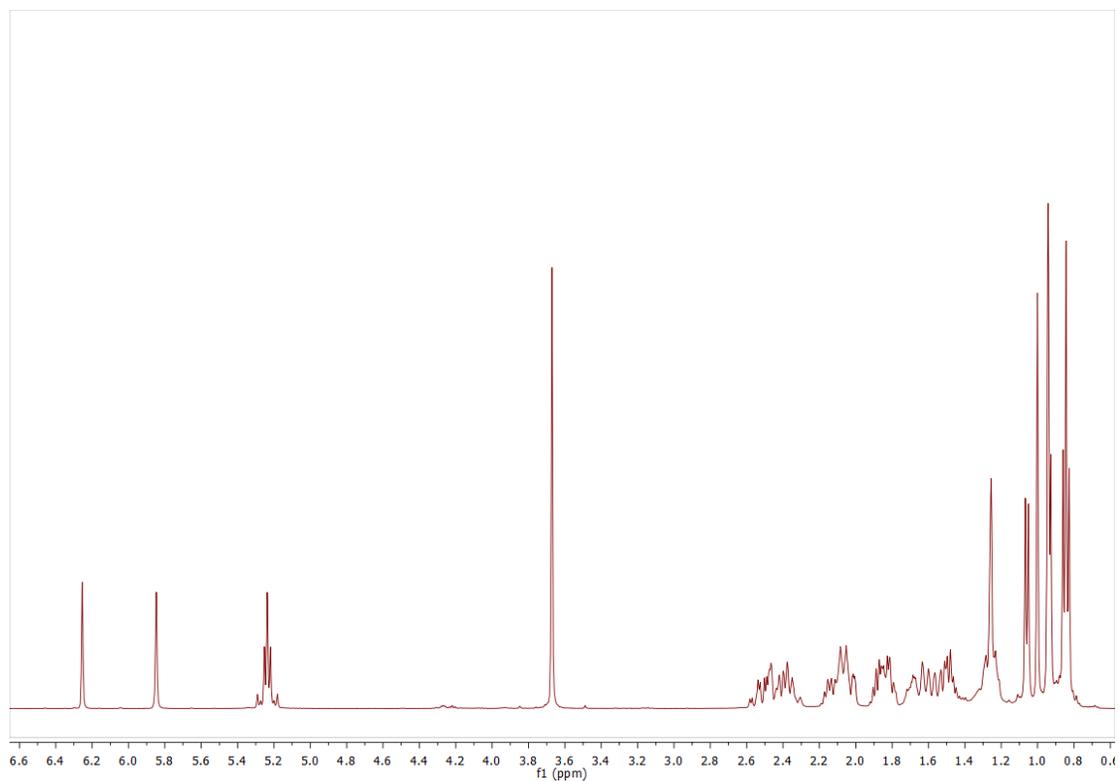
Anexo 53. H-C HSQC para OX-4.



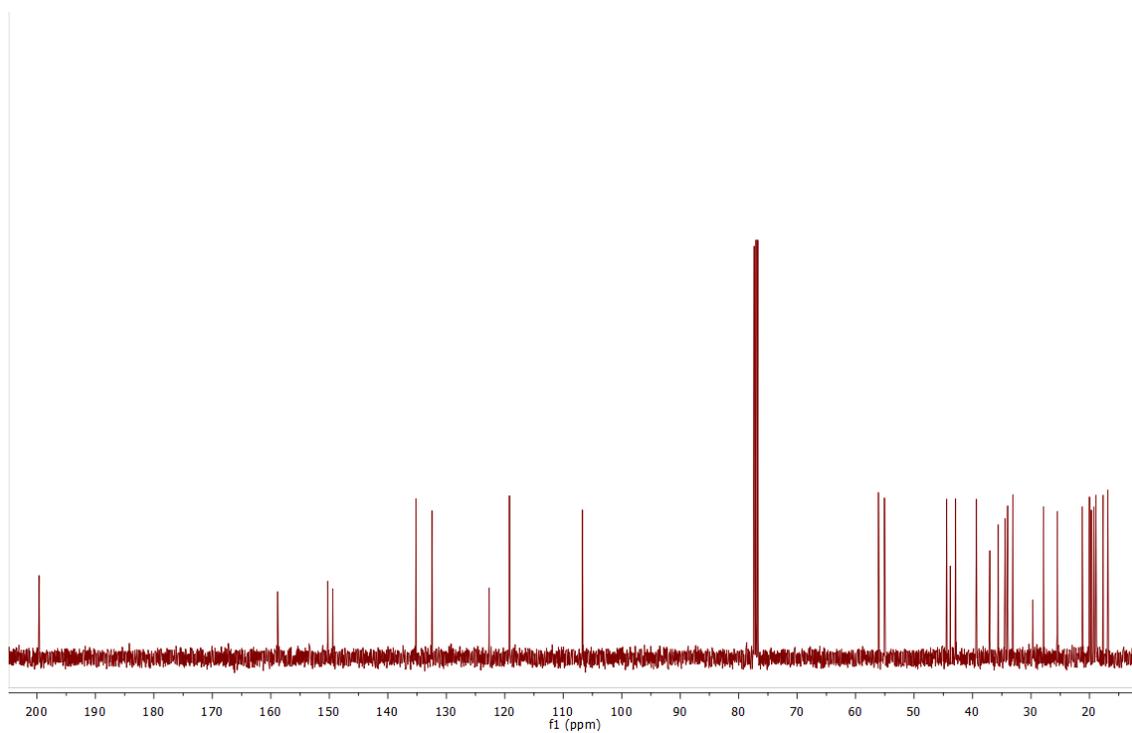
Anexo 54. Espectroscopía de RMN ^1H para OX-5.



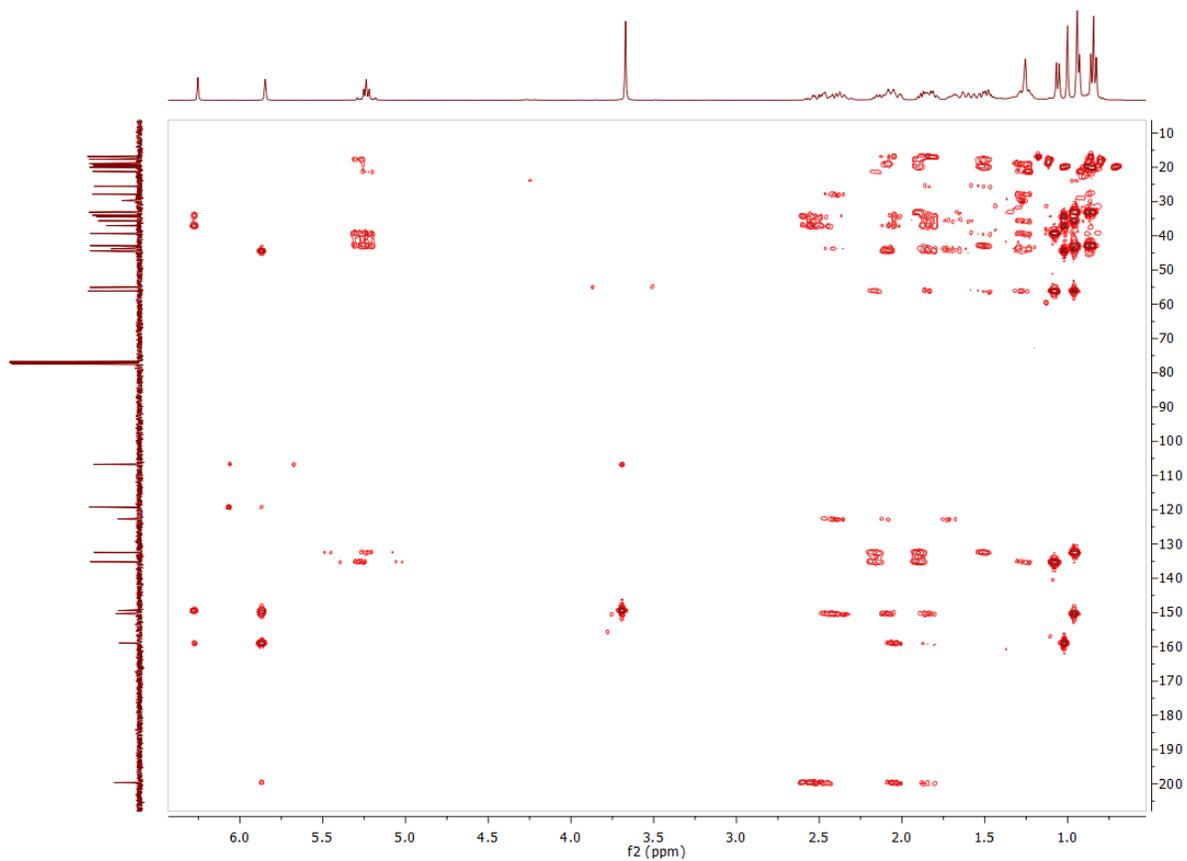
Anexo 55. Espectroscopía de RMN ^{13}C para OX-5.



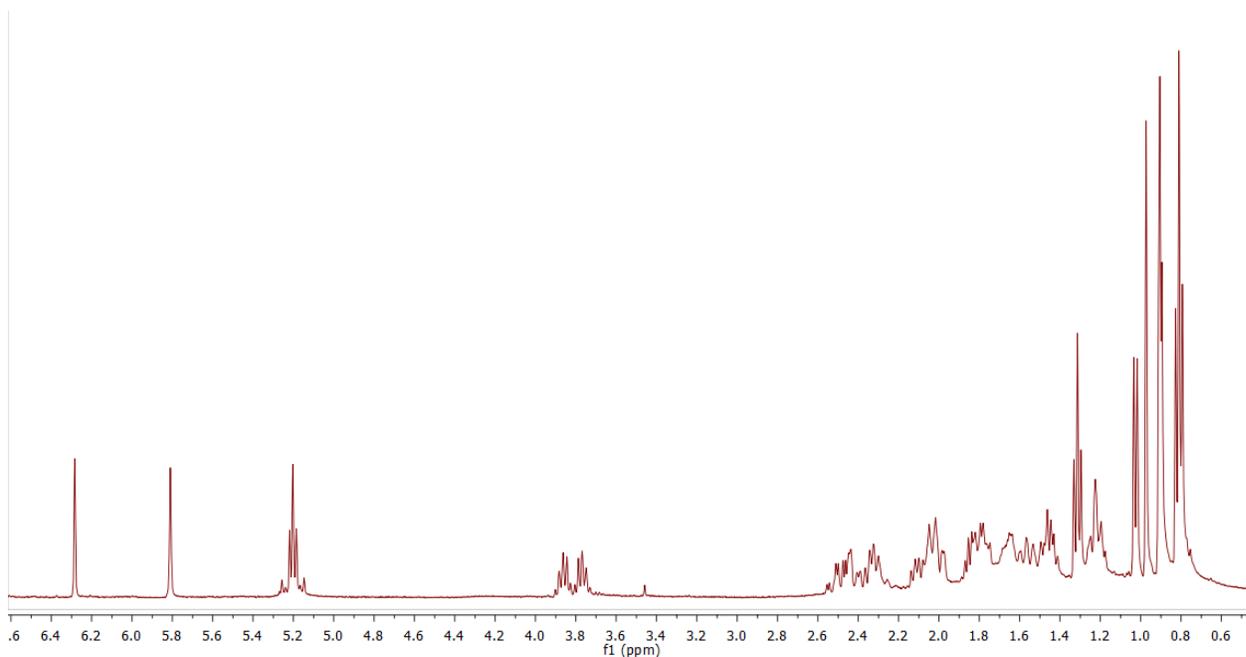
Anexo 56. RMN ^1H para OX-6.



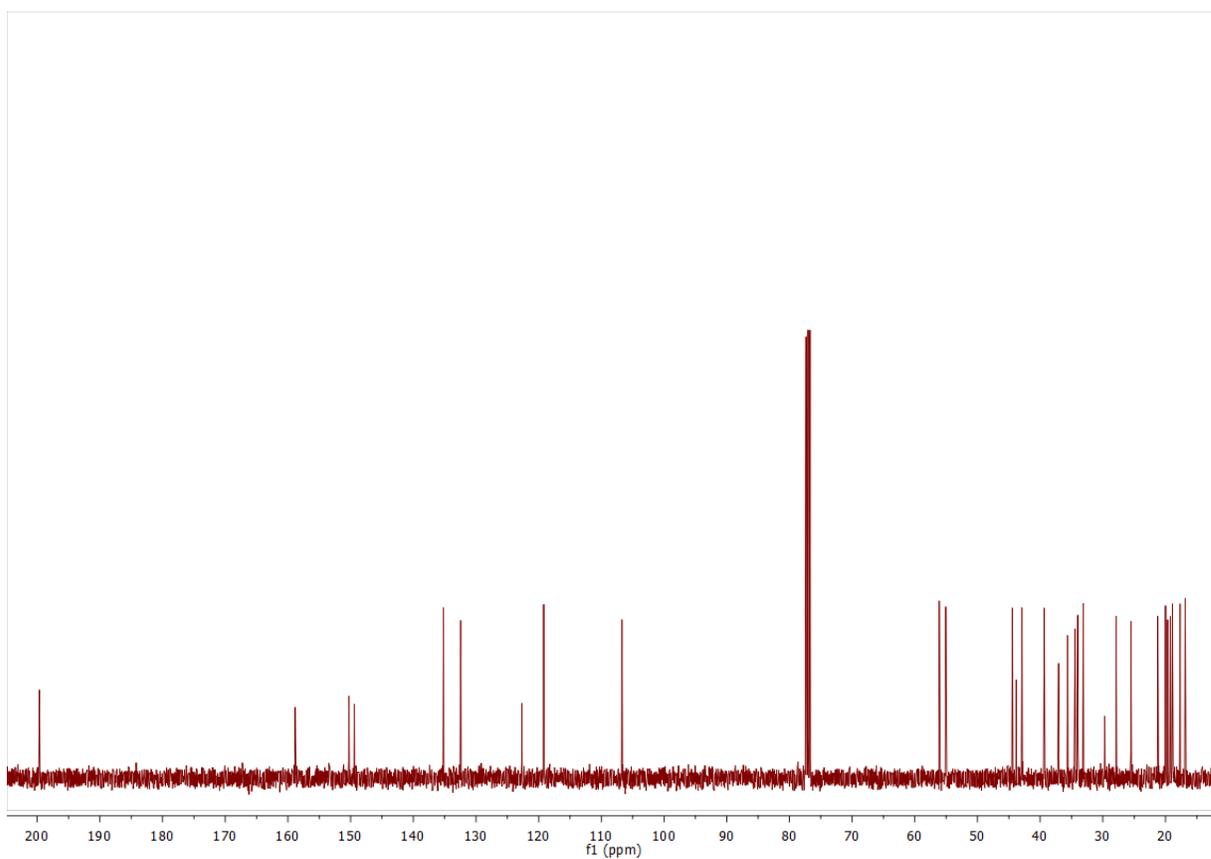
Anexo 57. Espectroscopía de RMN ^{13}C para **OX-6**.



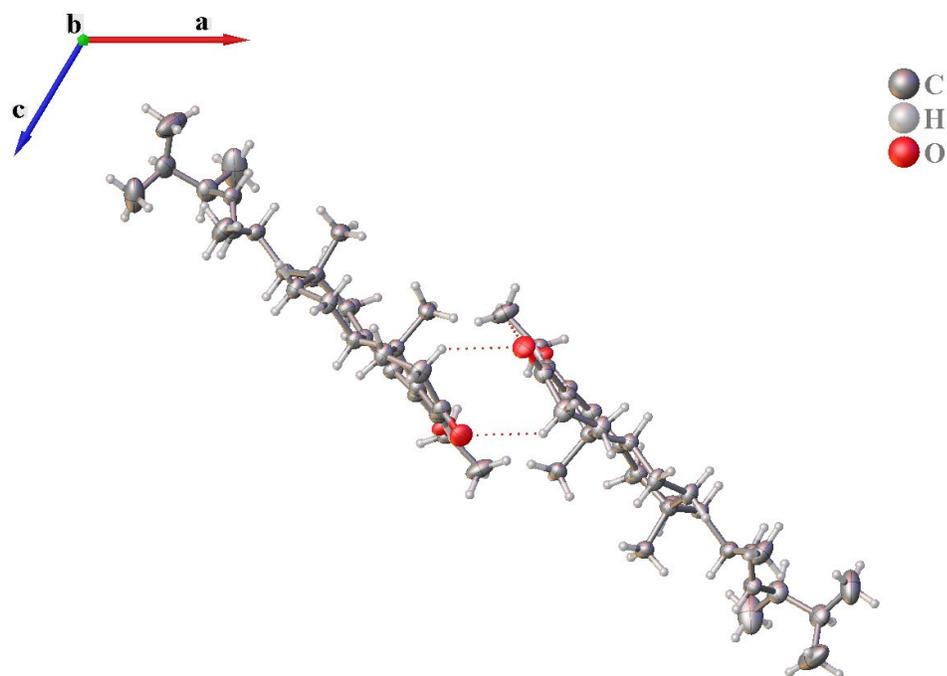
Anexo 58. H-C HMBC para **OX-6**.



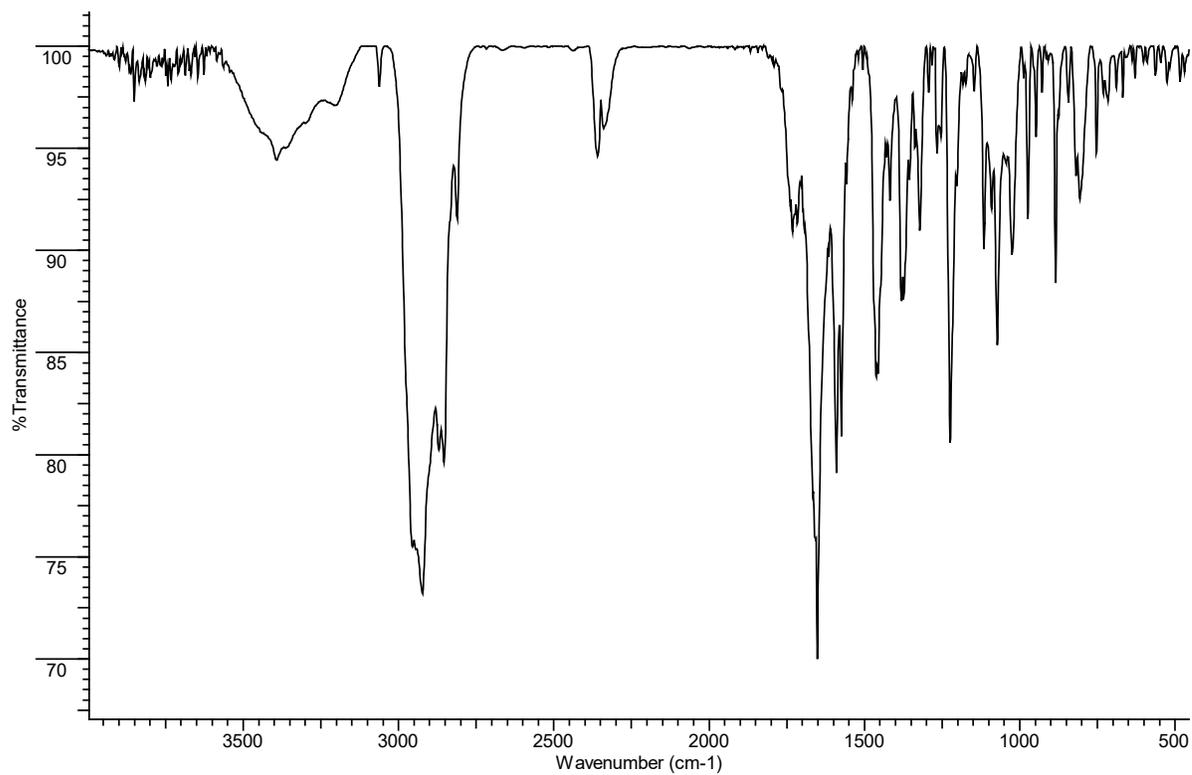
Anexo 59. Espectroscopía de RMN ^1H para **OX 7**.



Anexo 60. Espectroscopía de RMN ^{13}C para **OX 7**.



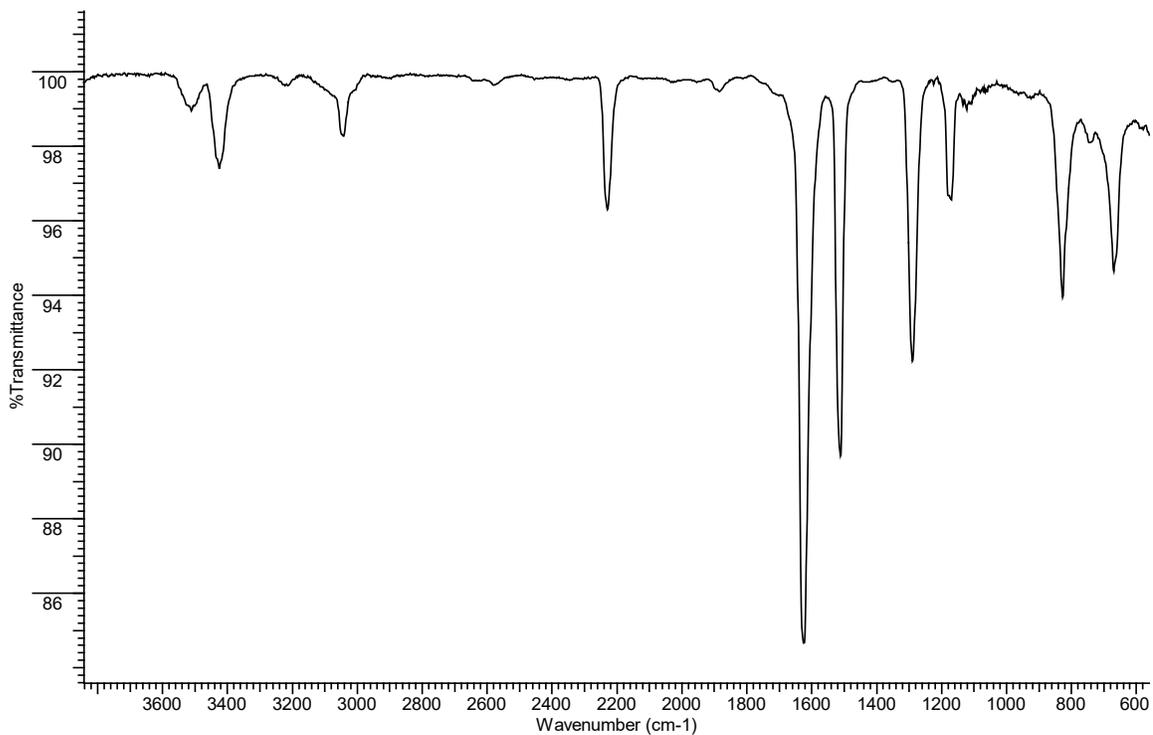
Anexo 61. Diagrama ORTEP para OX 7 con elipsoides térmicos dibujados al 30% de probabilidad.



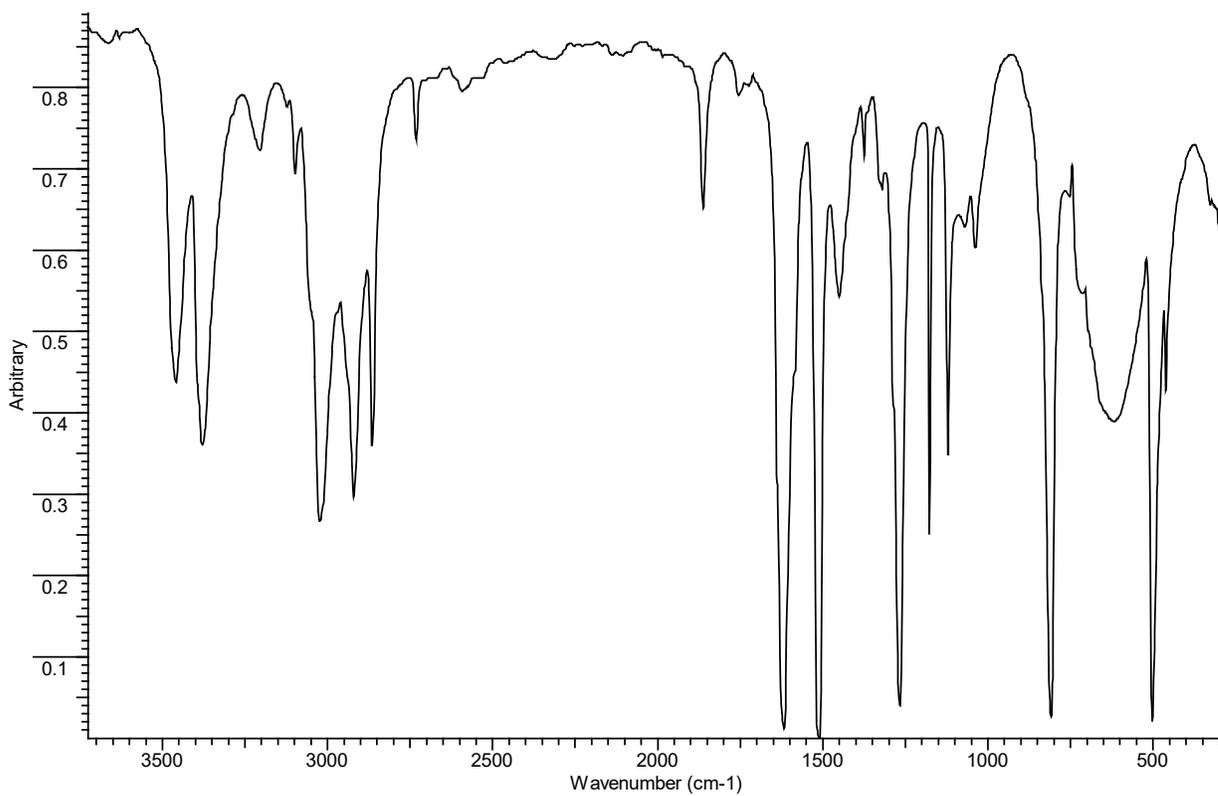
Anexo 62. TF-IR para OX-7 en film.

Formula empírica	C ₃₀ H ₄₄ O ₂
Masa molecular. g mol ⁻¹	436.65
Collection T. K	298
Tamaño del cristal (mm)	0.332 × 0.236 × 0.203
Sistema cristalino	Monoclínico
Grupo espacial	C2
<i>a</i> (Å)	20.5500(16)
<i>b</i> (Å)	9.4697(8)
<i>c</i> (Å)	16.0792(15)
α (°)	90
β (°)	120.803(3)
γ (°)	90
<i>V</i> (Å ³)	2687.6(4)
<i>Z</i>	4
<i>D</i> _{calcd} (g cm ⁻³)	1.079
<i>F</i> (000)	960.0
Coeff Abs (mm ⁻¹)	0.065
Rango θ (°)	4.616-52.818
Rango h.k.l	-24/25, -11/11, -20/20
No. refl. Colectadas	24504
No. refl. Independientes	5497
Datos/Restrains/Parámetros	5497/1/296
índices R finales [<i>I</i> > 2sigma(<i>I</i>)]	R1 = 0.0434, wR2 = 0.1095
Índices R (todos los datos)	R1 = 0.0547, wR2 = 0.1191
<i>F</i> ²	1.041
<i>Largest diff. Peak and hole</i> (e.Å ⁻³)	0.17/-0.14
Parámetro Flack	0.3(3)

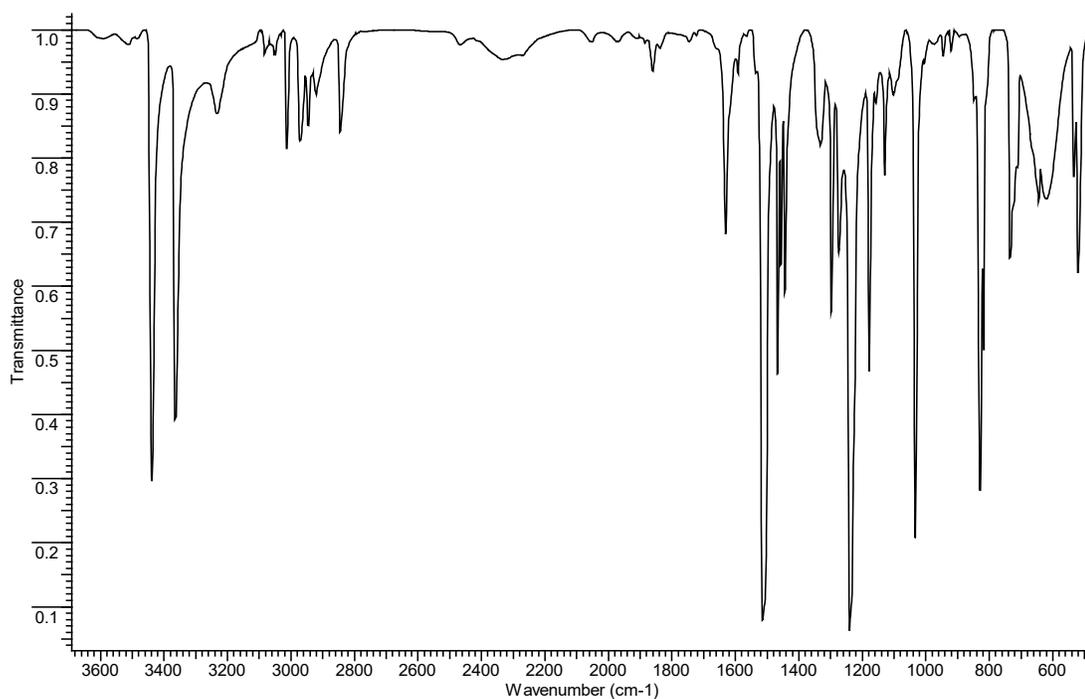
Anexo 63. Recopilación de datos del cristal y parámetros del refinamiento estructural para **OX 7**.



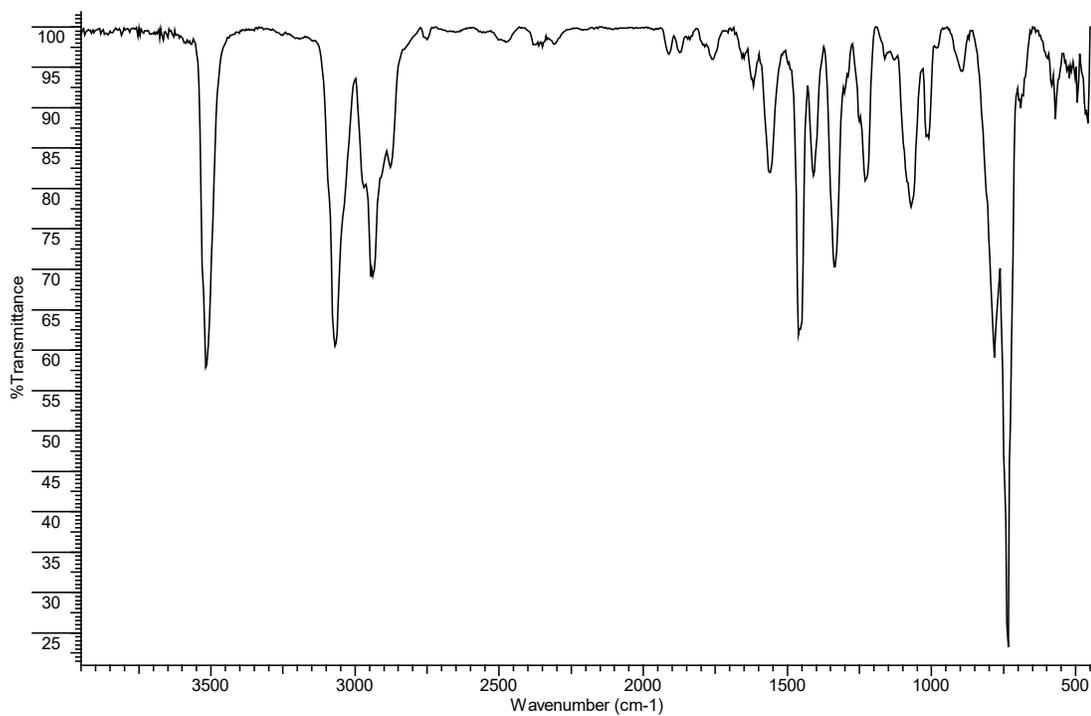
Anexo 64. TF-IR para An 1 en KBr.



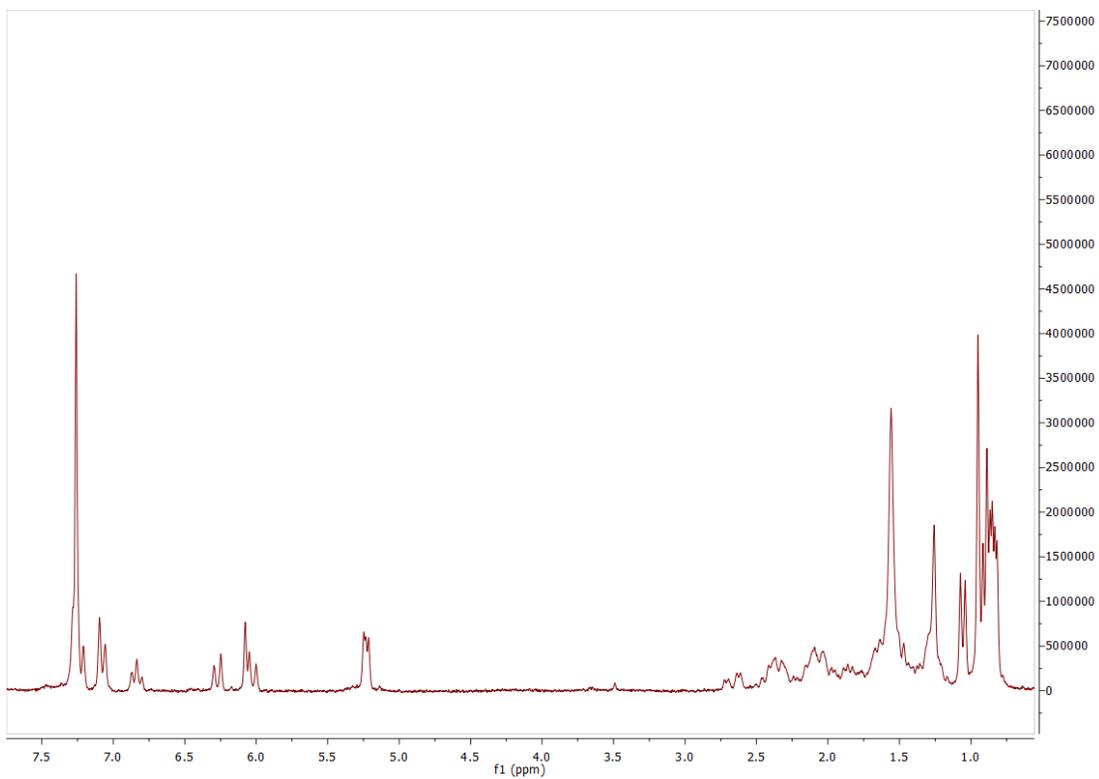
Anexo 65. TF-IR para An 2 en KBr.



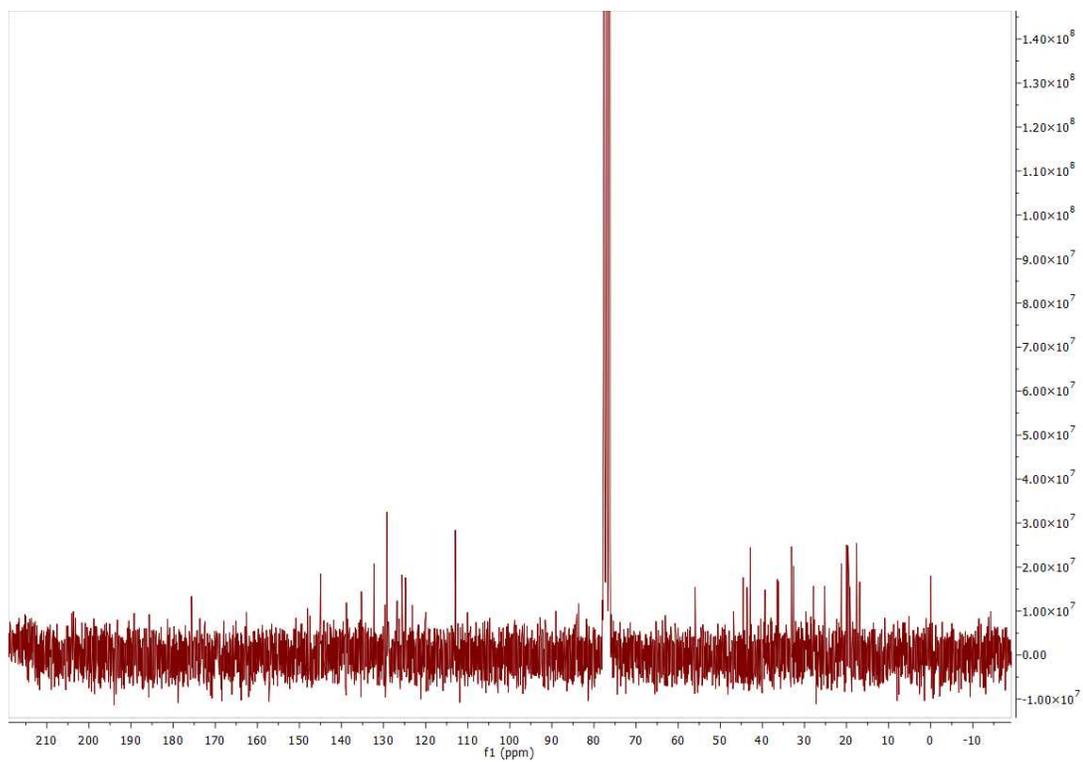
Anexo 66. TF-IR para An 3 en KBr.



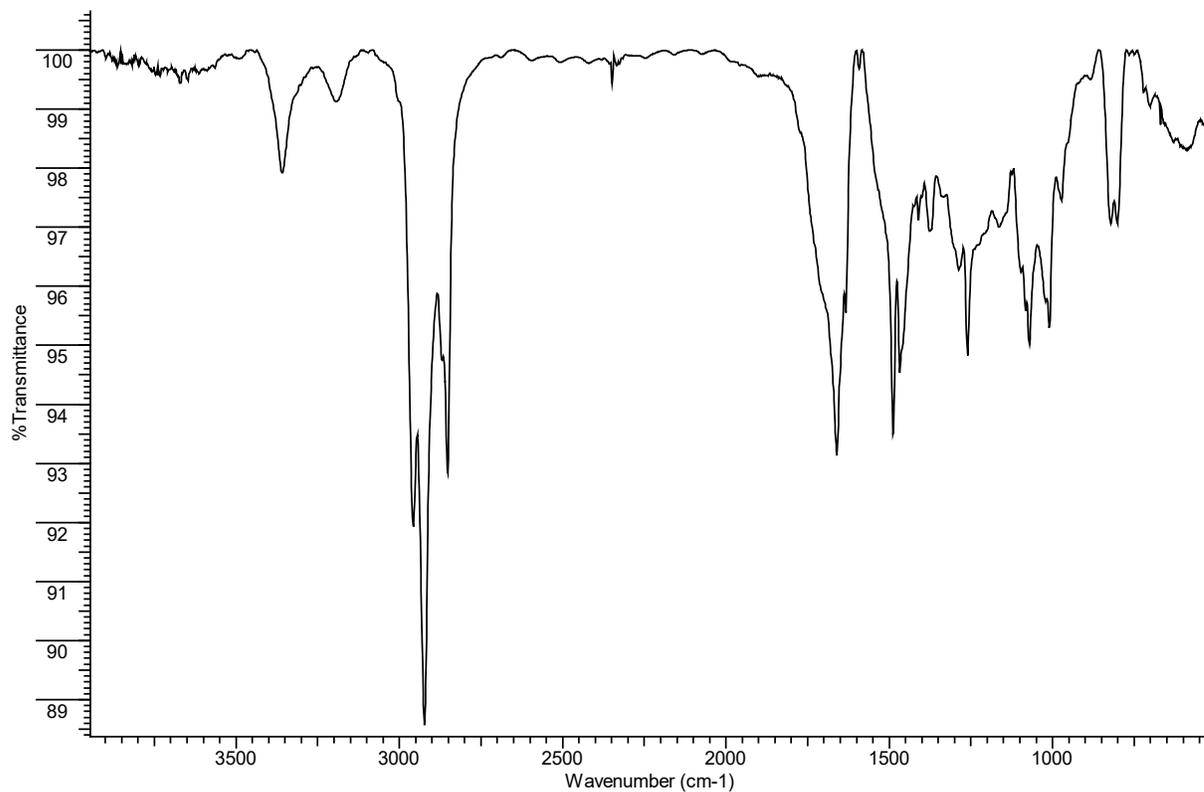
Anexo 67. TF-IR para In 0.



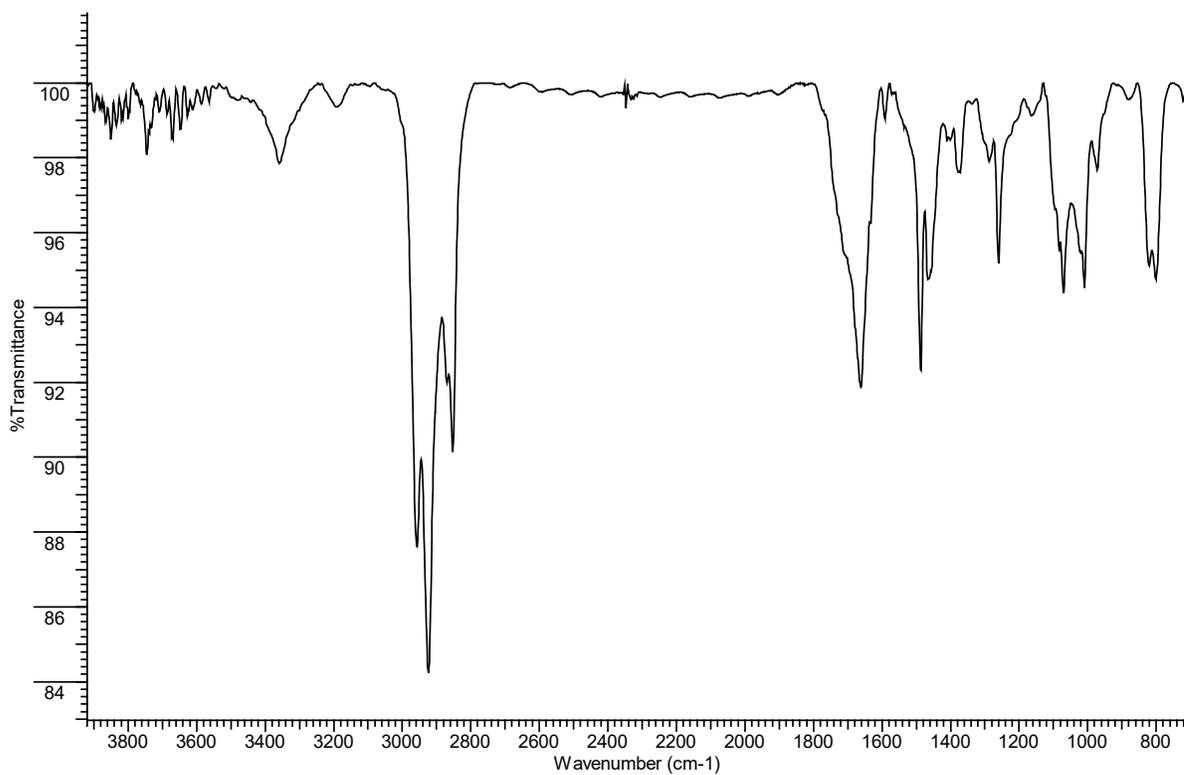
Anexo 68. RMN ^1H para In 1.



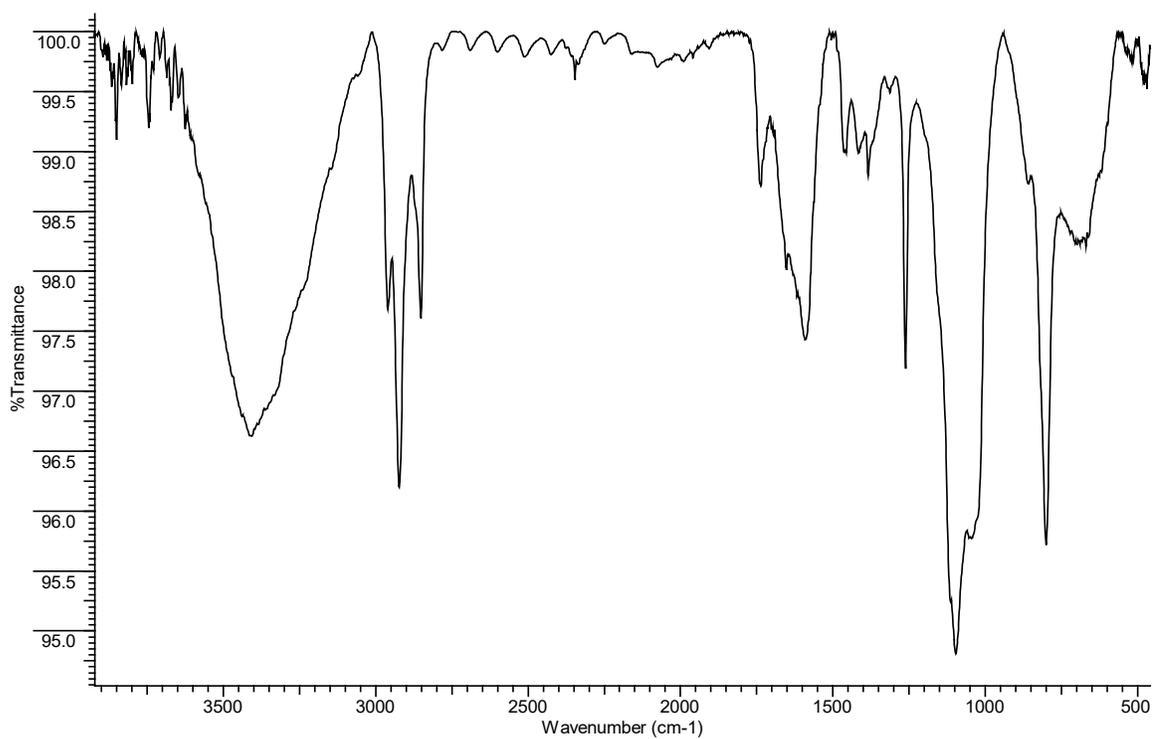
Anexo 69. RMN ^{13}C para In 1.



Anexo 70. TF-IR para In 1 en film.



Anexo 71. TF-IR para In 2 en film.



Anexo 72. TF-IR para **In 3** en film.