



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

CENTRO DE ECOLOGÍA QUÍMICA AGRÍCOLA

Departamento de Química

Aislamiento, purificación y caracterización estructural de nuevos
principios bioactivos a partir de extractos fúngicos

TESIS DOCTORAL

Presentada por

M^a Pilar López Gresa

Dirigida por

Dr. Jaime Primo Millo

Dra. M^a del Carmen González Mas

Valencia, Noviembre de 2006

D. JAIME PRIMO MILLO, Catedrático del Departamento de Química de la Universidad Politécnica de Valencia, y

Dña. M^a DEL CARMEN GONZÁLEZ MAS, Dra. en Farmacia por la Universidad de Valencia,

CERTIFICAN: que la Tesis Doctoral titulada “**Aislamiento, purificación y caracterización estructural de nuevos principios bioactivos a partir de extractos fúngicos**” realizada por M^a Pilar López Gresa para optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas, ha sido realizada bajo su dirección y reúne los requisitos suficientes para su lectura y defensa.

Y para que así conste, firman este certificado en Valencia a 14 de julio de 2006

Fdo. Dr. Jaime Primo Millo

Fdo. Dra. M^a del Carmen González Mas.

Esta tesis doctoral constituye un trabajo en equipo donde han participado muchas personas, a ellas les manifiesto mi agradecimiento por su contribución y esfuerzo:

A mis directores Jaime Primo y M^a Carmen González, por darme la oportunidad de realizar mi tesis en el Centro de Ecología Química Agrícola y por transmitirme sus conocimientos y consejos durante todos estos años. Carmen, gracias por el tiempo pasado interpretando espectros, a ti te debo mis nociones en RMN. Jaime, gracias por tu química orgánica que tantas veces he necesitado.

A Ilde y Mónica por su colaboración en todos y cada uno de los ensayos de actividades biológicas. Gracias por vuestra disponibilidad y paciencia en todo momento. Os debo una!!!!

A Gema por su ingenio y gran ayuda en el laboratorio. También a María, Fernando y Úrsula por el cultivo de los hongos y a Pilar por proporcionarme las cepas.

A Estrella por todas las medidas realizadas de RMN durante este tiempo, siempre puntual y sonriente. Y no puedo olvidar a Ángel que responde siempre a mis llamadas de última hora.

A Sales por los espectros de masas, gracias por colarme!

A mis compañeros de laboratorio por soportarme durante estos años: Cristina, Sandra, Bea, Javi, Vicente, Juan, Aurora y José Luis que han hecho que las horas pasen sin darme cuenta. Juan, *portaré sempre amb mi el teu "quina amargor"*. A Núria por su indiscutible predisposición a ayudarme en todo y en cualquier momento.

A toda la gente del ITQ que siempre tiene lo que necesito, sobre todo a Raül, Antonio, Sandra, Rafa, Violeta, Raquel, Irene, Canijo, Sergio, Carmen, Pablo, Carles y Jose Cabeza por todos los grandes momentos disfrutados dentro y fuera del laboratorio. A M^a José Díaz, Urbano, Jose Gaona, Chusa y Fani, por guiarme en mis principios. En particular a Ana Primo por hacerme sentir especial, por hacerme reír, por sus planes y por mostrarme su apoyo durante estos años. A Maria, por su paciencia diaria y su amistad incondicional, gracias por estar siempre ahí.

A todo el personal del Istituto de Chimica Biomolecolare de Nápoles por hacerme sentir como en casa durante mis estancias allí: al Prof. Guido Cimino director del centro, Emiliano, Guido, Desiré, Cristina, Verónica, Cinzia, Franco, Margherita, Ernesto, Emilio, Raffaello y Dominique. Y en especial a Lety *per tutto quello che mi hai insegnato tanto di RMN come della vita, grazie per essere tanto vicina*.

Al Prof. William Fenical, director del Scripps Center of Oceanography, por hacerme un hueco en su laboratorio durante tres meses y permitirme conocer su forma de trabajo.

A mis padres y a Ángela por hacerme creer en mi misma y hacerme todo más fácil.

La presente Tesis Doctoral ha sido realizada con la ayuda de una beca predoctoral de formación de personal investigador (FPI) concedida por la Conselleria de Ciencia y Tecnología de la Comunidad Valenciana y con el soporte financiero de la Fundación José y Ana Royo, la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT) y la Conselleria de Agricultura, Pesca y Alimentación

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1. Productos Naturales	1
1. Un poco de historia	1
2. Fuentes de obtención de productos naturales	3
3. Principales rutas biosintéticas	4
4. Importantes productos naturales	5
4.1. En la industria farmacéutica	5
Cardiovasculares	5
Sistema nervioso central	6
Antiinfecciosos	7
Anticancerígenos	8
Hipolipemiantes	9
Inmunomoduladores	9
4.2. En la industria agroquímica	10
Primera generación de moléculas naturales insecticidas	10
Segunda generación de moléculas naturales insecticidas	11
IGRs (Reguladores del crecimiento de los insectos)	12
Semioquímicos: feromonas	14
Compuestos entomotóxicos de plantas	15
Insecticidas microbianos	17
2. Hongos: fuentes de metabolitos bioactivos	20
2.1. En la industria farmacéutica	22
2.2. En la industria agroquímica	23
3. Antecedentes bibliográficos del grupo	29
2. OBJETIVO Y PLAN DE TRABAJO	31
3. MATERIALES Y MÉTODOS	33
1. Cultivo del hongo y obtención del extracto fúngico	33
1.1. Medios de cultivo	33
1.2. Condiciones de cultivo	33
1.3. Extracción del caldo	33
2. Ensayos de actividad biológica	34
2.1. Actividad antioxidante	34
2.2. Actividad fungicida	35
2.3. Actividad bactericida	36
2.4. Actividad herbicida	36
2.5. Actividad insecticida	37
2.6. Actividad citostática	38
2.7. Actividad citotóxica	38

3. Técnicas de aislamiento: cromatografía	38
3.1. Cromatografía analítica de capa fina (CCF)	38
3.2. Cromatografía líquida de adsorción-desorción en columna abierta (CLC)	39
3.3. Cromatografía líquida de media presión	39
3.4. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	39
4. Técnicas de elucidación: espectrometría y espectroscopía	39
4.1. Espectrometría de masas de baja resolución (LC-MS)	39
4.2. Espectrometría de masas de alta resolución (HRMS)	39
4.3. Espectroscopía de infrarrojo (IR)	40
4.4. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)	40
5. Rotación óptica	40
4. RESULTADOS	41
1. <i>Aspergillus ochraceus</i> Wilhelm	41
1.1. Cultivo del hongo y obtención de los extractos	41
1.2. Actividades biológicas de los extractos	41
1.3. Estudio del extracto orgánico del caldo	41
1.4. Actividades biológicas de las fracciones	41
1.5. Aislamiento e identificación de los compuestos de las fracciones seleccionadas	42
1.5.1. Estudio de la fracción V	42
Identificación de stephacidin A	42
1.5.2. Estudio de la fracción IV	45
Identificación de circumdatin E	45
Identificación de circumdatin H	47
Identificación de flavacol	54
1.6. Actividades biológicas de los compuestos puros	56
2. <i>Penicillium cluniae</i> Quintanilla	58
2.1. Cultivo del hongo y obtención de los extractos	58
2.2. Actividades biológicas de los extractos	58
2.3. Estudio del extracto orgánico del caldo	58
2.4. Actividades biológicas de las fracciones	58
2.5. Aislamiento e identificación de los compuestos de las fracciones seleccionadas	59
2.5.1. Estudio de la fracción VII	59
Identificación de brefeldin A	59
2.5.2. Estudio de la fracciones IX y X	62
Identificación de DKPs: <i>ciclo</i> -(L-Pro-L-Tyr), <i>ciclo</i> -(L-Pro-L-Val), <i>ciclo</i> -(L-Pro-L-Ileu), <i>ciclo</i> -(L-Pro-L-Leu) y <i>ciclo</i> -(L-Pro-L-Phe)	62

Identificación de PHQs: VM55596, PHQ-A, PHQ-B, PHQ-E y VM55597	70
Identificación de PHQ-H	77
Identificación de PHQ-I	77
2.6. Actividades biológicas de los compuestos puros	86
2.6.1. Actividad citotóxica	86
2.6.2. Actividad insecticida frente a <i>O. fasciatus</i>	86
3. <i>Penicillium coalescens</i> Quintanilla (CECT 2764)	88
3.1. Cultivo del hongo y obtención de los extractos	88
3.2. Actividades biológicas de los extractos	88
3.3. Estudio del extracto orgánico del caldo	88
3.4. Actividades biológicas de las fracciones	88
3.5. Aislamiento e identificación de los compuestos de las fracciones seleccionadas	89
3.5.1. Estudio de la fracción III	89
Identificación de botryodiplodin	89
3.5.2. Estudio de la fracción I	92
Identificación de botryodioxinenona	92
Identificación etoxifenil-botryodiplodin	98
3.5.3. Estudio de la fracción IV	104
Identificación de terreusinona	104
3.6. Actividades biológicas de los compuestos puros	106
4. <i>Penicillium coalescens</i> Quintanilla (CECT 2766)	107
4.1. Cultivo del hongo y obtención de los extractos	107
4.2. Actividades biológicas de los extractos	107
4.3. Estudio del extracto orgánico del caldo	107
4.4. Actividades biológicas de las fracciones	108
4.5. Aislamiento e identificación de los compuestos de las fracciones seleccionadas	108
4.5.1. Estudio de la fracción IX	108
Identificación de botryodiplodin	108
4.5.2. Estudio de la fracción III	108
Identificación de botryodiplodinenona	109
4.5.3. Estudio de la fracción IV	115
Identificación de botryodioxindinenona	115
4.5.4. Estudio de la fracción VI	121
Identificación de 2-epi-botryodioxindinenona	121
Identificación del dímero de botryodiplodin	125
4.6. Actividades biológicas de los compuestos puros	128
4.6.1. Actividad insecticida frente a <i>O. fasciatus</i>	128

4.6.2. Actividad insecticida frente a <i>C.capitata</i>	129
4.6.3. Actividad fungicida	129
4.6.4. Actividad bactericida	129
5. CONCLUSIONES	131
6. BIBLIOGRAFÍA	133
7. ANEXO: PRODUCTOS NATURALES MARINOS	147
7.1. Introducción	148
1. Ecosistemas marinos	148
2. En busca de compuestos marinos activos	149
3. Metabolitos aislados de diferentes organismos	151
3.1. Cianobacterias	151
3.2. Actinomicetos marinos	152
3.3. Diatomeas	153
3.4. Dinoflagelados	153
3.5. Algas	155
3.6. Esponjas	155
3.7. Briozoos	156
3.8. Moluscos	157
3.9 Tunicados	158
4. El futuro	159
7.2. Resultados y discusión	161
A: Istituto de Chimica Biomolecolare (ICB)	161
A1. Cnidario colonial <i>Carijoa</i> sp	161
A2. Molusco sacogloso <i>Elysia expansa</i>	171
A3. Esponja <i>Dysidea</i> sp	180
A4. Esponjas del género <i>Gorgonia</i> y <i>Dysidea</i>	188
B. Scripps Institution of Oceanography (SIO)	190
B1. Actinomiceto CNR-872	190
B2. Actinomiceto CNQ-350	192
B3. Actinomiceto CNJ-900	193
7.3. CONCLUSIONES	195
A. Istituto de Chimica Biomolecolare (ICB)	195
B. Scripps Institution of Oceanography (SIO)	195
7.4. BIBLIOGRAFÍA	197
8. RESÚMENES	203
8.1. RESUMEN	203
8.2. RESUM	205
8.3. ABSTRACT	207

ABREVIATURAS UTILIZADAS

BFA	Brefeldin A
br (s)	Singulete deformado
CCF	Cromatografía en Capa Fina
CLC	Cromatografía Líquida en Columna abierta
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
CI ₅₀	Concentración inhibitoria 50
COSY 45	Correlación espectroscópica homonuclear ¹ H- ¹ H
d	Doblete
dt	Doble triplete
δ	Desplazamiento químico en RMN
DEPT	Distorsión por polarización de transferencia
DKPZs	Diketopiperazinas
EI	Impacto Electrónico
EIMS	Espectro de masas por impacto electrónico
EIHRMS	Espectro de masas de alta resolución por impacto electrónico
ES	Electro-spray
ESMS	Espectro de masas por electro-spray
ESHRMS	Espectro de masas de alta resolución por electro-spray
FAB	Bombardeo rápido de átomos
FABMS	Espectro de masas por bombardeo rápido de átomos
FABHRMS	Espectro de masas de alta resolución por bombardeo rápido de átomos
FM	Fórmula molecular
HMBC	Correlación heteronuclear ¹ H- ¹³ C a larga distancia
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HSQC	Correlación heteronuclear simple ¹ H- ¹³ C
IR	Infrarrojo
J	Constante de acoplamiento
λ _{max}	Longitud de onda máxima
LC-MS	Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectro de masas
M ⁺	Ión molecular
m	Multiplete
mult	Multiplicidad
m/z	Relación masa/carga
NCI	Instituto Nacional del Cáncer (EEUU)
NOESY	Efecto espectroscópico nuclear Overhauser
PDA	Photo Diode Array
PDA	Patata Dextosa Agar
PHQ	Paraherquamidas

p/p	Relación peso/peso
q	Cuadruplete
REA	Relación estructura química-actividad
R _f	Factor de retención
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
ROS	Especies de Oxígeno Reactivas
s	Singulete
t	Triplete
td	Triplete desdoblado
TMS	Tri-metil silano
TOF	Tiempo de Vuelo (Time of Fly)
Tr	Tiempo de Retención
UV	Ultravioleta
ν _{max}	Frecuencia máxima

INTRODUCCIÓN

[01]

1. Productos naturales

Desde siempre la naturaleza ha sido una fuente inagotable de compuestos activos que, desde un punto de vista farmacológico, se vienen utilizando con gran efectividad para combatir multitud de enfermedades. Tradicionalmente las plantas y, desde el descubrimiento de las penicilinas, los microorganismos de origen terrestre, fueron las primeras fuentes utilizadas por el ser humano para la curación de graves dolencias. Por otra parte, aunque los organismos marinos son más antiguos en el árbol de la evolución de las especies que las plantas y los animales terrestres, explorar el fondo de mares y océanos tiene, debido a su difícil accesibilidad, una historia más reciente.

En las dos últimas décadas se ha producido un renovado interés en el campo de los productos naturales. Ahora somos conscientes de la diversidad de estructuras químicas que proporciona la naturaleza, lo que ha estimulado la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos. Dichos compuestos constituyen herramientas útiles en el campo de la bioquímica y biología molecular para explorar con detalle la función celular. Con el desarrollo de la ecología química ha quedado patente el papel que desempeñan los productos naturales en las complejas relaciones de los organismos en un determinado ecosistema.

Así pues, la investigación en productos naturales es uno de los medios principales para descubrir compuestos bioactivos, ya sea para aplicaciones farmacéuticas o agroquímicas. Debido a que en ocasiones se desconoce la etiología de muchas patologías, resulta difícil diseñar moléculas potencialmente activas para su tratamiento, de ahí la necesidad de buscar compuestos cabeza de serie a partir de fuentes naturales. De esto puede darnos una idea el siguiente dato: los agentes terapéuticos de origen natural suponen más del 30% de las ventas mundiales. El resurgimiento experimentado por la investigación en este campo va paralelo al desarrollo y disponibilidad de una serie de nuevos bioensayos, por una parte, y de métodos más eficaces de aislamiento, separación, purificación y elucidación, por otra. La velocidad y facilidad con la que los productos naturales pueden ser aislados y caracterizados seguirá aumentando conforme lo haga la automatización de cada una de las etapas, desde el ensayo biológico hasta la determinación estructural¹.

1.1. Un poco de historia

El estudio de los productos naturales está ligado a su uso como fármacos y su origen en Occidente se sitúa en las civilizaciones asentadas en los valles del Nilo y del Eúfrates unos tres milenios antes de nuestra era. Los primeros textos sobre el uso de plantas medicinales proceden de las inscripciones sumerias del 2100 a. C., donde aparecen fármacos de origen animal, vegetal y mineral. Sobre el año 1550 a.C. se escribió la farmacopea egipcia: *Papiro*

Ebers, donde ya se mencionan unas setecientas sustancias utilizadas en distintas recetas médicas.

En cuanto al sistema médico oriental, es el pueblo chino quien ha cultivado un mayor número de plantas desde la antigüedad, siendo el *Peu-Tsao* la obra recapitulativa al respecto más antigua que se conoce, ya que data del 2800 a.C. Sin embargo, la obra más famosa de este género es *De Materia Médica*, compuesta a mediados del siglo I por Dioscórides y en la que se describen alrededor de 600 plantas medicinales clasificándolas según su acción fisiológica.

Mención especial merece Claudio Galeno (129-200), el más famoso médico de la antigüedad después de Hipócrates, quien recopiló una serie de veinte volúmenes con información valiosa de plantas medicinales y su uso terapéutico, dando su nombre a todo un sistema de medicina.

Durante la Edad Media (siglos V-XV), los intercambios culturales entre distintas civilizaciones permitieron extender conocimientos entre Europa y Oriente Medio. Precisamente entre los siglos VII y XI los árabes y el mundo islámico en general influyeron notablemente en el uso de plantas medicinales, creando las primeras boticas. Entre los médicos más famosos de esta época cabe destacar a Avicena y Averroes.

Ya en el siglo XV comenzaron las grandes expediciones de los viajeros naturalistas, que se adentraron en las selvas vírgenes dando a conocer su flora y tradiciones curativas. De esta forma muchas drogas conocidas y utilizadas por los indígenas llegaron a Europa¹.

Posteriormente, Paracelso (1493-1541), médico y filósofo suizo, muy influenciado por la aparición de la imprenta y el descubrimiento de América, puso en duda toda la tradición médica medieval, haciendo quemar las obras de Galeno y Avicena. Además introdujo un gran número de sustancias inorgánicas en la terapéutica y entrevió el concepto de principio activo, denominándolo "quinta esencia".

En el siglo XVIII Linneo introdujo la descripción y sistemática del reino animal, vegetal y mineral. Su influencia en la taxonomía moderna es enorme dado que todavía en nuestros días se sigue usando, aunque con muchos cambios, su sistema para nombrar, ordenar y clasificar los organismos vivos.

En el siglo XIX, el farmacéutico alemán Sertürner llevó a cabo el aislamiento, a partir del opio, del que se considera el primer principio activo conocido, la morfina. A partir de este descubrimiento, distintos investigadores comenzaron a aislar numerosos alcaloides, como la emetina a partir de la Ipecacuana, la quinina de la corteza de Quina o la cafeína del café. Estos éxitos llevaron además al descubrimiento de los heterósidos, entre los que pueden señalarse la digitalina, obtenida por Nativelle, y la digitoxina por Schmiedeberg. Durante este siglo la química y la medicina se desarrollaron paralelamente, lo que supuso un claro avance tanto en el conocimiento de los compuestos orgánicos como en las etiologías de las enfermedades.

El progreso en la incorporación de nuevos fármacos de origen natural se aceleró notablemente durante el siglo XX, siendo el descubrimiento de la penicilina en 1928 una revolución mundial. El hecho de que la penicilina fuese aislada a partir de un hongo (*Penicillium*

notatum) hizo que los investigadores se dieran cuenta de la importancia de los microorganismos como una fuente todavía no explotada de metabolitos secundarios con aplicaciones médicas.

Lógicamente, en nuestros días una parte muy importante de la investigación en el campo de los productos naturales se basa en el descubrimiento de nuevos fármacos con actividad terapéutica, pero actualmente la industria agroquímica también realiza una gran labor investigadora en el estudio de nuevos agroquímicos de origen natural. Aunque es difícil saber con exactitud dónde y en qué momento empezaron a utilizarse de forma sistemática productos naturales en la agricultura, es conocido que desde la antigüedad, los griegos y los romanos utilizaron, junto al azufre y el arsénico, plantas o extractos de plantas (*Veratum* sp., *Taxus baccata*, *Azadirachta indica* entre otras) como insecticidas. A partir del siglo XIX, con la identificación de algunos compuestos de origen vegetal como la nicotina se inició el desarrollo industrial de los plaguicidas a partir de productos naturales.

Actualmente, la búsqueda cada vez más intensa de nuevas sustancias bioactivas incita a los científicos no sólo a sintetizar miles de nuevos compuestos, sino a estudiar también con más profundidad las sustancias que nos ofrece la naturaleza. El ritmo del descubrimiento de productos naturales ha ido en aumento durante los últimos cien años, siendo las plantas, los hongos y las bacterias las mayores fuentes de obtención. La mayoría posee alguna actividad biológica ya que su aislamiento suele ser dirigido por el bioensayo. Se estima que sólo un bajo porcentaje de las especies existentes han sido estudiadas, entre las cuales la cantidad de productos naturales identificados está muy por debajo del total producido por éstas. Así pues, hay grandes perspectivas en el aislamiento de nuevos principios activos con posibles aplicaciones no sólo en la industria farmacéutica sino también en la agroquímica².

1.2. Fuentes de obtención de productos naturales

Aunque el término “productos naturales” debe tomarse en sentido amplio, es decir, compuestos que se originan en la naturaleza, este término se reserva fundamentalmente a los metabolitos secundarios, cuya función en el organismo no es del todo bien conocida y no son esenciales en su desarrollo³. Los seres vivos poseen además otros constituyentes, los llamados principios inmediatos (glúcidos, lípidos, aminoácidos y ácidos nucleicos) procedentes del metabolismo primario e indispensables para su vida.

Existen diferentes fuentes de obtención de productos naturales. La de mayor importancia corresponde al mundo biológico terrestre: el reino animal, vegetal, hongos, algas, protozoos y bacterias. Otra fuente importante de obtención de compuestos naturales es el mundo marino que debido a su riqueza en distintos organismos biológicos se está investigando profundamente en la actualidad.

1.3. Principales rutas biosintéticas

El metabolismo secundario se basa en moléculas provenientes del metabolismo primario, así que la interconexión entre ambos es inevitable⁴. La mayoría de los metabolitos secundarios derivan del acetil-CoA, del ácido sikímico o del ácido mevalónico que constituyen las tres principales rutas sintéticas (Fig 1).

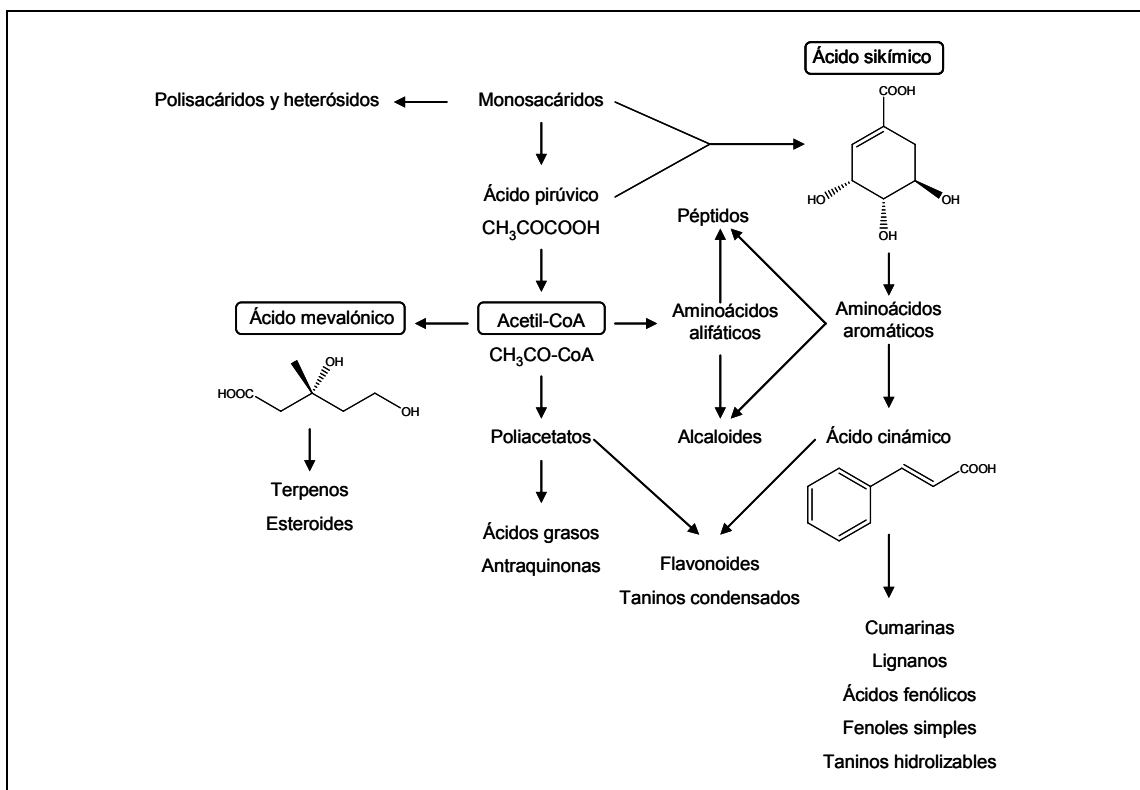


Fig 1. Principales rutas biosintéticas

El grupo acetato del acetil-CoA da lugar por condensación a los poliacetatos que, a su vez, originan ácidos grasos por reducción y antraquinonas por ciclación. El sikimato, derivado de los carbohidratos, es el compuesto clave para la formación de compuestos aromáticos como cumarinas, lignanos, ácidos fenólicos, fenoles simples, taninos hidrolizables o aminoácidos aromáticos que son los precursores directos de los alcaloides. El mevalonato, formado a partir de tres moléculas de acetil-CoA, da lugar al grupo de los terpenos y esteroides. Hay grupos de metabolitos que tienen biogénesis mixtas, es decir, en su síntesis se combinan elementos de diferentes rutas. Así por ejemplo, los flavonoides derivan de la combinación de derivados del sikimato y del acetato en la forma $\text{C}_6\text{-C}_3 + (\text{C}_2)_n$, donde n es generalmente 3. Esto incrementa la diversidad estructural y hace que las subdivisiones basadas únicamente en las rutas biosintéticas sean más difíciles. Por otra parte hay que tener en cuenta que muchos metabolitos secundarios contienen también una o más unidades de azúcar en su estructura formando heterósidos. Para saber cómo se ha biosintetizado un producto natural hay que

reconocer cuáles son sus rasgos estructurales característicos y de esta forma poder establecer la relación con una determinada ruta¹.

1.4. Importantes productos naturales

1.4.1. En la industria farmacéutica

Compuestos tales como la quinina, teofilina, penicilina G, morfina, digoxina, vincristina, taxol, ciclosporina o vitamina A, tienen dos características comunes, son fármacos y son productos naturales. Aunque el uso de productos provenientes de plantas y animales para el control de enfermedades se conoce desde la antigüedad, las bases bioquímicas y moleculares de su acción terapéutica comienzan a estudiarse a principios del siglo XIX, cuando se descubren un importante número de productos naturales farmacológicamente activos como los heterósidos cardiotónicos y una variedad de alcaloides bioactivos (la morfina, la atropina y la reserpina). Algunos de estos compuestos son importantes no sólo por su uso directo como agentes terapéuticos o como prototipo en el desarrollo de nuevos medicamentos, sino también como sondas bioquímicas para el estudio de la farmacología humana⁵. Así pues, los productos naturales constituyen la mayor fuente de obtención de principios activos con aplicaciones terapéuticas⁶. Su rica diversidad estructural ha inducido a estudiar su síntesis, de tal manera que un gran porcentaje de fármacos usados en la actualidad son productos naturales o derivados sintéticos de éstos⁷. A continuación se describen algunos compuestos de origen natural muy importantes desde el punto de vista farmacológico.

Cardiovasculares

Los efectos beneficiosos de los extractos de *Digitalis purpurea* y *D. lanata* fueron reconocidos mucho antes que sus constituyentes activos, los heterósidos cardiotónicos (la digoxina y la digitoxina, entre otros) fueran aislados y caracterizados estructuralmente. Estas moléculas ejercen un efecto isótopo positivo sobre el músculo cardíaco, aumentando la contractilidad intrínseca de la fibra muscular⁸.

Además de estos glucósidos cardíacos, un elevado número de alcaloides naturales son importantes drogas en el control cardiovascular. Por ejemplo, la quinidina, aislada de la corteza del quino o árbol de la quina, *Cinchona* spp, es un importante antiaritmico y representa uno de los más conocidos ejemplos de la importancia de la quiralidad en la acción de una droga: su diastereoisómero, quinina, no tiene actividad cardíaca sino antimalárica. Otros alcaloides importantes en este ámbito son la reserpina, un conocido agente antihipertensivo, y la papaverina, un vasodilatador periférico. La ergotamina, un alcaloide aislado del hongo *Claviceps purpurea*, parásito del cornezuelo del centeno, es un importante vasoconstrictor a nivel central que se usa terapéuticamente para el tratamiento de las migrañas.

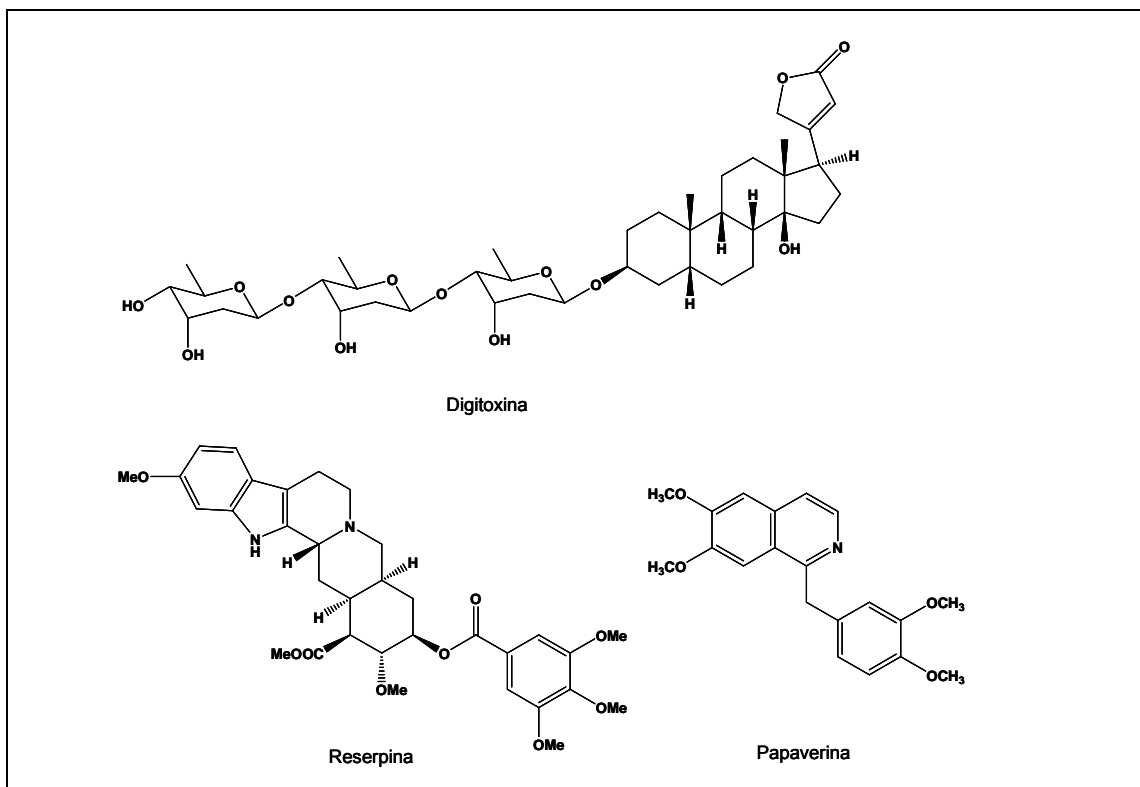


Fig 2. Productos naturales que actúan a nivel cardiovascular

Sistema nervioso central

Uno de los compuestos de origen natural más importantes a nivel del sistema nervioso central es el bloqueante neuromuscular tubocurarina, principal componente activo del curare que es el extracto de la corteza y el tallo de *Chondrodendron tomentosum*. Además, los anestésicos locales de síntesis como lidocaína, benzocaína y dibucaína fueron sintetizados mimetizando la actividad bloqueante de la cocaína, un alcaloide natural que se obtiene de las hojas de *Coca eroxylum*. Los alcaloides opiáceos, codeína y morfina, sirvieron como modelo para la síntesis de naloxona, un importante análogo que mantiene el efecto analgésico (supresor del dolor) reduciendo los efectos de adicción.

Recientemente, el hecho de que algunas enfermedades del sistema nervioso central y periférico, como la enfermedad de Alzheimer o de Parkinson, puedan ser controladas por agonistas de los receptores colinérgicos nicotínicos ha abierto una nueva área de investigación basada en la molécula de nicotina. Fisostigmina, un alcaloide natural y su éster carbamato, neostigmina, son importantes inhibidores de las colinesterasas, que actúan como parasimpático-miméticos siendo útiles en el tratamiento de la miastenia.

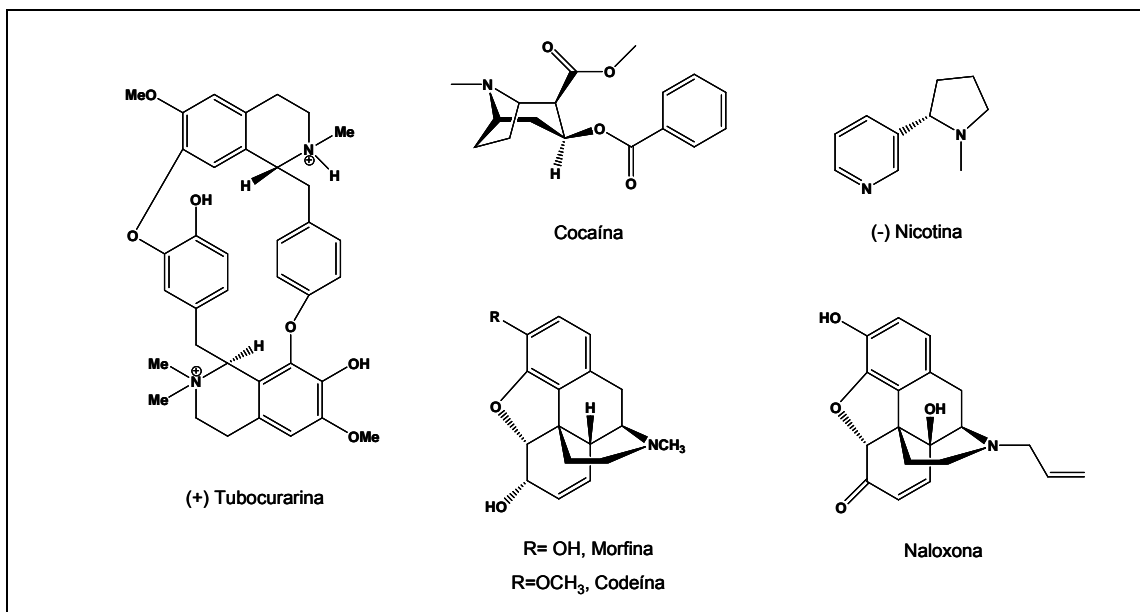


Fig 3. Productos naturales que actúan a nivel del sistema nervioso central

Antiinfecciosos

Los antibióticos forman parte de los fármacos más importantes que se han descubierto, proporcionándonos una mayor esperanza y calidad de vida. El descubrimiento de la penicilina por Fleming en 1928, como metabolito secundario del hongo *Penicillium notatum*, estimuló la búsqueda de otros antibióticos, como la estreptomina, el cloranfenicol, la cefalosporina, la eritromicina y la vancomicina⁹, a partir de distintos microorganismos.

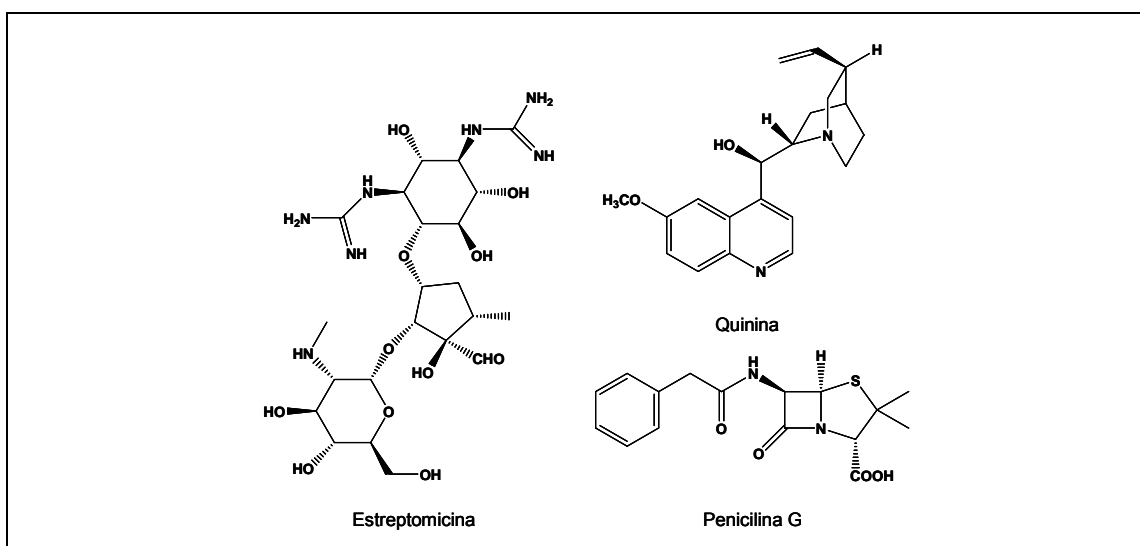


Fig 4. Productos naturales que actúan como antiinfecciosos

También la quinina es un importante antimalárico aislado de la corteza de *Cinchona*, así como la artemisinina, principio activo de *Artemisia annua*. Otra importante clase de

antiinfecciosos de origen natural son las avermectinas, macrólidos derivados de la ruta de los poliacetatos, aislados a partir de varias especies de *Streptomyces*, que se usan para el tratamiento y control de nematodos y parásitos en el ganado.

Anticancerígenos

Otra importante área terapéutica donde los productos naturales han tenido una gran aplicación ha sido en la quimioterapia del cáncer. La bleomicina, la doxorubicina, la daunorubicina, la vincristina, la vinblastina, la mitomicina, el paclitaxel, la camptotecina y la podofilotoxina son importantes ejemplos de compuestos anticancerígenos descubiertos tras un screening para identificar, usando ensayos de inhibición celular, principios bioactivos frente a una batería de representativas líneas celulares¹⁰. Así, los laboratorios Lilly aislaron y desarrollaron a partir de *Catharanthus roseus* la vinblastina y la vincristina, dos alcaloides dímeros indólicos con actividad antimitótica y en 1993 el *National Cancer Institute* introdujo el taxol[®] (paclitaxel) como nuevo anticancerígeno. Éste último se extrajo inicialmente, con muy bajos rendimientos, de la corteza del tejo del Pacífico, *Taxus brevifolia*, originario de Norteamérica.

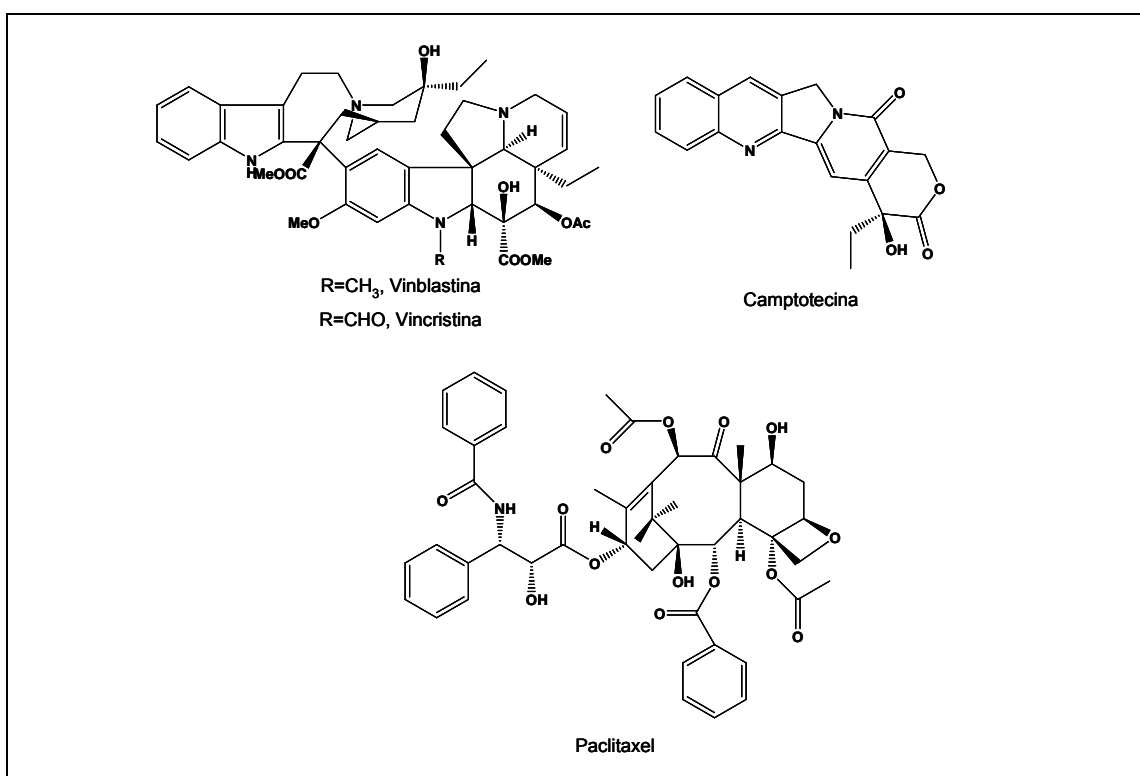


Fig 5. Productos naturales que actúan como anticancerígenos

Hipolipemiantes

La mayoría de los productos naturales descubiertos en los últimos años para disminuir los niveles de colesterol derivan de los hongos y actúan inhibiendo una enzima crítica en la biosíntesis del colesterol. Ejemplos importantes son el compactin, aislado a partir de *Penicillium brevicompactum* y el lovastatin, a partir de *Aspergillus terreus*.

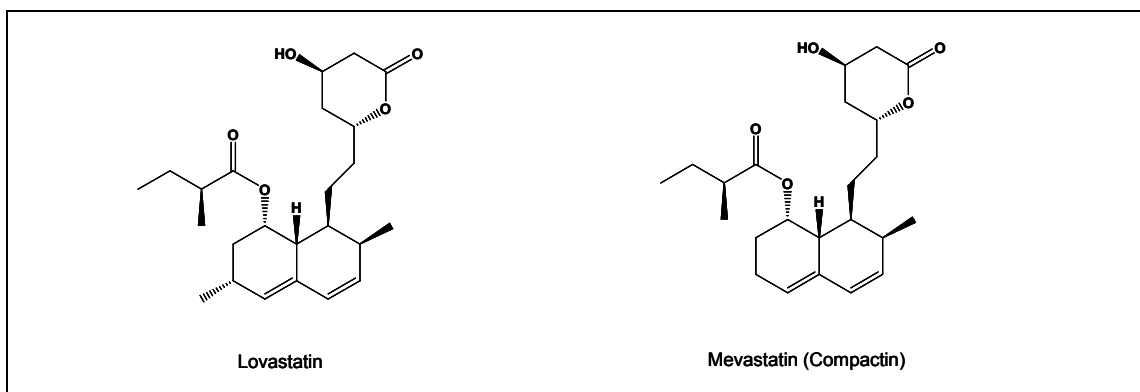


Fig 6. Productos naturales que actúan como hipolipemiantes

Inmunomoduladores

El inmunomodulador ciclosporina A fue aislado a partir del hongo terrestre *Trichoderma polysporum* y supuso un gran avance en el transplante de órganos. Recientemente, el tacrolimus, un metabolito secundario de *Streptomyces tsukabaensis*, fue aprobado en 1994 para su uso como fármaco inmunosupresivo.

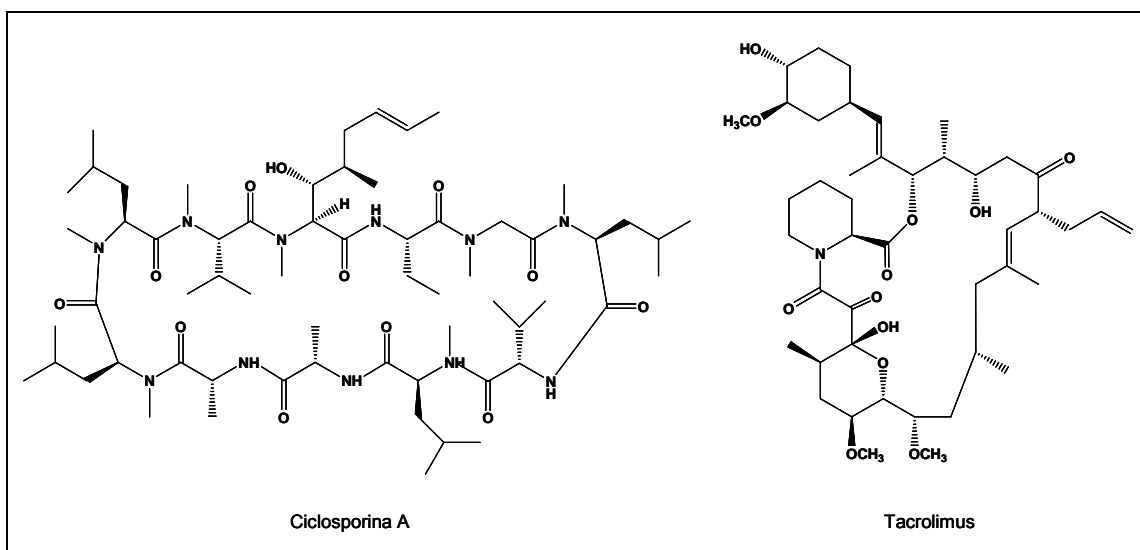


Fig 7. Productos naturales que actúan como inmunosupresores

1.4.2. En la industria agroquímica

Algunos insectos, malas hierbas y hongos fitopatógenos causan grandes daños en la agricultura. Si no se controlasen, se estima que un 40% de los cultivos podría perderse durante la cosecha y un 20% más durante la post-cosecha. El aumento en la productividad agrícola durante la segunda mitad del siglo pasado se ha debido en su mayor parte al control de estos insectos mediante plaguicidas químicos, más que al uso de principios activos o de extractos procedentes de fuentes naturales¹¹. Sin embargo pronto se comprobó que los insecticidas sintéticos de amplio espectro llevaban asociados una serie de problemas como la persistencia en el medio, la bioacumulación en los tejidos animales, la resistencia desarrollada por los insectos, la toxicidad para el hombre y los desequilibrios ecológicos que conlleva la eliminación de una plaga en un determinado ecosistema, provocando una disminución de la fauna auxiliar y una proliferación de las especies que compiten con ella. De acuerdo con esto, se ha producido un aumento de la presión social y legislativa para sustituir o reducir el uso de plaguicidas químicos convencionales. Así, actualmente hay un enorme interés por identificar nuevos compuestos agroquímicos de origen natural que puedan sustituir a estos plaguicidas químicos convencionales.

Primera generación de moléculas naturales insecticidas

Los primeros plaguicidas eran aceites, compuestos inorgánicos y productos como la nicotina, la rotenona y las piretrinas, obtenidos a partir de plantas de uso tradicional¹².

La nicotina es un alcaloide que se obtiene de las especies *Nicotina tabacum* y *Nicotina rustica* y que a pesar de ser bastante tóxica para los mamíferos, en las formulaciones empleadas no resulta peligrosa. Solamente la nicotina natural, levógira, presenta propiedades insecticidas actuando como veneno cardíaco y neurotrópico. Su volatilidad hace que sea un excelente insecticida por inhalación, pero su estabilización en forma de sal la transforma en un insecticida más activo por ingestión. Dos derivados de la nicotina, la anabasina aislada a partir de *Anaassis aphylla* y la normicotina obtenida de la planta australiana *Duboisia howoodii*, también se usan como plaguicidas de origen vegetal. Otros alcaloides neurotóxicos pero mucho menos utilizados que la nicotina son la veratrina (*Veratrum album*) y la rianodina (*Ryania* sp.)¹².

La rotenona y sus análogos, que se encuentran en plantas del género *Derris*, *Amorpha* y *Tephrosia* (Leguminosae), son isoflavonoides que no sólo actúan sobre el sistema nervioso del insecto sino también sobre los mecanismos de la respiración celular (inhiben la cadena respiratoria mitocondrial). Son prácticamente inofensivos para los animales de sangre caliente y, por el contrario, muy activos sobre los animales de sangre fría: batracios, peces y reptiles¹³.

De las flores del pelitre o *Chrysanthemum (Pyrethrum)* sp. se obtiene un insecticida conocido como piretrina. La sustancia activa se denomina piretro y es una mezcla de seis ésteres terpenoides (piretrina I y II, cinerina I y II y jasmolina I y II) del ácido crisantemúmico

con la piretrolona, un alcohol derivado de la ciclopentanona. Actúa alterando la conducción nerviosa por ralentización del cierre de los canales de Na^+ durante la fase de reconstitución del potencial de acción de las neuronas. En consecuencia, el insecto presenta hiperactividad y convulsiones. Sin embargo, su fotolabilidad motivó, muy pronto, la búsqueda de derivados más estables: los piretroides de síntesis que constituyen actualmente una herramienta fundamental en la defensa fitosanitaria¹².

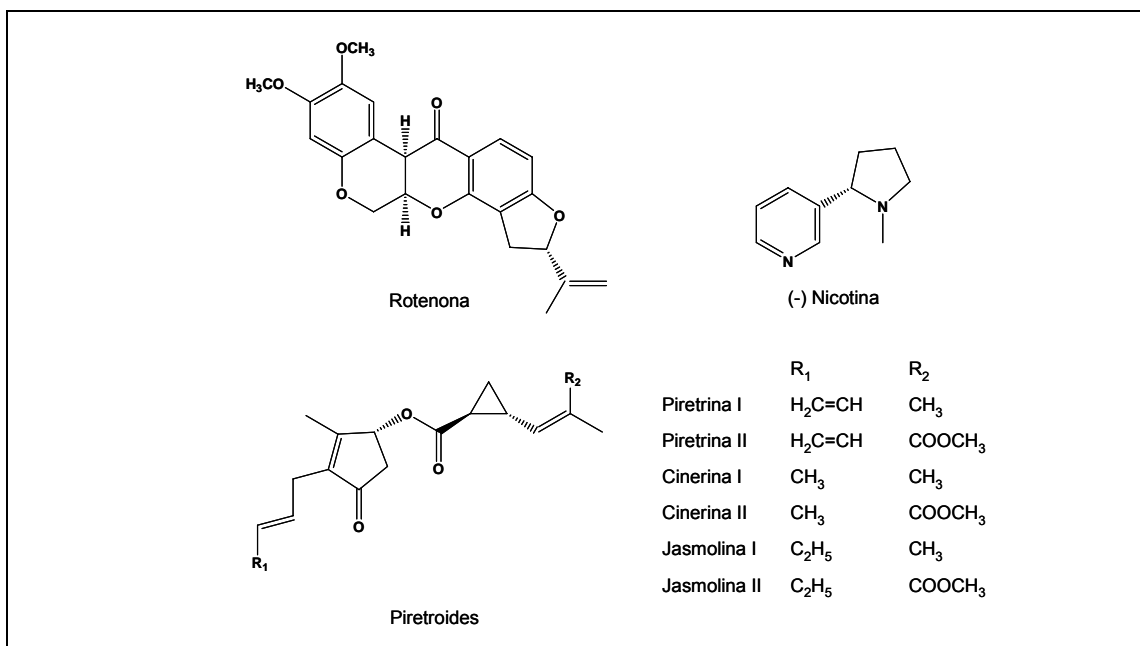


Fig 8. Primera generación de moléculas naturales insecticidas

Por último, los aceites se han utilizado desde la antigüedad, en forma de emulsiones, en la lucha contra insectos. Según su origen y composición química, se distinguen los aceites vegetales, animales y minerales derivados del petróleo o de la hulla, siendo estos últimos los más usados actualmente. Engloban una gran heterogeneidad de ácidos grasos, saturados e insaturados, con cadenas carbonadas medias o largas, esterificados, etc., así como un gran porcentaje de terpenos volátiles. Sus propiedades insecticidas varían según su viscosidad, volatilidad, tensión superficial y composición química, aunque su acción como insecticidas se debe fundamentalmente a su poder de penetración en las tráqueas de los insectos produciendo su asfixia¹⁴.

Segunda generación de moléculas naturales insecticidas

Los productos fitosanitarios de origen natural de la primera generación fueron sustituidos a mediados del siglo XX por los insecticidas de síntesis (organoclorados (DDT), organofosforados y carbamatos). Pero el uso indiscriminado de los plaguicidas sintéticos ha generado una serie de graves problemas ambientales y de toxicidad¹⁵. En respuesta a estos inconvenientes provocados por la lucha química como único sistema de control de plagas,

surge en los años sesenta una nueva disciplina denominada Ecología Química que comprende el estudio de la estructura, función, origen e importancia de los compuestos naturales que regulan las interacciones entre organismos en su medio ambiente. Los descubrimientos logrados por la investigación en diversos campos de la biología de los insectos han estimulado la búsqueda de nuevos métodos con el fin de lograr técnicas que permitan el control de plagas, sin tener que recurrir a productos tóxicos que dañen el ecosistema. Algunos de estos nuevos sistemas, unos todavía en vías de experimentación y otros ya incorporados en las prácticas de control, se mencionan a continuación:

1 IGR (Reguladores del crecimiento de los insectos)

Son productos capaces de interferir en la regulación hormonal de los procesos de muda y metamorfosis del insecto. Entre los IGR caben destacar: los análogos y antagonistas de la hormona juvenil (HJ), análogos de la hormona de la muda e inhibidores de la formación de la cutícula^{16,17}.

- Análogos de la hormona juvenil: inducen efectos biológicos idénticos a las propias hormonas juveniles naturales, en particular inhiben la metamorfosis y son secundariamente letales¹⁷. Son efectivos sólo en determinados momentos del desarrollo de los insectos e inocuos frente a animales superiores¹⁸. Sustancias de este tipo que han alcanzado la comercialización son el metopreno, el kinopreno y el fenoxicarb¹⁹ (Fig 9).

- Antagonistas de la hormona juvenil: impiden el desarrollo de los estadios larvarios del insecto y la reproducción de los adultos, ya que la hormona juvenil además de intervenir en el desarrollo larvario participa en otros procesos del insecto adulto²⁰. Con esta idea se empezó la búsqueda de inhibidores de la biosíntesis, secreción y transporte de HJ, así como de inhibidores de los receptores específicos de HJ. Como resultado, Bowers y su equipo descubrieron en 1976 los precocenos, cromenos naturales aislados a partir del género *Ageratum*²¹. A partir de estas estructuras se han sintetizado diversos análogos que han mostrado también actividad insecticida²². En 1997 se obtuvo el primer compuesto inhibidor de la biosíntesis de la HJ de origen fúngico, la brevioxima, aislado a partir del extracto de *Penicillium breviocompactum*²³. Hasta ahora no se ha encontrado ningún antijuvenoide que tenga aplicación práctica, bien porque son inestables o sólo son activos *in vitro* o actúan en un margen estrecho de concentraciones (Fig 9).

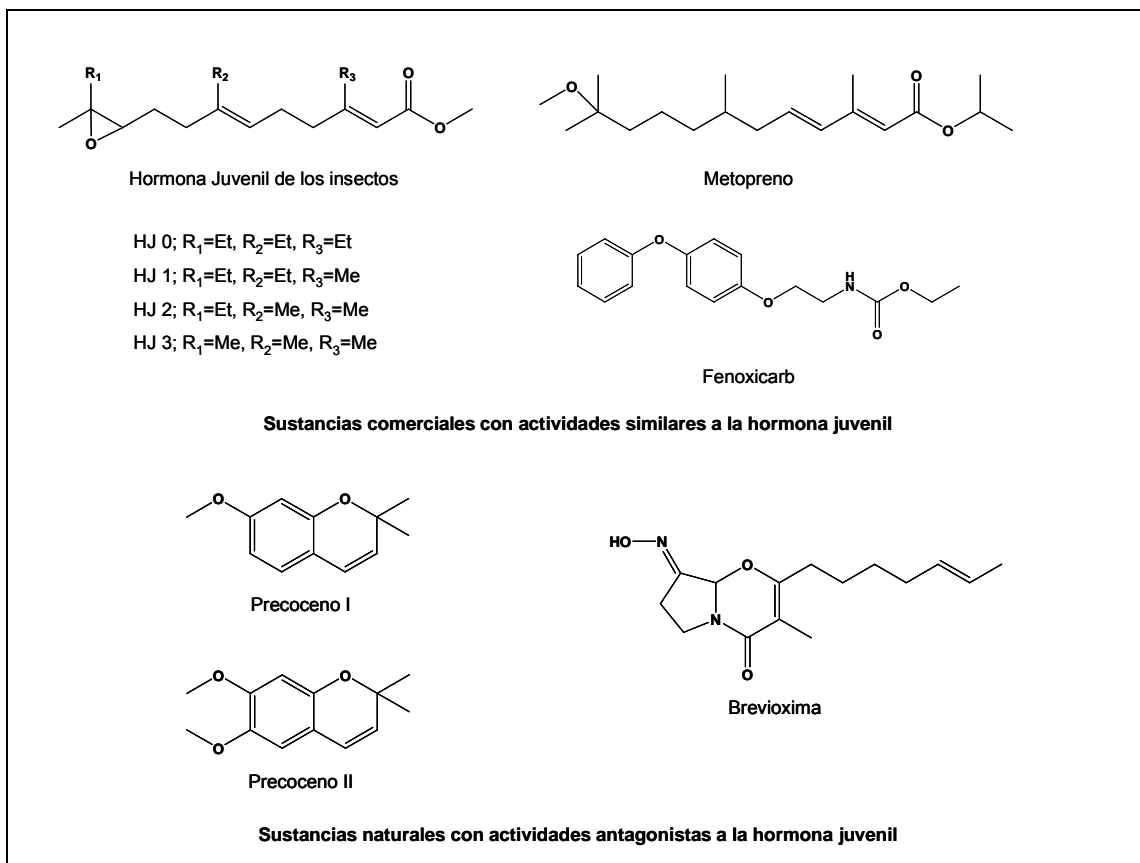


Fig 9. Moléculas con actividad agonista y antagonista de la hormona juvenil

- Análogos de la hormona de la muda: en los insectos, la muda está controlada por hormonas con estructuras de esteroides polihidroxiados con una cetona α,β -insaturada en el anillo B, denominadas ecdisteroides, siendo particularmente importante la 20-hidroxiecdisona (hormona de la muda). Sin embargo, los ecdisteroides no son exclusivos de insectos, ya que en extractos de plantas se han encontrado estructuras idénticas o similares (fitoecdisteroides) con la misma acción²⁴. No obstante, son los análogos sintéticos los que han resultado ser más interesantes desde un punto de vista comercial. Entre estos compuestos, con esqueleto diacilhidracina, se encuentran la tebufenocida, la halofenocida y la metoxifenocida²⁵.

- Inhibidores de la formación de la cutícula: impiden la formación del exoesqueleto en el insecto inhibiendo la síntesis de quitina. Los compuestos más importantes de este grupo son las benzilfenilureas, destacando entre ellas el diflubenzurón²⁶ y el lufenurón²⁷. La plumbagina, extraída de las raíces de *Plumbago capensis*, también actúa como insecticida a este nivel²⁸.

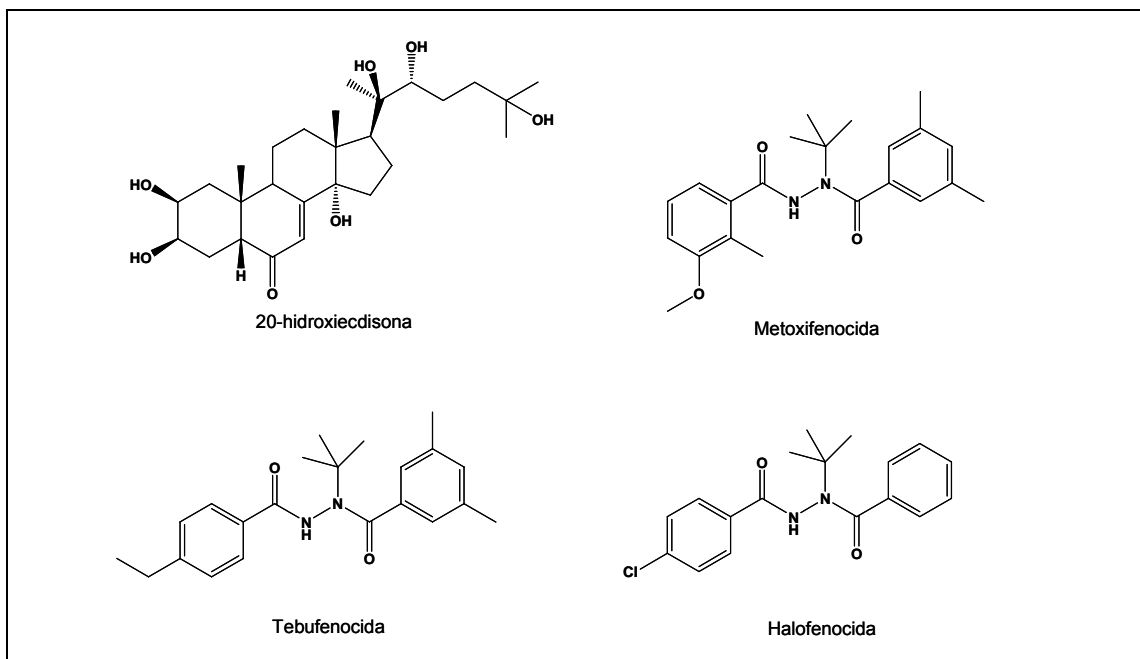


Fig 10. Estructura química de la hormona de la muda y de alguno de sus análogos

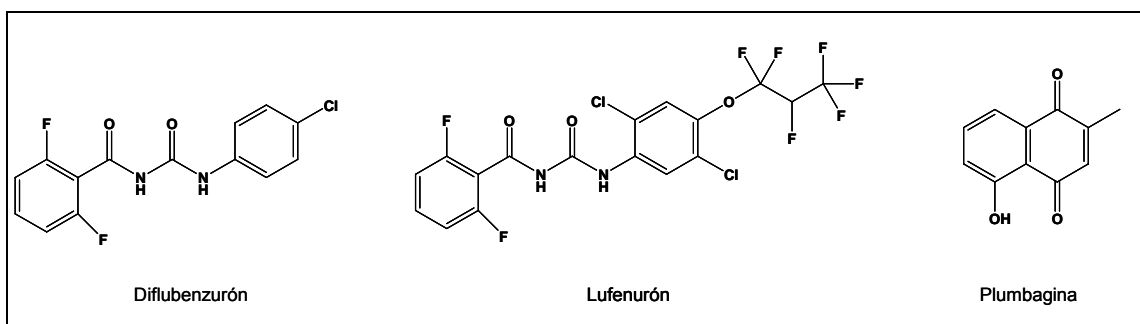


Fig 11. Inhibidores de la formación de la cutícula

2 Semioquímicos: feromonas

Se conocen como semioquímicos los compuestos químicos responsables de la comunicación entre organismos, es decir, las moléculas encargadas de llevar mensajes entre miembros de la misma especie, feromonas, o diferente especie, alomonas (benefician al emisor) y kairomonas (benefician al receptor), modificando su comportamiento.

Las feromonas son sustancias químicas que emitidas por un organismo provocan una reacción específica de comportamiento en otros miembros de la misma especie²⁹. Estas moléculas, en general, suelen tener estructuras sencillas, constituidas normalmente por una cadena lineal de un número par de átomos de carbonos (entre 10 y 18), con dos o tres dobles enlaces y con un grupo funcional en el extremo. La especificidad de la señal se logra variando estos elementos: longitud de la cadena, grupo funcional, número de dobles enlaces, posición y geometría E o Z de los mismos así como la estereoquímica de los centros quirales en el caso

de que la feromona se trate de una molécula quiral. Un factor crítico con respecto a la especificidad es que, a diferencia de lo que se creía inicialmente, en muchos casos la feromona consiste en una mezcla de varios componentes en una proporción determinada y no en un único compuesto.

Las feromonas más importantes son las feromonas sexuales que son las más usadas hasta el momento para la lucha contra plagas. Éstas tienen la función de atraer, retener e inducir a la cópula y normalmente son segregadas por la hembra. Se utilizan como atrayentes para la captura de insectos o para lograr una confusión sexual disminuyendo así la población de la plaga^{1,29}. Las ventajas que presentan las feromonas sobre otros métodos de control radican en su especificidad y no toxicidad, lo que ha estimulado su estudio en los últimos años.

Las alomonas son aquellas señales químicas que, interviniendo en las relaciones entre especies diferentes, benefician al emisor; por ejemplo, las esencias florales que atraen a los polinizadores o las secreciones defensivas³⁰. En el siguiente apartado se revisan más detenidamente los compuestos con actividad insecticida obtenidos a partir de plantas.

3 Compuestos entomotóxicos de plantas

Hoy en día se conocen alrededor de 2000 plantas que contienen compuestos tóxicos para los insectos y la mayor parte no están estudiadas. Además de compuestos insecticidas, a partir de las plantas se han obtenido metabolitos secundarios que pueden ocasionar perturbaciones en el sistema endocrino de los insectos³¹, que pueden actuar como estimulantes o inhibidores de la alimentación^{32,33} y de la oviposición³⁴, así como atrayentes³⁵ o repelentes³⁶.

Tras el estudio de la primera generación de moléculas naturales como insecticidas, una estrategia íntegramente química busca modificar las moléculas de origen vegetal para crear compuestos más activos¹⁵. Estos compuestos de semisíntesis se han comercializado más rápidamente que las moléculas identificadas y extraídas de los vegetales. Así por ejemplo, desde la identificación química de las piretrinas se han patentado y puesto en el mercado muchos análogos sintéticos que poseen mayor estabilidad, toxicidad, selectividad y eficacia que los insecticidas naturales, a los que han ido reemplazando gradualmente. La permetrina, la cipermetrina, la ciflutrina y el fenvalerato entre otros, hoy tienen un empleo importante en el mercado agroquímico³⁷.

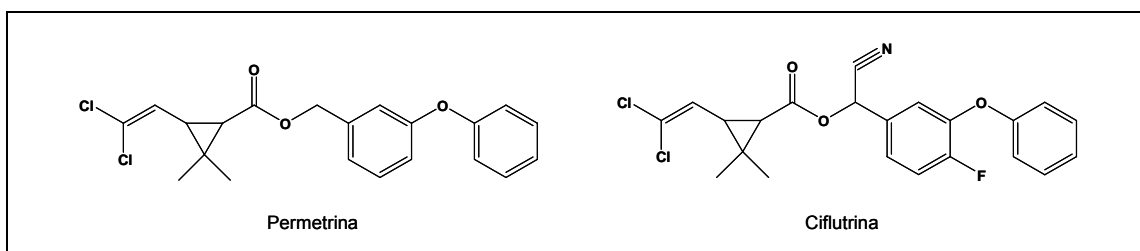


Fig 12. Estructura de algunos análogos sintéticos de las piretrinas

La búsqueda de nuevas moléculas de origen vegetal ha provocado el estudio más exhaustivo de algunas familias botánicas. De la familia Meliaceae destacan las especies *Azadirachta indica*, más conocida por árbol de Neem, originario de India, y *Melia azedarach* o árbol de Neem chino, utilizado tradicionalmente para el control de plagas y enfermedades en China³⁸. Éstas y otras especies pertenecientes a esta familia poseen una clase de terpenoides, los limonoides, que presentan un amplio rango de acción frente a un gran número de especies de insectos³⁹. Entre sus componentes activos, destaca la azadiractina, un triterpeno disuasorio de la alimentación⁴⁰ y potente inhibidor del crecimiento y reproducción de los insectos⁴¹. Recientemente, a partir de varias especies del género *Aglaia* (Meliaceae) se han obtenido una serie de compuestos llamados rocaglamidas, con actividad similar a la azadiractina, aunque estructuralmente más sencillas⁴².

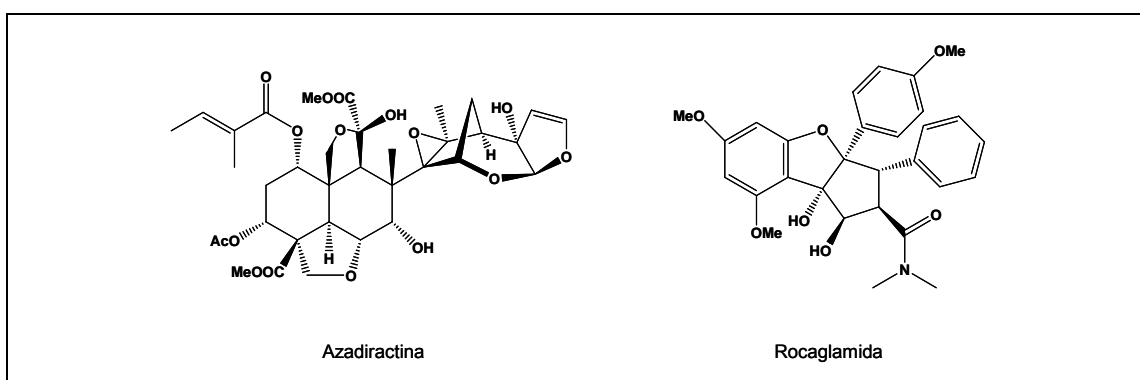


Fig 13. Estructuras de moléculas con actividad insecticida aisladas a partir de la Familia Meliaceae

La familia Lamiaceae destaca por su actividad disuasoria de la alimentación, siendo los compuestos causantes de esta actividad terpenos volátiles. Destacan los géneros *Mentha*⁴³ y *Ocimum*⁴⁴, utilizados durante mucho tiempo como insecticidas domésticos. También a partir de la familia Myrtaceae se aislaron del género *Leptospermum* una serie de compuestos con esqueleto tricetónico como el aceite esencial leptospermona⁴⁵ y del género *Eucalyptus* el terpeno 1,4-cineol, que han dado lugar a análogos sintéticos comerciales con actividad herbicida tales como la sulcotriona y la cinmetilina respectivamente⁴⁶.

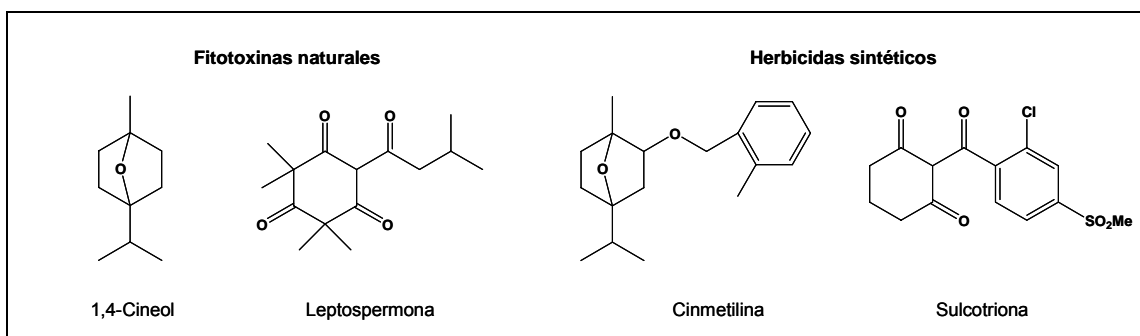


Fig 14. Análogos comerciales de fitotoxinas con actividad herbicida

Otras familias, como Rutaceae y Compositae, constituyen una variada fuente de isobutilamidas de ácidos insaturados de 10 a 18 átomos de carbono con actividad insecticida. La mayoría de estos compuestos han podido ser identificados y, en algunos casos, sintetizados⁴⁷. En la familia Compositae destacan los géneros *Artemisia*, *Imula* y *Ageratum*, especialmente la especie *Ageratum houstonianum* Millar, importante por contener los precocenos, antagonistas de la HJ²¹. Poseen una gran variedad de compuestos: sesquiterpenos, poliacetilenos, cromenos, flavonoides y alcaloides que actúan como antialimentarios, tóxicos y reguladores del crecimiento de los insectos⁴⁸.

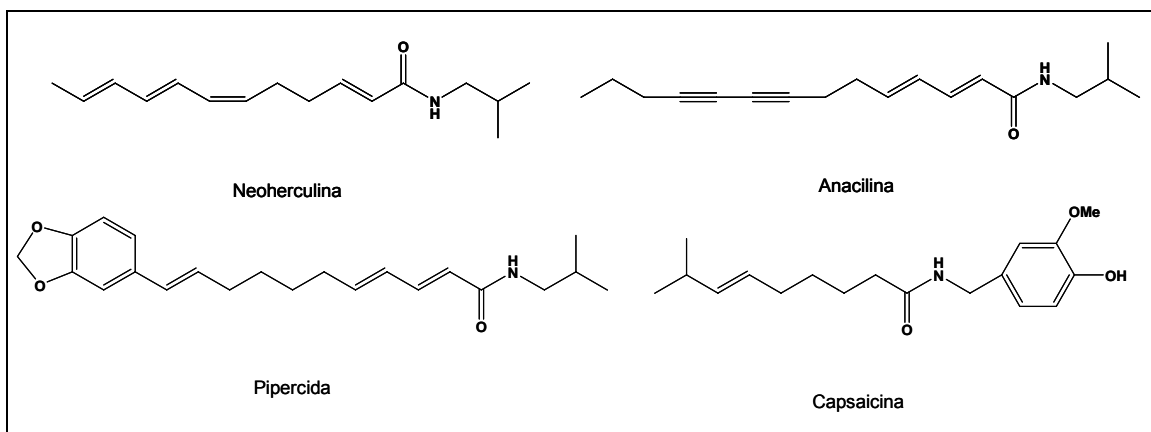


Fig 15. Estructuras de isobutilamidas con actividad insecticida

4 Insecticidas microbianos

El control biológico de las plagas se ha considerado siempre como el método menos contaminante y que produce menos daños ecológicos; sin embargo, por su acción más lenta y por la complejidad de los trabajos de investigación y desarrollo para establecer métodos óptimos de aplicación, el control biológico no ha podido competir con los insecticidas químicos de elevada toxicidad y de acción rápida⁴⁹. Recientemente se han incrementado las investigaciones dirigidas hacia este campo y en la actualidad se conocen muchas bacterias, virus y hongos entomopatógenos que pueden reducir la población de una plaga⁵⁰. Además, los microorganismos son una importante fuente de obtención de biomoléculas con una actividad muy significativa para la industria agroquímica.

- A partir de bacterias

La bacteria *Bacillus thuringiensis* (Bth) es un bacilo Gram-positivo, flagelado y esporulado que se caracteriza por la formación de una serie de toxinas durante la esporulación (la más importante es la δ -endotoxina) con actividad tóxica frente a larvas de insectos. En los últimos años, mediante ingeniería genética, se ha podido clonar el gen codificante de esta toxina e introducirlo en la dotación genética de distintas especies cultivadas, como tabaco,

algodón, arroz y maíz, obteniéndose así cultivos resistentes a plagas mediante expresión de proteínas insecticidas⁵¹.

Del mismo modo que se han aislado muchos compuestos insecticidas a partir de extractos de plantas, también las bacterias ofrecen grandes posibilidades para el descubrimiento de nuevos compuestos útiles. Por ejemplo, a partir del caldo de fermentación de *Streptomyces avermitilis*, una bacteria filamentosa, se han aislado una serie de compuestos denominados avermectinas⁵² que han demostrado ser plaguicidas muy potentes, destacando la abamectina (mezcla de la avermectina B_{1a} y B_{1b}), de la cual se han obtenido ya derivados semisintéticos, como la ivermectina⁵³ y la emamectina⁵⁴.

Los spinosyns son una clase altamente selectiva de insecticidas de tipo macrólido descubiertos alrededor de 1980 a partir del actinomiceto *Saccharopolyspora spinosa*. El producto comercial spinosad es una mezcla del spinosyn A (componente principal) y D⁵⁵, aunque hasta la fecha se han aislado y caracterizado más de veintiséis spinosyns. Presentan las características necesarias para ser un buen plaguicida: compatibilidad medioambiental, especificidad, velocidad de acción y baja toxicidad en mamíferos¹⁵.

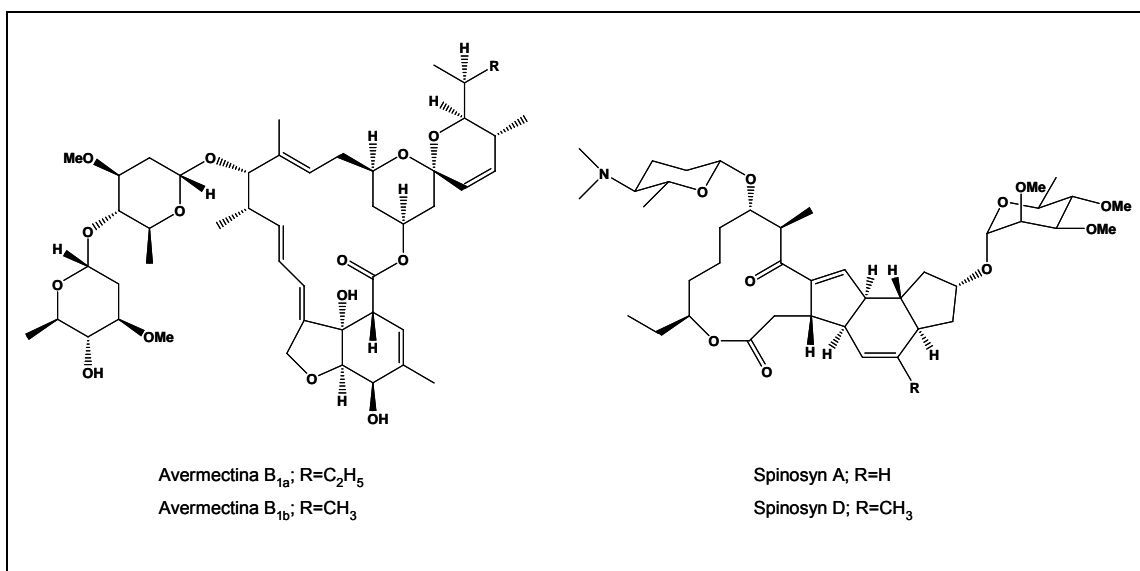


Fig 16. Estructuras químicas de la abamectina y el spinosad

- A partir de virus

Aproximadamente se han descrito 1200 virus causantes de enfermedades en más de 800 especies de insectos, pero sólo unos cuantos han alcanzado aplicación comercial, la mayoría pertenecientes a la familia de los Baculovirus. Se caracterizan por su gran especificidad, por su inocuidad frente a peces, aves y mamíferos y porque no producen daños ecológicos⁴⁹.

- A partir de hongos

Los hongos entomopatógenos constituyen una vía muy interesante para el control de insectos y presentan una serie de ventajas: seguridad para el hombre, no producen desequilibrios ecológicos, no se han registrado resistencias y son persistentes. Muchos forman parte de sistemas ecológicos de distintos hábitats y contribuyen a mantener un nivel bajo en las poblaciones de distintas especies de insectos; esto ha sugerido la posibilidad de implantarlos como medio de lucha contra plagas.

La mayor parte de los denominados hongos entomopatógenos son Ficomicetos y Deuteromicetos, aunque también están representadas especies de otras clases. Las esporas de estos hongos atacan o bien la cutícula externa o bien el intestino de los insectos huéspedes, después germinan y las hifas penetran en el hemocele. La muerte se origina por la producción de una toxina o por el uso directo de los fluidos corporales del insecto. En el último caso una vez utilizadas las reservas del organismo del insecto, el micelio muere por falta de alimento y esporula y esta masa de esporas actúa como un foco de futuras infecciones. Entre los hongos más estudiados y aplicados por sus propiedades insecticidas están: *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Hirsutiella thomsoni* y *Verticillium lecanii*⁴⁹.

Algunos metabolitos secundarios aislados a partir de hongos entomopatógenos han demostrado tener una elevada actividad insecticida. Los compuestos más significativos se describen en el siguiente apartado.

2. Hongos: fuente de metabolitos bioactivos

Los hongos tienen una gran importancia económica, debido a la vez a su nocividad y a su utilidad. Responsables de la destrucción de una gran parte de la materia orgánica terrestre, los hongos contribuyen a la realización de los ciclos biológicos. La explotación de sus actividades bioquímicas es un fenómeno muy antiguo, en cambio el cultivo deliberado de estos microorganismos con vistas a la producción industrial de metabolitos interesantes comenzó a principios del siglo XX. Todavía hoy, el conocimiento de la biología de los hongos es parcial; sin embargo los estudios realizados del metabolismo tanto primario como secundario y de su genética permite controlar cada vez mejor sus capacidades biosintéticas y ponerlas al servicio del hombre⁵⁶.

Los compuestos de origen fúngico comprenden una gran variedad de sustancias químicas de diversa complejidad y con estructuras muy variadas, dando lugar a un amplio rango de actividades biológicas⁵⁷. Así los hongos filamentosos han demostrado ser una fuente inagotable de metabolitos con actividad antitumoral, antibiótica, citostática, antifúngica, antioxidante, insecticida o antiinflamatoria⁵⁸. Por esta razón, existe un gran interés en el aislamiento de estas sustancias bioactivas para su utilización como fármacos o insecticidas.

La extraordinaria diversidad de especies fúngicas y el hecho de que aproximadamente sólo un 5% de éstas hayan sido identificadas, indica el ilimitado potencial de los hongos como origen de nuevos biometabolitos secundarios⁵⁹.

Los hongos filamentosos más difundidos en la naturaleza pertenecen a los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. Exentos de clorofila, son incapaces de realizar la fotosíntesis y obtienen su energía de la respiración y fermentación de los materiales solubles que encuentran en su entorno. Heterótrofos eucariotas y poco exigentes, son capaces de asimilar una gran variedad de sustratos orgánicos gracias a su elevado potencial de secreción de enzimas exocelulares. La mayor parte de hidratos de carbono los asimilan fácilmente y las fuentes de nitrógeno que utilizan son muy variadas: sales de amonio, nitritos y nitratos, urea, aminoácidos y fuentes complejas de nitrógeno orgánico. La mayoría de las especies se desarrolla en rangos de pH bastante amplios, entre 3 y 8, y a temperaturas óptimas de 20 a 25 °C, aunque se han descrito especies que crecen satisfactoriamente a 5 ó 37 °C. Si bien algunos hongos viven en el agua, por ejemplo los Zygomycetos acuáticos, su hábitat más común es el suelo, donde llevan generalmente una vida saprofita sobre vegetales en curso de descomposición reciclando las sustancias orgánicas. Algunos viven en simbiosis con otros organismos como plantas verdes (hongos de la micorriza), algas (líquenes) o bacterias y muchos otros llevan una vida parasitaria sobre plantas y animales⁵⁶.

Aspergillus spp.

Existen unas 200 especies de *Aspergillus*, identificadas en todo el mundo y creciendo en un amplio conjunto de sustratos. Forman parte de la microflora del aire y por ello se

encuentran frecuentemente como contaminantes de los medios de cultivo. Muchos aspergilos contaminan los alimentos produciendo productos tóxicos, como por ejemplo *A. flavus* que produce una micotoxina denominada aflatoxina. Las especies de *Aspergillus* producen numerosas enzimas exocelulares útiles en biotecnología y son importantes en medicina porque causan enfermedades de los órganos internos denominadas aspergilosis. *Aspergillus fumigatus* es el responsable de casi todas estas infecciones, aunque *A. terreus*, *A. flavus* y *A. niger* también han sido implicados. Éste último es particularmente significativo en la fabricación de ácidos cítrico y glucónico que tienen una amplia aplicación en la industria de los alimentos. A partir de este género se han aislado una gran cantidad de metabolitos secundarios, principalmente micotoxinas como ocratoxinas, aflatoxinas, esterigmatocistinas, verrucarinas o roridinas entre otras⁶⁰. La causa por la que los hongos segregan estas sustancias en el medio no se conoce exactamente, sin embargo la competición por el hábitat y los nutrientes provocan que muchas especies fúngicas produzcan metabolitos que inhiban el crecimiento o que incluso causen la muerte de organismos que habitan a su alrededor, como bacterias, hongos e insectos⁶¹.

Penicillium spp.

Las especies de *Penicillium* se encuentran frecuentemente contaminando frutos de cítricos o produciendo deterioro en los alimentos. La obtención de penicilina es sin duda el uso más significativo de este género. Las 58 especies de *Penicillium*, subgénero *Penicillium*, producen un gran número de metabolitos secundarios, incluyendo varias micotoxinas. Recientemente Frisvad y colaboradores han publicado una extensa revisión de todos ellos, encontrándose con mayor frecuencia la roquefortina C, ciclopeninas, patulina, ácido terréstrico, ácido penicílico, ocratoxina A y citrinina⁶².

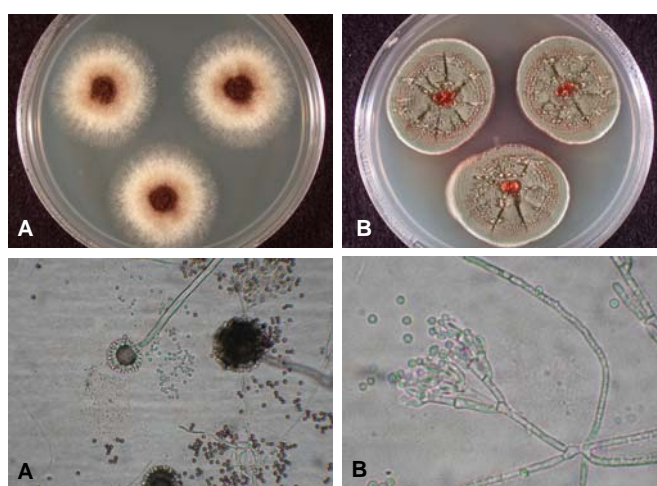


Fig 17. *Aspergillus* sp. (A) y *Penicillium* sp. (B)

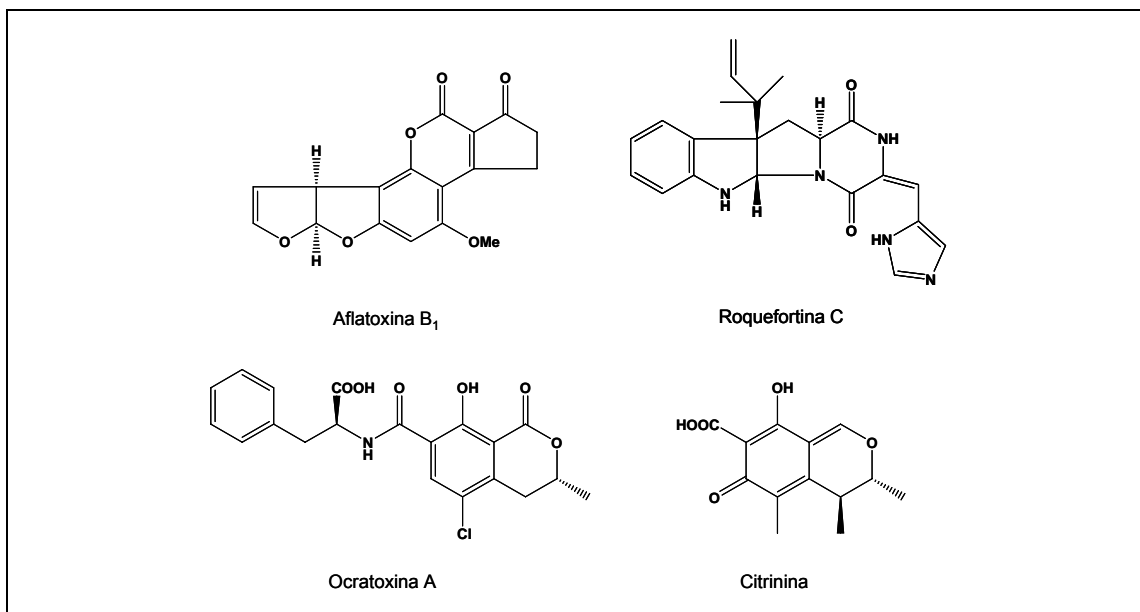


Fig 18. Estructuras de algunas micotoxinas aisladas a partir de *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp.

2.1. En la industria farmacéutica⁶⁰

La diversidad de acción de los hongos en el campo de la salud es muy amplia; se manifiesta sobretodo en la fabricación de antibióticos, vitaminas, hormonas y numerosas sustancias farmacológicamente activas.

Entre los cerca de 10000 productos con actividad antibiótica de origen natural catalogados hasta el momento, alrededor del 20% provienen de los hongos filamentosos, esencialmente de los Fungi Imperfecti (*Penicillium*, *Cephalosporium*, *Aspergillus*). El desarrollo de dos de estos antibióticos (penicilina G y cefalosporina C), a través de mejoras en el desarrollo de cepas y de la tecnología de fermentación así como en la obtención de sus derivados de semisíntesis, ha sido de tal magnitud que representan hoy el 60% del mercado mundial de los antibióticos. Aunque gozando de un mercado mucho más modesto, la griseofulvina, proveniente de *Penicillium griseofulvum* y de *P. patulum*, es un antifúngico muy eficaz en el tratamiento sistémico de las micosis de la piel.

Dos Ascomicetos levaduriformes, *Eremothecium ashbyi* y *Ashbya gossypii* han sido utilizados con éxito para la producción industrial de riboflavina: el 30% del mercado mundial de esta vitamina, estimado en 2000 toneladas al año, se prepara por esta vía.

Por otra parte, las micotoxinas del cornezuelo y sus derivados, en su mayoría alcaloides, producidas por numerosas especies de *Claviceps* se utilizan a dosis terapéuticas como útero-contractivos, antimigrañosos, antidepresivos, euforizantes (LSD) e hipotensivos.

Ciclosporina A, inmunosupresor importante proveniente de las fermentaciones de los hongos *Trichoderma polysporum* y *Cylindrocarpon lucidum*, ha sido introducida en el mercado. También la gliotoxina, un metabolito secundario producido por *Aspergillus fumigatus*, que pertenece a los denominados epipolítiodioxopiperazinas (ETPs) posee propiedades antibióticas

e inmunotóxicas. Tanto la gliotoxina como la ciclosporina han encontrado su uso en cirugía de trasplantes de órganos.

Otras muchas sustancias, que actúan como inhibidores de enzimas, han sido extraídas de hongos y han demostrado poseer actividades farmacológicas muy diversas: hipocolesteromiantes (la citrina de *Penicillium citrinum*, la compactina de *P. brevicompactum*, la mevinolina de *Aspergillus terreus*), hipolipemiantes (la ascofuranona de *Ascochyta viciae*) o hipotensivas (la oudenona de *Oudemansiella radicata*).

Por último, aunque un gran número de metabolitos fúngicos (el lentinano de *Lentinus edodes* o el escleroglucano de *Sclerotinia glucanicum*) muestran alguna actividad antitumoral y han sido sometidos a ensayos clínicos para el tratamiento del cáncer.

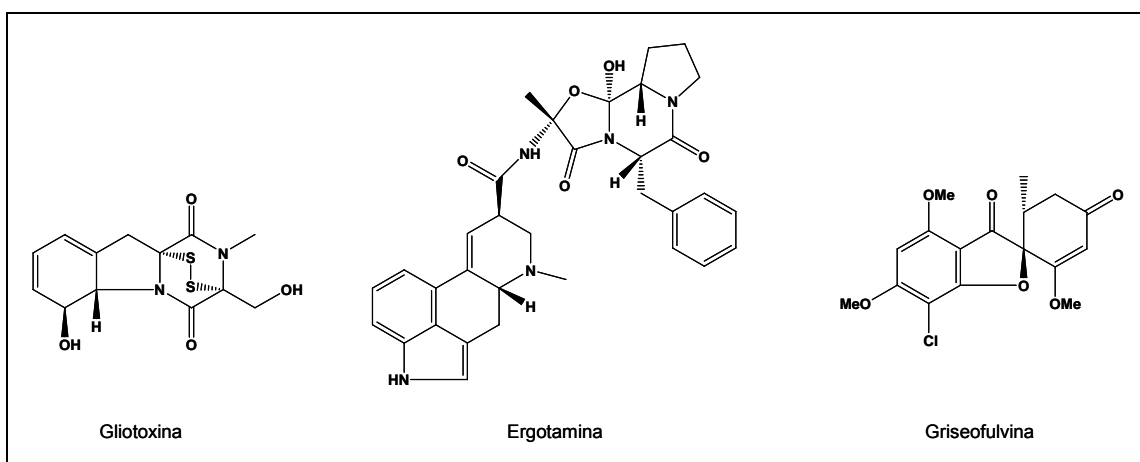


Fig 19. Productos naturales de origen fúngico con aplicaciones farmacéuticas

2.2. En la industria agroquímica

Insecticidas

Más de 400 especies de hongos atacan insectos y ácaros, de forma que existe un gran potencial para el uso de estos organismos como insecticidas biológicos. Uno de los primeros estudios encaminados a la detección de sustancias entomotóxicas en hongos se realizó sobre cepas de *Metarhizium anisopliae*, conduciendo a la obtención de dos depsipéptidos cíclicos que se denominaron destruxinas A y B⁶³. Actualmente se conocen 35 especies de destruxinas con actividades insecticidas variables⁶⁴. Son varios los péptidos cíclicos entomotóxicos aislados a partir de diversos hongos; de *Beauveria bassiana* se identificaron la beauvericina⁶⁵, las beauverolidas⁶⁶ y la bassianolida⁶⁷; a partir de *Fusarium avenaceum* las enniantinas⁶⁸; de *Tolyocladium niveum* se obtuvieron cinco compuestos relacionados estructuralmente denominados efrapeptinas⁶⁹ y de *Eupenicillium shearii* se aisló la shearamida A⁷⁰. De este mismo hongo se habían aislado previamente shearinina A y B, activos frente a *Helicoverpa zea* y *Spodoptera frugiperda*, respectivamente⁷¹.

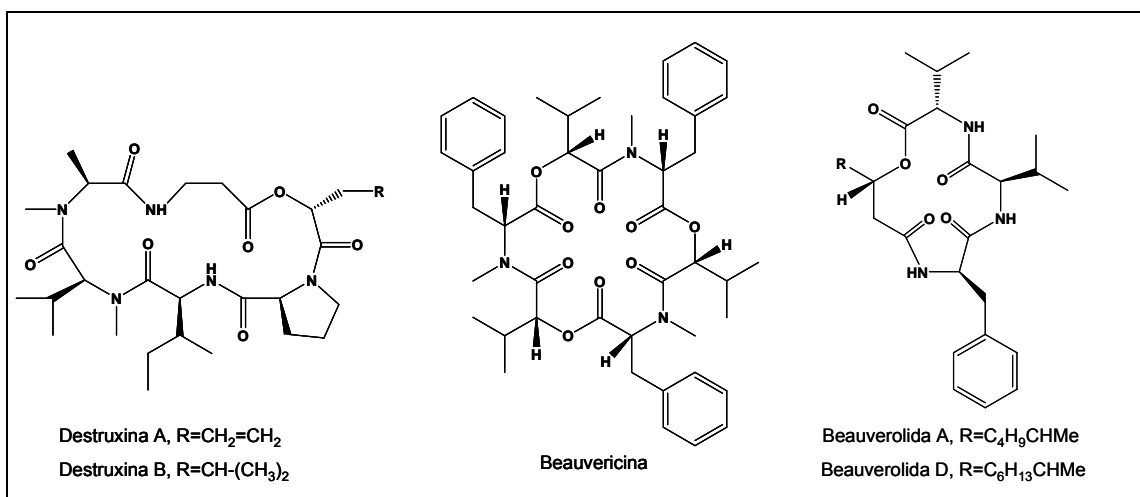


Fig 20. Péptidos cíclicos entomotóxicos de origen fúngico

Además de estos compuestos de estructura peptídica existen una gran variedad de moléculas con actividad insecticida aisladas a partir de extractos fúngicos. Así, a partir de *Chaetomium brasiliense* se han obtenido varios compuestos con potente actividad insecticida frente a *H. zea*, tales como el chaetochalasin A, el chaetoglobosin D y el 19-O-acetilchaetoglobosin A y D⁷². El ácido dipicolínico⁷³ es el principal producto metabólico de *Verticillium lecanii* y su sal sódica tiene propiedades insecticidas frente a *Calliphora erythrocephala*; además a partir de este mismo hongo se han aislado otros compuestos minoritarios como el vertilecanin A que exhibe actividad insecticida frente a *Helicoverpa zea*⁷⁴.

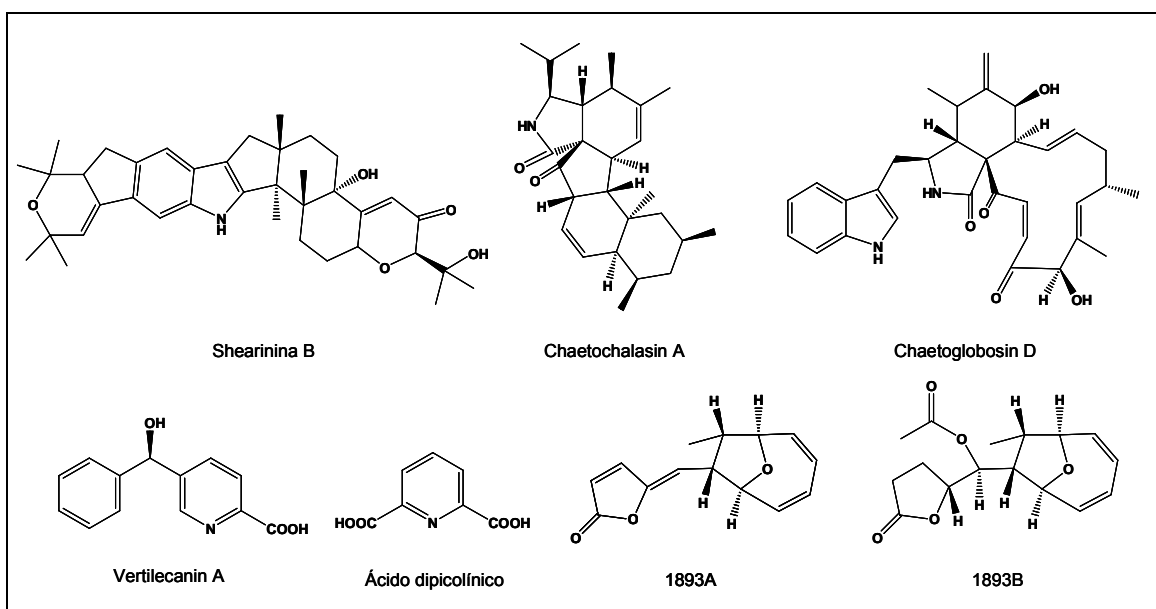


Fig 21. Compuestos entomotóxicos de origen fúngico

También a partir de hongos de origen marino se han descrito compuestos activos frente a insectos, así de *Kandelia candel* se han aislado dos nuevos metabolitos (1893A y 1893B) de estructura lactónica con una elevada toxicidad frente a *Heliothis armigera* y *Sinergasilus* spp⁷⁵.

Sin embargo, la mayoría de los compuestos activos frente a insectos, caracterizados hasta el momento, son producidos por los Fungi Imperfecti, concretamente por miembros de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, conocidos por producir una gran variedad de metabolitos secundarios, siendo muchos de ellos antibióticos y micotoxinas.

	Especie	Metabolito	Actividad
Esclerocios	<i>A. flavus</i>	Aflavininas ⁷⁶	Inhibición de la alimentación de <i>Carpophilus hemipterus</i>
		Aflavazol ⁷⁷	
		Aflavarin ⁷⁸	
	<i>A. sulphureus</i>	Radarininas ⁷⁹ Sulpininas y Secopenitrem B ⁸⁰	Inhibición del desarrollo de <i>Helicoverpa zea</i> Tóxico frente a <i>Helicoverpa zea</i>
<i>A. nominus</i>	Derivados paspalina ⁸¹	Reducción de peso en <i>Helicoverpa zea</i>	
	Nominino ⁸² Aspernomino ⁸³	Reducción de peso en <i>Helicoverpa zea</i> Tóxico frente a <i>Helicoverpa zea</i>	
<i>A. arenarius</i>	Arenarinas ⁸⁴	Tóxico frente a <i>C. hemipterus</i>	
Caldo	<i>A. terreus</i>	Alantripinona y serantripinona ⁸⁵	Tóxico frente a <i>Myzus persicae</i>
	<i>A. melleus</i>	Mellamida ⁸⁶	Tóxico frente a <i>Lucilia sericata</i>
	<i>A. japonicus</i>	Asperparalinas ⁸⁷	Parálisis frente a <i>Bombxy mori</i>
	<i>A. carneus</i>	Aspergicinas ⁸⁸	Tóxico frente a <i>Haemonchus contortus</i>
	<i>A. IM1337664</i>	Aspergilamidas ⁸⁹	Tóxico frente a <i>Haemonchus contortus</i>
	<i>A. ochraceus</i>	Aspirona y asperlactona ⁹¹	IGR frente a <i>Tribolium castaneum</i>

Tabla 1. Metabolitos con actividad insecticida aislados a partir de extractos de *Aspergillus* sp.

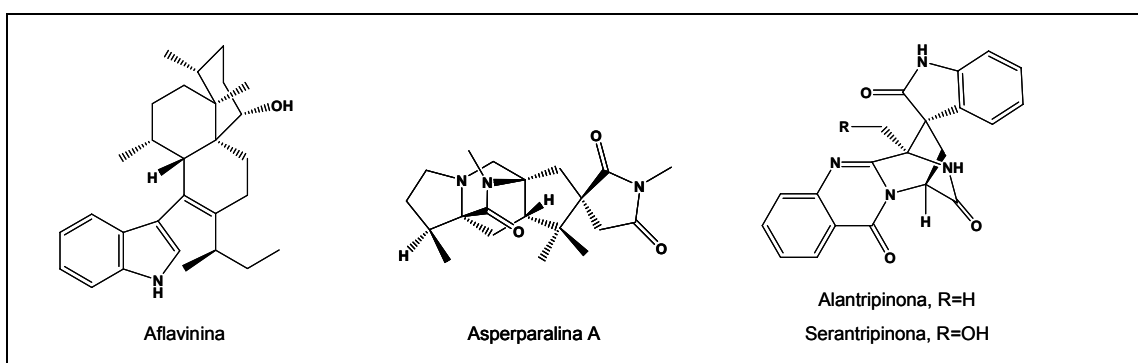


Fig 22. Compuestos entomotóxicos de *Aspergillus* sp.

La investigación llevada a cabo con especies del género *Aspergillus* se ha dirigido principalmente hacia la búsqueda de nuevos compuestos producidos por los esclerocios, que han sido una fuente muy prolífica de metabolitos con actividad insecticida⁹⁰. De este modo a partir de los extractos de los esclerocios de diferentes especies de *Aspergillus* se han aislado una serie de metabolitos que mostraron actividades antialimentarias, reductoras de peso y tóxicas frente a distintos insectos. Al mismo tiempo, el estudio de extractos orgánicos del caldo

de diversas especies de *Aspergillus* ha conducido al aislamiento de diversas sustancias con actividad insecticida (Tabla 1).

Del género *Penicillium* también se han obtenido compuestos entomotóxicos de interés⁹¹ (Tabla 2)

	Especie	Metabolito	Actividad
Esclerocios	<i>P. raistrickii</i>	p-terfenilos y derivados de xantona ⁹²	Tóxico frente a <i>Helicoverpa zea</i>
	<i>P. sclerotigenum</i>	Esclerotigenina ⁹³	Tóxico frente a <i>Helicoverpa zea</i>
	<i>P. thiersii</i>	Thiersininas ⁹⁴	Tóxico frente a <i>Spodoptera frugiperda</i>
	<i>P. crustosum</i>	Penitrems ⁹⁵	Tóxico frente a <i>Oncopeltus fasciatus</i> y <i>Ceratitis capitata</i> ⁹⁶
Caido	<i>P. decaturense</i>	Decaturinas ⁹⁷	Tóxico frente a <i>Spodoptera frugiperda</i>
	<i>P. expansum</i>	Comunesinas ⁹⁸	Tóxico frente a <i>Bombix mori</i>
	<i>P. thiersii</i>	Oxalicanas ⁹⁹	Tóxico frente a <i>Spodoptera frugiperda</i>
	<i>P. verruculosum</i>	Verruculogen ¹⁰⁰	Tóxico frente a <i>Bombix mori</i> ¹⁰¹
	<i>P. roqueforti</i>	Macfortinas ¹⁰²	Tóxico frente a <i>H. contortus</i> y <i>T. colubriformis</i> ¹⁰³
	<i>P. simplicissimum</i>	Okaraminas ¹⁰⁴	Tóxico frente a <i>Bombix mori</i>
	<i>P. citrinum</i>	Quinolactacida ¹⁰⁵	Tóxico frente a <i>Myzus persicae</i>
	<i>P. paraherquei</i> <i>P. charlesii</i>	Paraherquamida A ¹⁰⁶ Paraherquamidas ¹⁰⁷	Tóxico frente a <i>Caenorhabditis elegans</i> ¹⁰⁷
	<i>P. brevicompactum</i>	Compactina ¹⁰⁸ Brevioxima ²³ Brevianamidas ¹⁰⁹	Inhibidor HJ de <i>Blattella germanica</i> ¹¹⁰ Inhibidor HJ de <i>Locusta migratoria</i> Tóxico frente a <i>Spodoptera frugiperda</i> ¹¹¹

Tabla 2. Metabolitos con actividad insecticida aislados a partir de extractos de *Penicillium* sp.

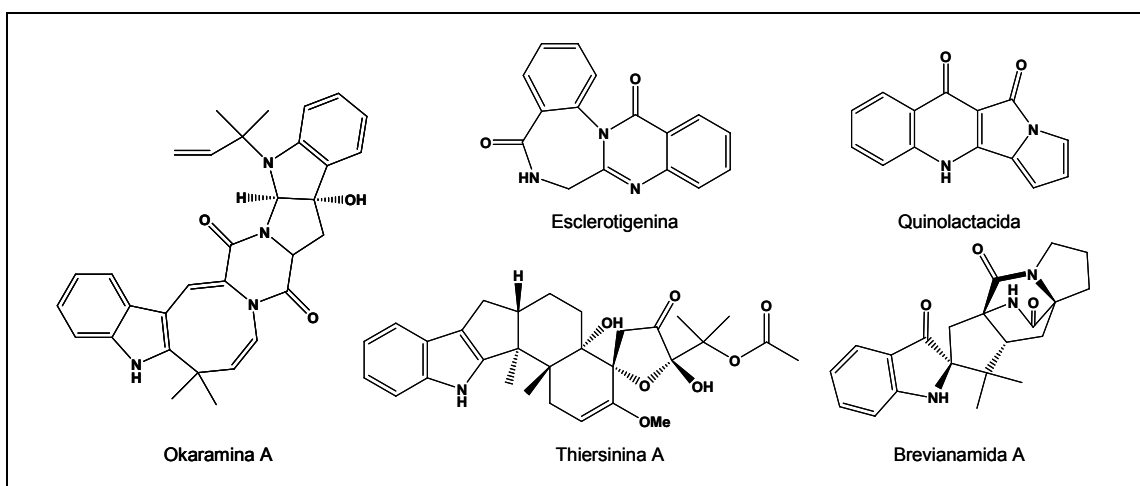


Fig 23. Compuestos entomotóxicos de *Penicillium* sp.

Herbicidas, fungicidas y bactericidas

Los metabolitos fúngicos no sólo poseen propiedades para combatir los insectos, también presentan características que les hacen útiles como herbicidas¹¹², fungicidas⁶¹ o bactericidas⁶¹.

Las brevionas, potentes agentes alelopáticos, son derivados spiroditerpénicos, aisladas a partir de *Penicillium brevicompactum* y muestran actividad fitotóxica¹¹³. También el cornexistin y el hidroxicornexistin son fitotoxinas producidas por el hongo *Paecilomyces variotii*¹¹⁴. El prehelminthosporal y el dihidroprehelminthosporal aislados a partir de *Helminthosporium sativum*¹¹⁵, al igual que los compuestos viridiol, tentoxin, zinniol, putaminoxin, pinolidoxin, ascochitina, pirenilida A, hialopirona y el ácido fusárico, son moléculas aisladas a partir de distintos hongos que también muestran propiedades herbicidas. Algunos compuestos son tan específicos que sólo son tóxicos frente a ciertas especies; el masculosin, un dipéptido cíclico producido por *Alternaria alternata* y el bipolaroxin por *Bipolaris cyanodontis* han mostrado una alta selectividad a bajas concentraciones frente a *Centaurea maculosa* y *Cynodon dactylon*, respectivamente¹¹⁶.

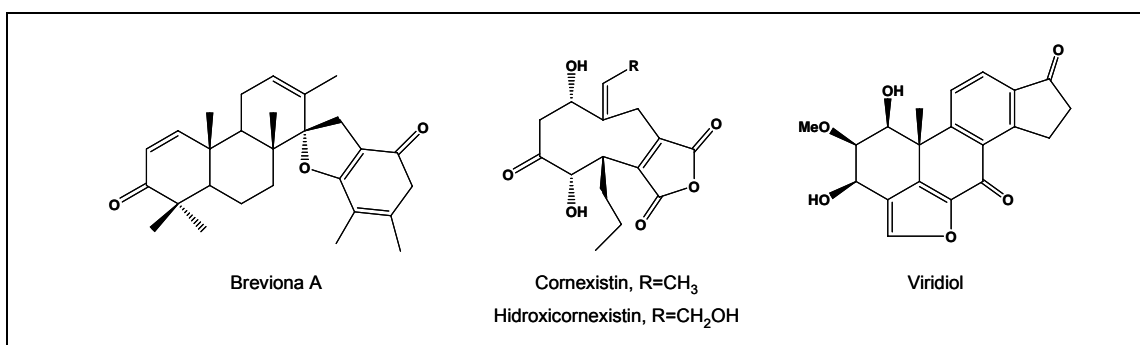


Fig 24. Fitotoxinas de origen fúngico

La estrobilurina A y la oudemansina A son productos naturales fungicidas encontrados en los Basidiomicetos *Strobilurus tenacellus* y *Oudemansiella mucida*, respectivamente. Tienen un modo de acción común, la inhibición de la cadena respiratoria mitocondrial en el hongo. Estos productos estimularon la síntesis química de análogos estructurales, como la azoxistrobina y la kresoxima, que mostraron mayor resistencia a la luz y menor toxicidad frente a mamíferos¹¹⁷.

Las citrafunginas¹¹⁸, las maletininas¹¹⁹, las apenolidas¹²⁰, el cinodontin¹²¹ o el paecilosetin¹²² son diversos ejemplos de moléculas aisladas a partir de extractos fúngicos con actividad fungicida.

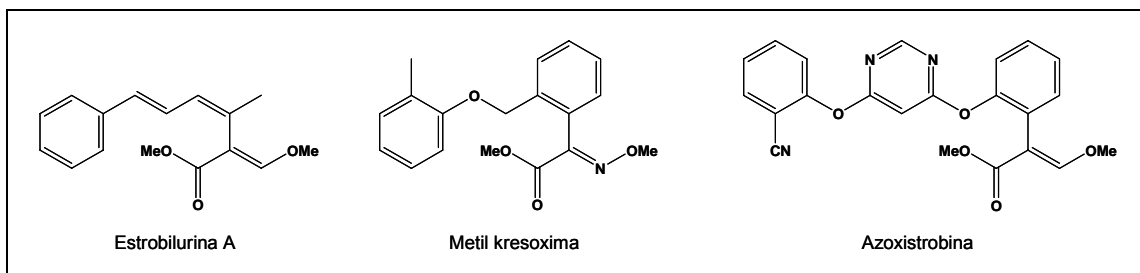


Fig 25. Análogos estructurales de las estrobilurinas

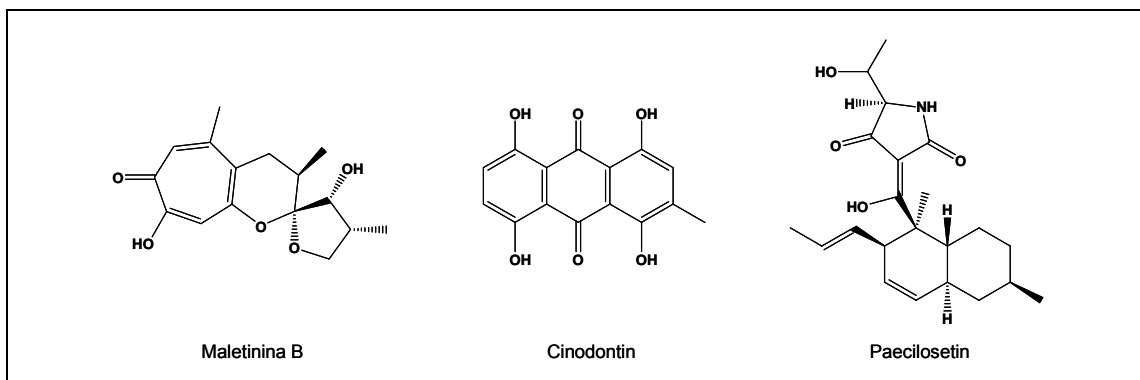


Fig 26. Fungicidas de origen fúngico

Por último, existen también numerosas sustancias de origen fúngico con estructuras muy diversas que muestran actividad bactericida, como las terecinas (derivados piperacínicos)¹²³, la phomadecalinas (decalinas)¹²⁴, la arugosina F (derivado xantónico)¹²⁵, la seragakinona A (derivado antraciclínico)¹²⁶, el benesudin (pirano-furanona)¹²⁷ y la arthrinona (furano-naftoquinona)¹²⁸. Son varios los esqueletos peptídicos aislados a partir de hongos que mostraron actividad antibiótica como el leucocin F10¹²⁹, el tricosporin¹³⁰, las hipelcinas¹³¹ o el LP237-F8¹³².

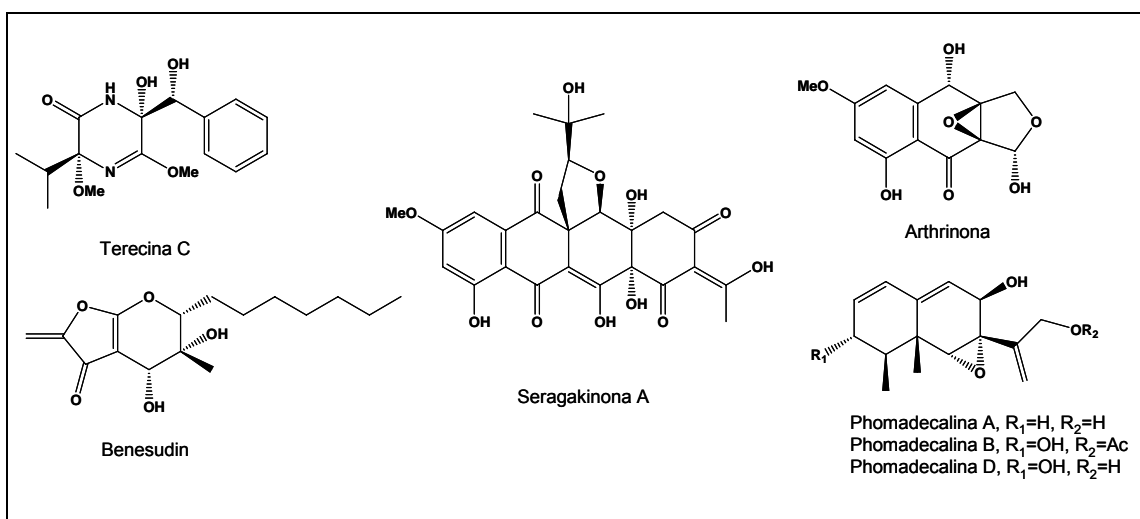


Fig 27. Bactericidas de origen fúngico

2.3. Antecedentes en el grupo de investigación

Dadas las grandes posibilidades que presentan los hongos como fuente de obtención de compuestos naturales bioactivos, nuestro grupo de investigación trabaja desde hace años en el aislamiento, elucidación, síntesis y transformación química de diversos compuestos de origen natural, procedentes de extractos fúngicos terrestres que han destacado por poseer actividad insecticida^{23,96,133}, fungicida¹³⁴, antioxidante¹³⁵ y citotóxica^{136,137}.

Cabe destacar en esta línea, el estudio del extracto diclorometánico de *Penicillium brevicompactum* Dierckx que mostró una elevada actividad entomotóxica y antagonista de la HJ en *O. fasciatus* (20% de mortalidad y 40% de adultos precoces a 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$)^{23,138}. Además manifestó una actividad fungicida importante contra *Colletotrichum gloeosporoides*, *Alternaria tenuis*, *Fusarium culmorum* y *Trichoderma viridae* a una dosis de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ¹³⁹. A partir de este extracto se aislaron varios compuestos: la (-)-brevioxima (**1a**)²³, su análogo **1b**^{134,140} y sus derivados 2-pirrolina (**2a**¹³⁹ y **2b**^{134,141}) y 2-pirrol (**2c** y **2d**¹⁴²) y se evaluaron sus propiedades agroquímicas (Fig 28). El compuesto **1a** exhibió una inhibición espontánea *in vitro* de la biosíntesis de la HJ en corpora allata (CA) de *Locustra migratoria*, bloqueando completamente la producción de hormona HJ3 a una dosis de 100 μM y causando 60% de inhibición a 0.5 μM ^{23,138}, mientras que los compuestos relacionados mostraron una importante actividad anti-HJ *in vivo* y actividad insecticida^{134,139-142}.

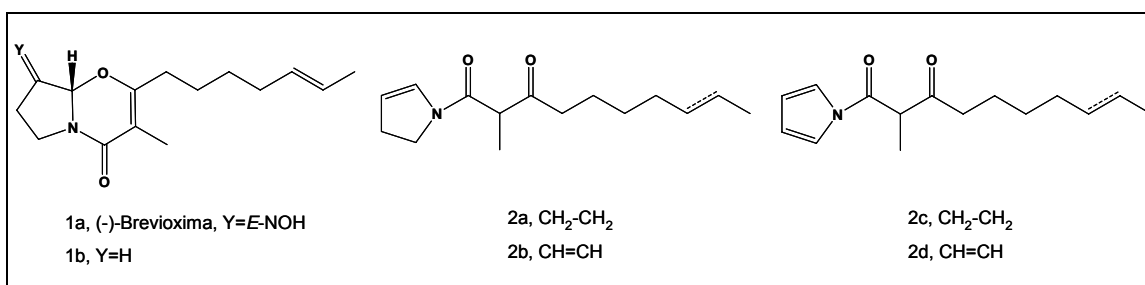


Fig 28. (-)-Brevioxima y sus derivados aislados a partir de *Penicillium brevicompactum*

Algunos análogos sintéticos presentaron una mayor actividad fungicida (**3** y **4**) e insecticida (**5** y **6**) que los productos naturales cabeza de serie¹⁴². Los análogos sintéticos **7** y **8** mostraron elevadas actividades insecticida en ninfas de tercer estadio de *Oncopeltus* con valores de toxicidad aguda (tras 72 h) DL₅₀ de 3.0 y 1.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectivamente. Además, el derivado fenoxifenil **9** fue el compuesto más activo contra *Colletotrichum gloeosporoides* y *C. coccodes*, con valores de DE₅₀ de 2.04 y 11.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente¹⁴¹ (Fig 29).

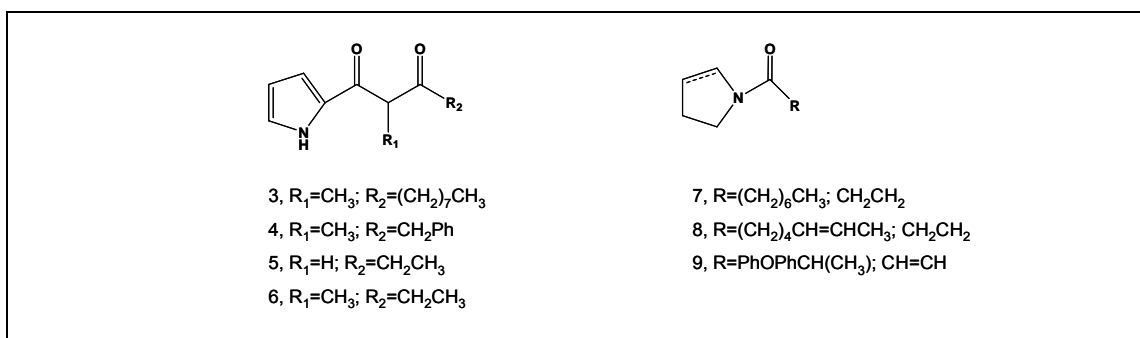


Fig 29. Derivados sintéticos de la brevioxima

A pesar de estas actividades interesantes *in vitro* y/ o *in vivo*, ninguno de estos compuestos fue lo bastante efectivo en comparación con un insecticida convencional. Sin embargo, debido a que la brevioxima y sus análogos parecen ser un buen objetivo como insecticidas selectivos, otros grupos de investigación también han descrito la síntesis tanto racémicas¹⁴³⁻¹⁴⁶ como quirales^{147,148} de estos compuestos.

Continuando con la metodología de trabajo del laboratorio de Productos Naturales del Centro de Ecología Química Agrícola (CEQA) en la *Universitat Politècnica de València*, en la presente tesis se han estudiado los extractos orgánicos de diversos micro hongos: *Aspergillus ochraceus* Wilhelm, *Penicillium cluniae* Quintanilla y *Penicillium coalescens* Quintanilla como materia prima de biometabolitos con posibles aplicaciones farmacológicas o insecticidas.

OBJETIVO Y PLAN DE TRABAJO

[02]

El principal objetivo de este trabajo es la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos a partir de los extractos fúngicos de *Aspergillus ochraceus* Wilhelm, de *Penicillium cluniae* Quintanilla y de *P. coalescens* Quintanilla.

Para llevarlo a cabo se ha seguido el siguiente plan de trabajo:

- Cultivo y extracción de los distintos hongos.
- Ensayos biológicos de los extractos orgánicos del caldo y del micelio de los hongos.
- Fraccionamiento de los extractos activos por cromatografía de adsorción-desorción en columna abierta de gel de sílice.
- Ensayos biológicos de las distintas fracciones.
- Aislamiento y purificación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de las fracciones activas.
- Elucidación estructural de los productos puros mediante técnicas espectroscópicas y de espectrometría de masas.
- Ensayos biológicos de las sustancias puras.

MATERIALES Y MÉTODOS

[03]

1. Cultivo del hongo y obtención del extracto fúngico

Los hongos *Penicillium cluniae* y *P. coalescens* fueron proporcionados por la “Colección Española de Cultivos Tipo (CECT)” de la *Universitat de València* y codificados como CECT 2888 en el caso de *P. cluniae* y como CECT 2764 y CECT 2766 en el caso de las dos cepas estudiadas de *P. coalescens*. En cambio, *Aspergillus ochraceus* fue aislado a partir de una muestra de suelos agrícolas en nuestro laboratorio y clasificado como tal por el Centralbureau voor Schimmelcultures (CBS, Utrecht, Holanda).

1.1. Medios de cultivo

Medio sólido: *Potato Dextrose Agar* (PDA)

Composición: 39 g de PDA (Difco) (fórmula aproximada por litro: 4 g de almidón de patata, 20 g de dextrosa y 15 g de agar) en 1 litro de agua destilada esterilizada en el autoclave a 121 °C durante 16 minutos.

Medio líquido: *Antibiotic Test Broth* (ATB)

Composición: 2 g de extracto de levadura (Difco), 3 g de bacto peptona, 2 g de glucosa, 30 g de sacarosa, 5 g de *corn steep*, 2 g de NaNO₃, 1 g de K₂HPO₄·3H₂O, 0.5 g de MgSO₄·7H₂O, 0.2 g de KCl y 0.01 g de FeSO₄·7H₂O en 1L de agua destilada esterilizada en el autoclave a 121 °C durante 16 minutos.

1.2. Condiciones de cultivo

Las cepas se sembraron en placas Petri con PDA y se incubaron a 28°C durante 7 días y en oscuridad. Posteriormente, se obtuvo una suspensión de 10⁶ conidios/mL en agua destilada con Tween 80 al 0.05% previamente esterilizado. Esta suspensión se inoculó en matraces Erlenmeyer con 1 litro de ATB y se mantuvieron incubados en la oscuridad, con agitación (200 rpm) a 25°C durante 22 días en el caso de *A. ochraceus*, y 15 días en el caso de *P. cluniae* y *P. coalescens*.

1.3. Extracción del caldo

Tras el periodo de incubación se separó el micelio y el caldo por filtración a vacío a través de papel Whatman n°2.

El caldo (5 L) se evaporó parcialmente bajo presión reducida concentrándose a 1 L y se extrajo con una mezcla $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ 1:1 (3 x 1 L). El extracto orgánico se secó con sulfato sódico anhidro, se filtró y se concentró en el rotavapor hasta obtener un extracto seco.

Los micelios se extrajeron con CH_2Cl_2 y CH_3OH por percolación, obteniéndose dos extractos de micelio de distinta polaridad.

2. Ensayos de actividad biológica

Una vez se obtuvo el extracto del caldo y el extracto del micelio se sometieron a una batería de ensayos biológicos con el objetivo de conocer sus posibles actividades. Si los resultados eran positivos se procedía al cultivo del hongo a mayor escala y posteriormente se continuaba con el fraccionamiento guiado por actividad hasta conocer los productos puros responsables de dicha acción.

2.1. Actividad antioxidante

Para determinar la actividad antioxidante de los extractos se realizó en primer lugar un ensayo cualitativo basado en el método de Takao¹⁴⁹ y si el resultado era positivo se establecía su poder antioxidante de forma cuantitativa según el método de Hirota¹⁵⁰.

1. Método cualitativo

Los extractos preparados a una concentración de 1mg/10 μL se aplicaron sobre cromatofolios de silicagel 60 F₂₅₄ (20x20 cm) y se eluyeron con la siguiente fase móvil: DCM/EtOH/HA - 90/9/1. Se usó como revelador el radical libre DPPH (1,1-difenil-2-picrihidracilo) a una concentración de 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en etanol, el cual muestra una absorción característica a 517 nm (púrpura). Este color púrpura desaparece cuando el DPPH reacciona con una molécula antioxidante. Se empleó como control positivo el BHA (butil-hidroxi-anisol).

2. Método cuantitativo

La actividad antioxidante se cuantificó en relación a un antioxidante comercial, el BHT (2,6-di-*tert*-butil-4-metil-fenol). Una disolución etanólica de la muestra (2 mL) fue mezclada con 1 mL de una disolución etanólica 0.5 mM DPPH y 2 mL de un tampón acetato 0.1 M a pH=5.5. Tras 30 minutos de agitación se midió la absorbancia a 517 nm. La CE_{50} se determinó como la concentración de cada muestra requerida para conseguir el 50% de la absorbancia mostrada por el BHT.

2.2. Actividad fungicida

La actividad fungicida se determinó contra 15 hongos fitopatógenos importantes desde el punto de vista agrícola: *Fusarium culmorum* (CCM 172), *Geotrichum candidum* (CCM 245), *Fusarium oxysporum* ssp *gladioli* (CCM 233), *Fusarium oxysporum* ssp *niveum* (CCM 259), *Colletotrichum coccodes* (CCM 327), *Colletotrichum gloeocarpoides* (CECT 2859), *Tricothecium roseum* (CECT 2410), *Alternaria alternata* (AF 5199-2), *Alternaria tenuis* (CECT 2662), *Rosellinia neccatrix* (CCM 297), *Verticillium dahliae* (CCM 269), *Trichoderma viride* (CECT-2423), *Phytophthora citrophthora* (CECT-2353), *Penicillium italicum* (CECT-2294) y *Aspergillus parasiticus* (CECT-2681). Las cepas fueron proporcionadas por la “Colección Española de Cultivos Tipo” (CECT) de la *Universitat de València*, por la “Colección de la Cátedra de Microbiología” (CCM) del Departamento de Biotecnología de la *Universitat Politècnica de València* y por el Departamento de Fitopatología de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos (AF) de la *Universitat Politècnica de València*.

Se realizaron dos tipos de ensayos¹⁵¹ en función del hongo a estudiar. Normalmente se ha utilizado el método de inclusión de las esporas en el medio de cultivo (PDA) y la aplicación de la muestra mediante discos. En el caso de *A. alternata*, *A. tenuis* y *R. neccatrix*, por la dificultad en la obtención de esporas, se procedió a la inclusión de la muestra en el medio de cultivo (PDA) y la aplicación del hongo por el método de toques.

1. Determinación de la actividad fungicida mediante la inclusión de esporas en el medio de cultivo

A partir de las cepas sembradas en placas Petri con PDA se obtuvo una suspensión de 10^5 conidios/ mL en agua destilada con Tween 80 al 0.05% previamente esterilizado empleando para ello el microscopio óptico (40 X) y la cámara de Neubauer. 1 mL de esta suspensión se incluyó sobre 15 mL del medio de cultivo sólido (PDA) en una placa Petri de plástico estéril y cuando el medio con las esporas estuvo totalmente solidificado se colocaron 4 discos (papel Whatman, nº113, 0.5 cm de diámetro) impregnados con las muestras a ensayar a las dosis deseadas. Los extractos se ensayaron a una dosis inicial de $100 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ (2 mg/disco), las fracciones a $50 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ y los productos puros a $10 \mu\text{g}/\text{mm}^2$. Como control negativo se empleó el disolvente usado en la disolución de las muestras y por control positivo se usó el fungicida comercial Benomilo a las dosis de 10, 5, 1 y 0.1 $\mu\text{g}/\text{disco}$, dependiendo de cada hongo. Las placas se incubaron a 28°C en la estufa y en oscuridad durante 3 días. Los ensayos se realizaron por triplicado y los resultados se obtuvieron por comparación con los datos obtenidos a partir del fungicida comercial, según fuese el halo de inhibición (mm) alrededor de los discos impregnados.

2. Determinación de la actividad fungicida mediante la inclusión del extracto en el medio de cultivo

Los extractos disueltos a una concentración de 500 µg/mL se añadieron a 4 mL de PDA. Se usaron placas Petri de vidrio estériles conteniendo únicamente el disolvente usado para preparar las diluciones como control. Cuando el agar estuvo solidificado se sembró el hongo fitopatógeno con un toque central y se incubó durante 3 días, a 28°C, en estufa y oscuridad. Los ensayos se repitieron tres veces y los resultados se dieron como media del porcentaje de inhibición del crecimiento radial del micelio: la inhibición se calculó considerando como 100% el crecimiento obtenido en las placas de control negativo.

2.3. Actividad bactericida

Los ensayos de actividad bactericida se realizaron por el método del disco de papel en placa¹⁵¹. Cultivos de 24 horas de cada microorganismo, mantenidos en tubos inclinados en el medio de cultivo sólido recomendado por CECT, se reactivaron en caldo nutritivo *Nutrient Broth* (Difco) y se incubaron durante un periodo de 24 horas a 28 ó 37°C, según la bacteria. Posteriormente se inoculó 1 mL de la suspensión bacteriana en una placa Petri de plástico estéril y se vertieron 15 mL del medio de ensayo *Plate Count Agar* (Difco); cuando el medio estuvo totalmente solidificado se colocaron 5 discos previamente impregnados con las muestras a las dosis deseadas y secados a temperatura ambiente. Asimismo se realizó un control negativo utilizando discos impregnados sólo con el disolvente utilizado para disolver las muestras y un control positivo que consistió en un disco impregnado con clorhidrato de tetraciclina, como antibiótico de amplio espectro que permite dar una estimación del poder bactericida del compuesto. Las placas de ensayo se incubaron a 28 ó 37°C según la bacteria y en oscuridad, y los resultados se observaron tras 24 horas de incubación, expresándose como la media del diámetro del halo de inhibición del crecimiento bacteriano, en mm.

La actividad bactericida de las muestras se estudió sobre las siguientes bacterias: *Bacillus cereus* (CECT 148), *Staphylococcus aureus* (CECT 86), *Enterococcus faecalis* (CECT 481), *Salmonella typhi (choleraesuis)* (CECT 409), *Escherichia coli* (CECT 405) y *Erwinia carotovora* (CECT 225).

2.4. Actividad herbicida

La actividad herbicida se determinó a través del poder inhibitorio de la enzima glutamina-sintetasa¹⁵². Para ello se empleó como marcador una bacteria, *Bacillus subtilis*, cuyo crecimiento está ligado a esta enzima¹⁵³. La bacteria reactivada proveniente de un medio de cultivo líquido incubado durante 24 horas se sembró en placas Petri sobre dos medios de cultivo agar distintos: un medio de cultivo sólido sin la enzima glutamina-sintetasa (*Davis Minimal Agar*) y otro medio de cultivo sólido con esta enzima (*Plate Count*). Una vez solidificado el medio, se colocaron los discos impregnados con los extractos a una dosis inicial de 100 µg/mm² y el control positivo fosfinitricin a

una dosis de 10 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$. Se consideró que el extracto tuvo actividad herbicida si mostraba un halo de inhibición de crecimiento bacteriano mayor alrededor del disco de papel a las 24h en la placa *Plate Count* que en la placa *Davis Minimal Agar*.

2.5. Actividad insecticida

Los ensayos insecticidas se realizaron exclusivamente frente al hemíptero *Oncopeltus fasciatus* Dallas y el díptero *Ceratitis capitata* Wiedmann. El Centro de Ecología Química Agrícola dispone de un insectario donde se lleva a cabo la cría de éstas y otras especies de insectos. Las colonias se mantienen a $27 \pm 2^\circ\text{C}$, con una humedad relativa entre 50-60% y un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

La dieta de *O. fasciatus* está constituida por semillas de girasol y agua mientras que la de *C. capitata* es diferente para larvas y adultos: la dieta larvaria consiste en 200 g de salvado de trigo, 50 g de sacarosa, 25 g de levadura de cerveza, 2 g de Nipagin y 2 g de Nipazol y 500 mL de agua destilada con 7.5 mL de HCl (37%), mientras que la dieta para adultos consiste en un hidrolizado de proteínas (Sigma) y sacarosa en una proporción 1:4.

1. Evaluación de la actividad entomotóxica aguda

Los ensayos de entomotoxicidad se realizaron por aplicación tópica o contacto en placa dependiendo de la solubilidad de la muestra, según el método de Bowers *et al.*¹⁵⁴ modificado por Cantín *et al.*¹⁴² y Cuñat *et al.*¹⁵⁵, respectivamente.

Por el método de aplicación tópica, las muestras a ensayar se disolvieron en acetona hasta obtener las concentraciones necesarias para el ensayo, siendo la dosis inicial de aplicación de 100 μg de extracto/ μL y por insecto. Con una micropipeta se aplicó 1 μL de la disolución sobre la parte ventral del abdomen del insecto. Cada tratamiento se realizó sobre 10 ninfas de 4º estadio recién mudadas, en el caso de *O. fasciatus*, y 10 moscas adultas de 2-3 días vírgenes (5 hembras y 5 machos), en el caso de *C. capitata*. Los insectos se anestesiaron con cloroformo y hielo respectivamente, y después se procedió a la aplicación tópica de los extractos. Se efectuaron 2 repeticiones por extracto en el caso de *Oncopeltus* y 5 en el caso de *Ceratitis*, con su correspondiente ensayo control. La mortalidad se observó diariamente, durante varios días (3 para el hemíptero y 10 para el díptero) y el grado de toxicidad se expresó como la media del porcentaje de mortalidad.

Por el método de contacto en placa (sólo se usa frente al hemíptero *O. fasciatus*), las muestras previamente disueltas en su disolvente adecuado, se vertieron en una placa Petri de 5 cm de diámetro, a la concentración inicial de 500 $\mu\text{g}/\text{ninfa}$. Tras la evaporación del disolvente a temperatura ambiente se introdujeron 15 ninfas de 3º estadio y se observaron durante 72 horas. En cada ensayo se realizaron tres repeticiones y su correspondiente control.

2. Evaluación de la actividad inhibidora del crecimiento de los insectos (IGR)

En el caso del seguimiento de la actividad IGR en *O. fasciatus*¹⁵⁵, las ninfas supervivientes a la aplicación tópica de la muestra se trasvasaron a botes de vidrio de 250 mL, con un vial de agua y dieta de mantenimiento, donde se hizo el seguimiento de su desarrollo. Si se efectuó la metamorfosis y la reproducción, y las ninfas fueron viables, el ensayo se consideró negativo. Por el contrario, la prueba fue positiva cuando se produjo una metamorfosis precoz o cuando se detectó esterilidad en los adultos.

Para evaluar la actividad IGR sobre *C. capitata*¹⁵⁶, se realizó un seguimiento de la fecundidad (número de huevos puestos por hembra y día) y de la fertilidad (porcentaje de eclosión de huevos). Para ello se recogieron los huevos los días 4, 7 y 10 sobre unas bandejas de plástico con agua, se contaron, se sembraron 30 huevos de cada jaula en placas Petri con agar al 0.3% y se realizó la lectura de la eclosión a los 3 días de la siembra. Los experimentos se contrastaron con un control para evaluar las conclusiones.

2.6. Actividad citostática

La actividad citostática se evaluó mediante la inhibición de la proliferación celular de la línea celular NIH 3T3 (fibroblastos de origen embrionario de ratón)¹⁵⁷. Es una línea celular continua de alta inhibición de contacto establecida a partir de cultivos de embriones de ratón Swiss NIH. Estos ensayos se realizaron en el Instituto de Biomedicina de Valencia bajo la supervisión del Dr. Domingo Baretino.

2.7. Actividad citotóxica

Algunas de las fracciones que no dieron actividad positiva frente a los ensayos biológicos descritos anteriormente, también fueron analizadas cromatográficamente y los productos puros aislados fueron sometidos a ensayos de citotoxicidad a nivel de la cadena respiratoria mitocondrial. Los ensayos citotóxicos fueron realizados sobre partículas submitocondriales de corazón de ternera por el Dr. Ernesto Estornell en el Departamento de Bioquímica de la *Universitat de València* y se basaron en la evaluación de la inhibición de los complejos mitocondriales en mamíferos que intervienen en el proceso de la respiración celular¹⁵⁸.

3. Técnicas de aislamiento: cromatografía

3.1. Cromatografía analítica de capa fina (CCF)

Para la cromatografía de capa fina analítica y preparativa se utilizaron cromatofolios de sílica gel 60 F₂₅₄, se observaron con luz UV y se revelaron con varios tipos de reveladores específicos e inespecíficos.

Como reveladores inespecíficos se usaron anisaldehído sulfúrico y/o sulfato de cerio (IV) y como reveladores específicos: Erlich para detectar furanos, Dragendorff para alcaloides, Ninhidrina para aminoácidos, Dittmer para fosfolípidos y Diazo para fenoles.

3.2. Cromatografía líquida de adsorción-desorción en columna abierta (CLC)

El adsorbente que se utilizó fue gel de sílice para cromatografía flash 60 (0.040-0.063 mm). Las fracciones eluidas con disolventes de creciente polaridad se estudiaron por CCF y se agruparon aquéllas que fueron análogas.

3.3. Cromatografía líquida de media presión

Se ha usado un cromatógrafo de media presión Biotage SP1 empleando columnas de silicagel, conectado a un detector UV de longitud de onda a 254 nm y un colector de fracciones.

3.4. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Se ha usado un cromatógrafo Waters con una bomba binaria 600 conectado en serie a varios detectores: un detector UV Photodiode Array Detector 2996 (PDA), un detector de índice de refracción 2414 y un detector de evaporación-dispersión ELSD 2420.

Las columnas utilizadas en fase reversa han sido Spherisorb ODS2 C18 de 5 μm (25.0 x 0.7 cm) y Tracer Exel 120 ODS-B C18 de 5 μm (25.0 x 1 cm) para cromatografía semipreparativa y Explore Luna (Phenomenex) C18 de 5 μm (25.0 x 0.46 cm), Tracer Exel 120 ODS-B C18 de 4 μm (25.0 x 0.46 cm) y Kromasil C18 de 5 μm (25.0 x 0.46 cm) para cromatografía analítica. En el caso de fase directa se emplearon las columnas Kromasil Si de 5 μm (25.0 x 1 cm) para cromatografía semipreparativa y Kromasil Si de 5 μm (25.0 x 0.46 cm) para cromatografía analítica.

4. Técnicas de elucidación: espectrometría y espectroscopía

4.1. Espectrometría de masas (LC-MS)

Los espectros de masas se obtuvieron por la técnica de ionización por electro-spray (ES) en un espectrómetro Waters ZMD acoplado a un HPLC Waters 1525 con una bomba binaria y un detector UV Photodiode Array Detector 996.

4.2. Espectrometría de masas de alta resolución (HRMS)

Los datos de HRMS se consiguieron en un espectrómetro Fisons VG Autospec (GC 8000) mediante la técnica de impacto electrónico (EI) o bombardeo rápido de átomos (FAB) y en un espectrómetro Micromass Q-TOF Micro acoplado a un HPLC Waters Alliance 2695, mediante la técnica de ionización por electro-spray.

4.3. Espectroscopía de infrarrojo (IR)

Los espectros de IR se obtuvieron en forma de película líquida en un espectrómetro Nicolet 710 FT-IR, que abarca la región de 4000-600 cm^{-1} . Se indicaron las ν_{max} para las bandas de absorción principales.

4.4. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)

Los espectros de RMN unidimensionales (^1H , ^{13}C y DEPT) y bidimensionales homonucleares ^1H - ^1H (COSY, NOESY) fueron registrados en un espectrómetro Bruker AV 300 MHz, mientras que los espectros de RMN de dos dimensiones heteronucleares ^1H - ^{13}C (HSQC y HMBC) fueron registrados o en un espectrómetro Varian Unity 400 MHz o en un Bruker DPX 600 MHz. Los desplazamientos químicos se expresaron en δ (ppm), usando TMS como patrón interno estándar y la constante de acoplamiento (J) en Hz. La determinación de la multiplicidad en los espectros de ^{13}C RMN se realizó mediante la técnica de DEPT.

5. Rotación óptica

Los valores de la rotación óptica se determinaron en un polarímetro Jasco P-1030 utilizando la luz de longitud de onda correspondiente a la línea D del espectro de emisión del sodio.

RESULTADOS

[04]

1. *Aspergillus ochraceus* Wilhelm

1.1 Cultivo del hongo y obtención de los extractos

Con el cultivo de la cepa de *Aspergillus ochraceus* en 30 L de medio ATB se obtuvieron 5.2 g de extracto seco a partir del caldo y 27.2 g de extracto DCM del micelio, tal como se describe en el apartado 1 de Material y métodos.

1.2 Actividades biológicas de los extractos

Los extractos orgánicos se sometieron a los ensayos de actividades biológicas descritos en el apartado 2 de Material y métodos, resultando el extracto del caldo significativamente activo como citostático con una $CI_{50}=20 \mu\text{g/mL}$ por lo que se procedió a su estudio.

1.3 Estudio del extracto orgánico del caldo

5.2 g del extracto orgánico del caldo se fraccionaron en columna abierta sobre un relleno de sílice (1 g muestra x 80 g sílice), usando eluyentes de polaridad creciente, desde DCM hasta MeOH. Se obtuvieron 8 fracciones cuyos pesos y disolventes se indican en la tabla 3.

Fracción	Volumen (L)	Eluyente	Peso (mg)
FI	1	DCM	67.8
FII	1	DCM/AcOEt:7/3	39.4
FIII	1	DCM/AcOEt:5/5	169.9
FIV	1	DCM/AcOEt:2/8	131.8
FV	1	AcOEt	132.3
FVI	1	AcOEt/MeOH:96/4	942
FVII	1	AcOEt/MeOH:8/2	1249
FVIII	1	MeOH	1093

Tabla 3. Fraccionamiento en columna del extracto del caldo de *Aspergillus ochraceus*

1.4 Actividades biológicas de las fracciones

Las fracciones cromatográficas del extracto orgánico del caldo se ensayaron como citostáticas, destacando la fracción V que mostró una $CI_{50}=9 \mu\text{g/mL}$ y se procedió al aislamiento e identificación de los componentes causantes de dicha actividad.

1.5 Aislamiento e identificación de los compuestos de las fracciones seleccionadas

1.5.1 Estudio de la fracción V

Aislamiento

La fracción V (132 mg) se sometió a cromatografía líquida en columna abierta sobre sílice (1:100 p/p) usando como fase móvil DCM/MeOH:96/4. La mezcla se fraccionó en alícuotas de 3 mL, las cuales se reunieron en 11 subfracciones de acuerdo con su similitud en CCF. La subfracción 6 (FV-6) se analizó por HPLC y se procedió a su purificación (21.1 mg) por HPLC en columna semipreparativa siguiendo las siguientes condiciones: columna Spherisorb ODS2 C18, 5 μ m (25.0 x 0.7 cm); fase móvil MeOH/H₂O (70/30, v/v); flujo, 1 mL/min. Se obtuvo un producto puro, FV-6-A (15.7 mg) con un tiempo de retención de 13.62 min.

Identificación del compuesto FV-6-A

El espectro de masas por FAB de alta resolución (Fig 31) presenta un pico molecular (M^+) a m/z 430.7553, lo que permite asignar al compuesto la fórmula molecular C₂₆H₂₉O₃N₃, indicando la presencia de 14 insaturaciones y un número impar de átomos de nitrógeno. Los fragmentos más destacables según el espectro de masas por EI son: m/z (intensidad relativa): 431 (52.9), 416 (80.6), 279 (23.7), 167 (37.5), 149 (100), 129 (30.2), 83.5 (40.7), 71.5 (49.7) y 57.6 (94.5).

El espectro de ¹H RMN (300 MHz, DMSO *d*) (Fig 32) muestra las siguientes señales: δ 10.44 (1H, s, H-9), 8.68 (1H, s, H-25), 7.09 (1H, *d*, $J=8.4$, H-17), 6.92 (1H, *d*, $J=9.6$, H-12), 6.47 (1H, *d*, $J=8.4$, H-18), 5.72 (1H, *d*, $J=9.6$, H-13), 3.40-3.30 (3H, *m*, H-1a, H-1b, H-21a), 2.63 (1H, *d*, $J=15.6$, H-21b), 2.50 (1H, *m*, H-6), 2.42 (1H, *m*, H-3a), 2.10-1.90 (3H, *m*, H-3b, H-2a, H-2b), 1.90-1.70 (2H, *m*, H-5a, H-5b), 1.37 (6H, s, CH₃-29, CH₃-30), 1.28 (3H, s, CH₃-28) y 1.00 (3H, s, CH₃-27) ppm.

El espectro de ¹³C RMN (75 MHz, DMSO *d*) (Fig 33) muestra las siguientes señales: δ 173.42 (C-23), 168.83 (C-26), 147.85 (C-16), 139.95 (C-8), 133.52 (C-10), 129.33 (C-13), 121.88 (C-19), 118.53 (C-12), 117.91 (C-17), 108.99 (C-18), 105.22 (C-20), 104.22 (C-11), 75.38 (C-14), 66.35 (C-4), 60.02 (C-22), 49.57 (C-6), 43.91 (C-1), 34.96 (C-7), 30.46 (C-3), 29.07 (C-5), 28.35 (C-30), 27.47 (C-29), 27.42 (C-27), 24.39 (C-21), 24.15 (C-2) y 21.89 (C-28) ppm.

Los datos espectroscópicos coinciden con los datos descritos en literatura del (+) **stephacidin A**¹⁵⁹. Este alcaloide fue descrito por Cutrone *et al.* en 2001 a partir de *A. ochraceus* ATCC-74432 y patentado como anticancerígeno, frente a tumores de mama, ovario, colon, pulmón y próstata, y como antibiótico¹⁶⁰. Stephacidin A está relacionado estructuralmente con el producto natural avrainvillamida, aislado por primera vez por Fenical *et al.*¹⁶¹ en el año 2000 a partir de una cepa marina de *A. ochraceus*, la cual también muestra actividad citotóxica frente a la línea celular del tumor humano de colon HCT-116 a una CI₅₀=2 μ g/mL.

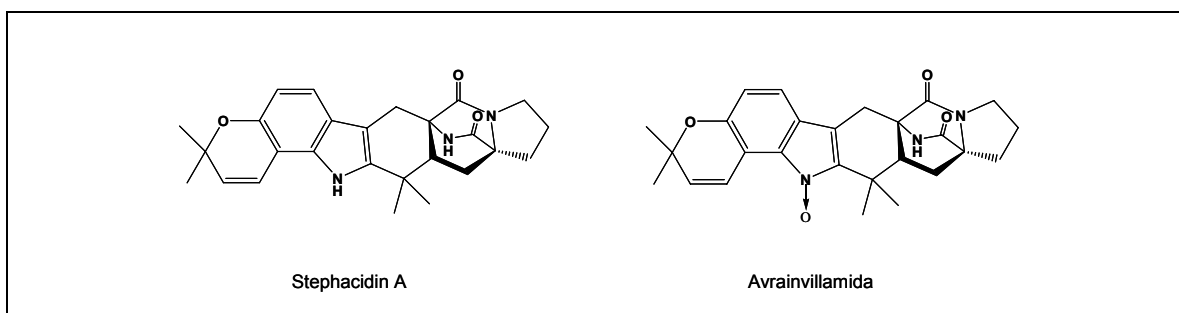
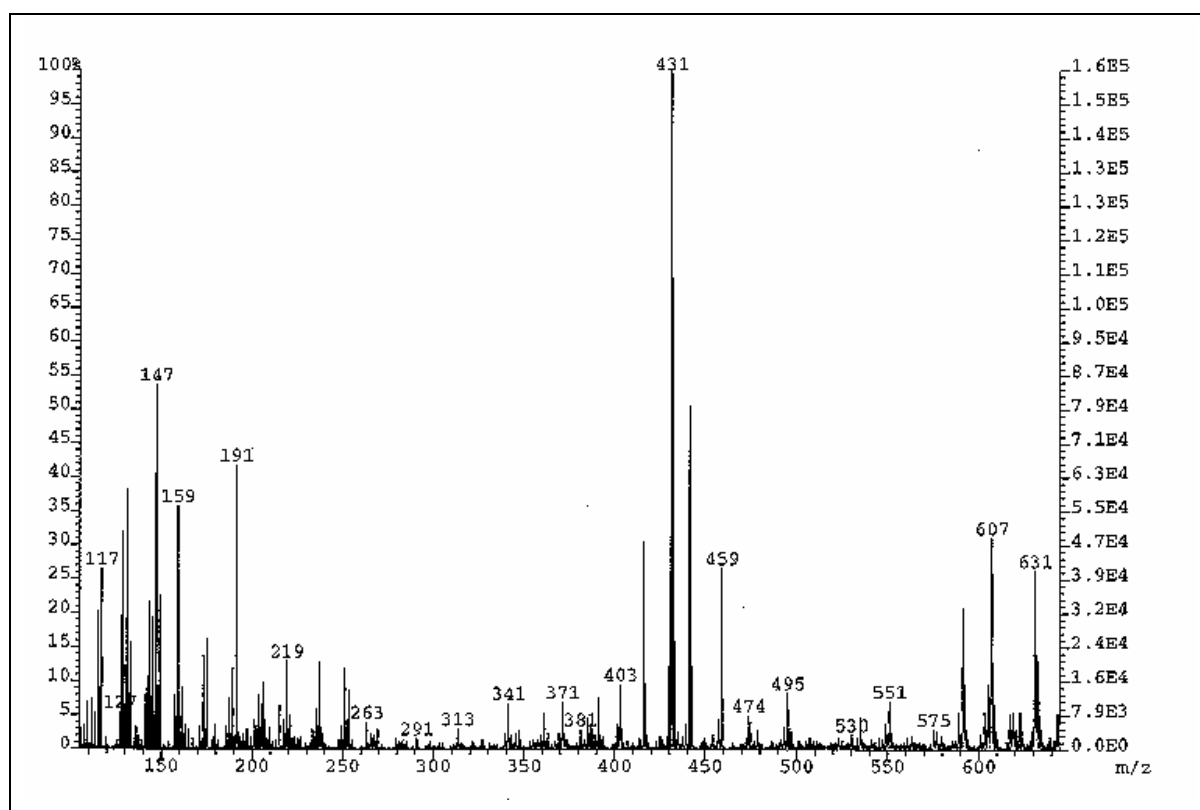
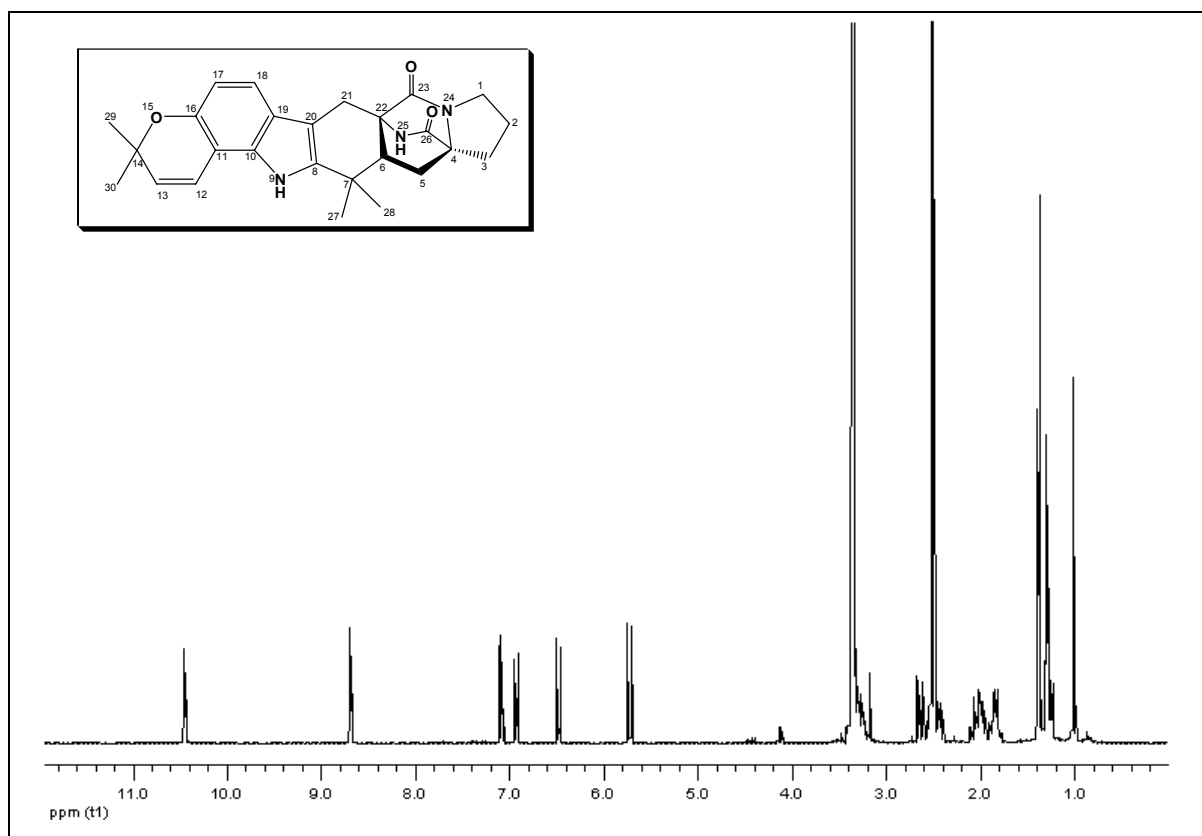
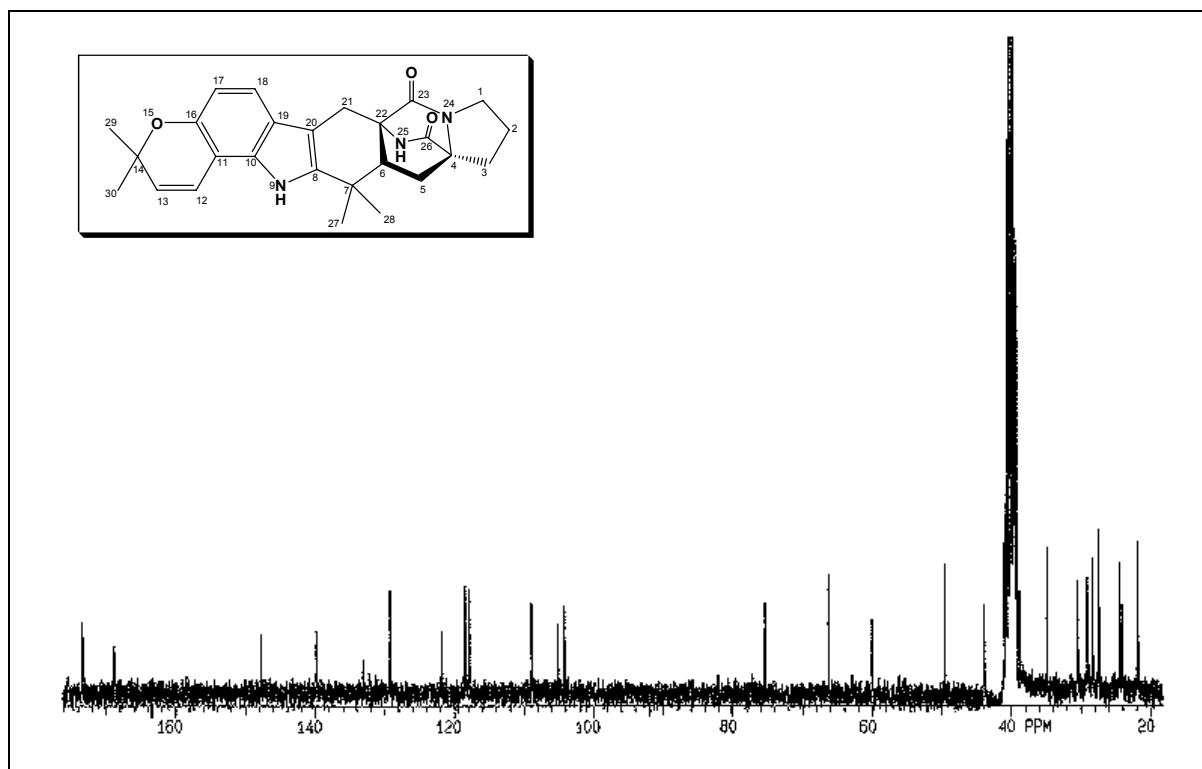
Fig 30. Estructura de (+) stephacidin A y avrainvillamida aislados a partir de *A. ochraceus*

Fig 31. FABHRMS de FV-6-A ((+) stephacidin A)

Fig 32. ^1H RMN 300 MHz de FV-6-A ((+) stephacidin A) en $\text{DMSO-}d_6$ Fig 33. ^{13}C RMN 300 MHz de FV-6-A ((+) stephacidin A) en $\text{DMSO-}d_6$

1.5.2 Estudio de la fracción IV

Aislamiento

La fracción IV (130 mg) se sometió a cromatografía líquida en columna abierta sobre sílice (1:100 p/p) usando como fase móvil DCM/MeOH:98/2. La mezcla se fraccionó en alícuotas de 3 mL, las cuales se reunieron en 10 subfracciones de acuerdo con su similitud en CCF. Las subfracciones 4 (FIV-4) y 5 (FIV-5) se analizaron por HPLC y se procedió a su purificación por HPLC en columna semipreparativa.

FIV-4 (18.3 mg) se purificó siguiendo las siguientes condiciones: columna Spherisorb ODS2 C18, 5 μ m (25.0 x 0.7 cm); fase móvil MeOH/H₂O (70/30, v/v); flujo, 1 mL/min. Se obtuvieron dos productos puros: FIV-4-A (2.5 mg) con un tiempo de retención de 11.45 min y FIV-4-B (1.2 mg) con un tiempo de retención de 19.89 min.

FIV-5 (5.8 mg) se purificó usando la misma columna y las mismas condiciones que para la subfracción anterior obteniéndose un producto puro FIV-5-A (5.0 mg) con un tiempo de retención de 14.53 min.

Identificación del compuesto FIV-4-A

El espectro de masas por ES positivo presenta un pico molecular (M+1) a m/z 364.18 y por ES negativo muestra un pico molecular (M-1) a m/z 362.06, lo que permite asignar la siguiente fórmula molecular C₂₀H₁₇N₃O₄.

El espectro de ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) (Fig 35) muestra las siguientes señales: δ 8.00 (1H, *ddd*, $J=7.6, 1.6, 0.4$, H-4), 7.60 (1H, *m*, H-6), 7.58 (1H, *m*, H-7), 7.55 (1H, *m*, H-5), 7.20 (1H, *d*, $J=2.7$, H-12), 6.90 (1H, *d*, $J=2.7$, H-14), 4.57 (1H, *dd*, $J=7.8, 1.8$, H-19), 3.93 (3H, *s*, CH₃-23), 3.82 (1H, *m*, H-22a), 3.62 (1H, *m*, H-22b), 3.08 (1H, *m*, H-20a), 2.28 (1H, *m*, H-21a), 2.23 (1H, *m*, H-20b) y 2.08 (1H, *m*, H-21b) ppm.

El espectro de ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) (Fig 36) muestra las siguientes señales: δ 164.43 (C-2), 161.14 (C-10), 160.12 (C-13), 152.67 (C-15), 151.44 (C-18), 133.22 (C-8), 132.39 (C-3), 130.83 (C-6), 129.99 (C-4), 129.12 (C-16), 128.86 (C-5), 128.46 (C-7), 122.07 (C-11), 107.47 (C-11), 98.92 (C-12), 58.58 (C-19), 55.88 (C-23), 45.53 (C-22), 27.11 (C-20) y 23.78 (C-21) ppm.

Estos datos espectroscópicos coinciden con los datos descritos en bibliografía de (-) **circumdatin E**¹⁶², benzodiazepina que pertenece a una familia de alcaloides llamadas circumdatinas y descubiertas por Frisvad *et al.* en 1999¹⁶³. La mayoría de las benzodiazepinas de origen natural han sido aisladas a partir de hongos filamentosos y actinomicetos del género *Penicillium*, *Aspergillus* y *Streptomyces*. A partir de *Aspergillus* sp., se han purificado algunas benzodiazepinas como la aszonalenina de *A. zonatus*, benzodiazepinediona de *A. flavipes* y las

asperlicinas de *A. alliaceus*; un derivado de éstas últimas se usa terapéuticamente para el tratamiento de desórdenes gastrointestinales y del SNC.

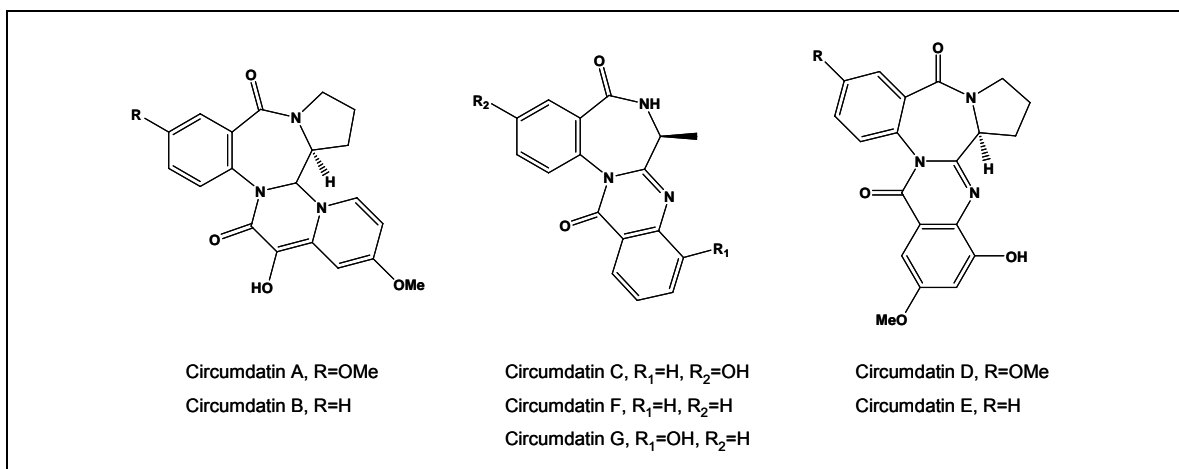


Fig 34. Estructuras de la familia circumdatin¹⁶²⁻¹⁶⁴

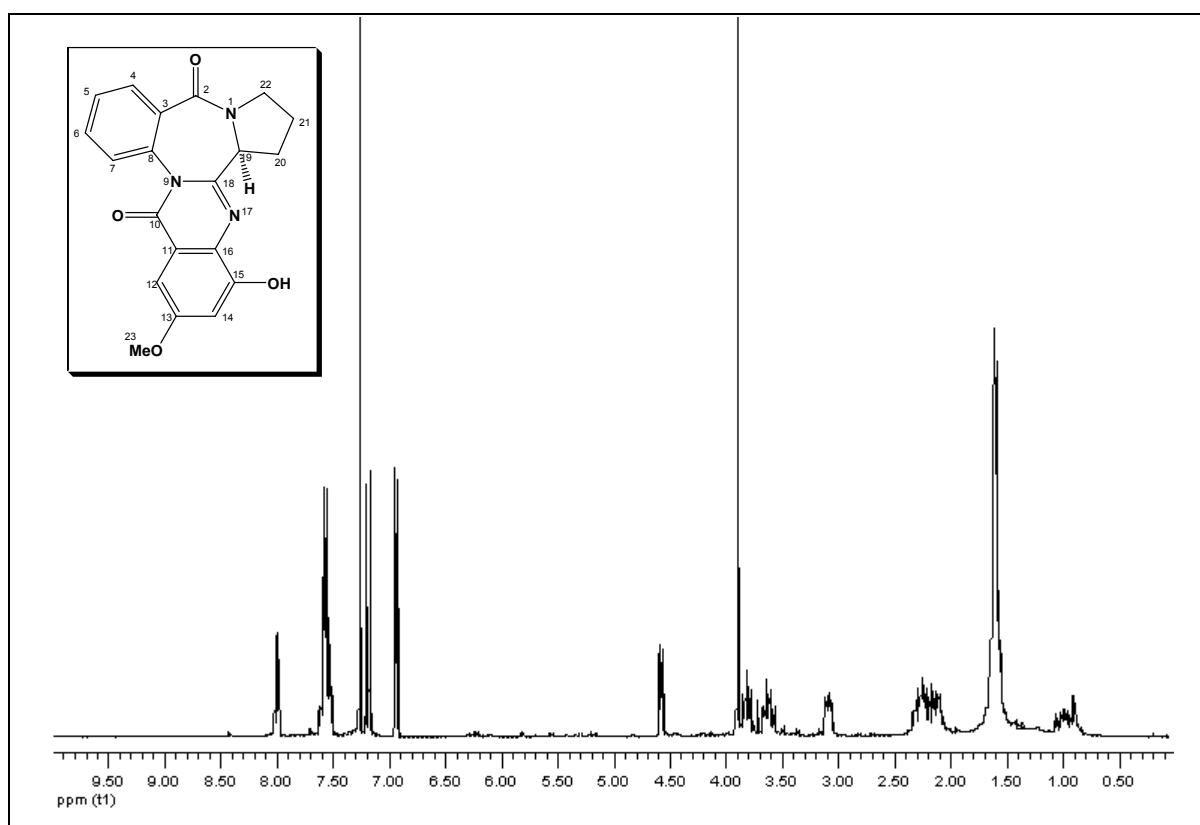


Fig 35. ¹H RMN 300 MHz de FIV-4-A ((-) circumdatin E) en CDCl₃

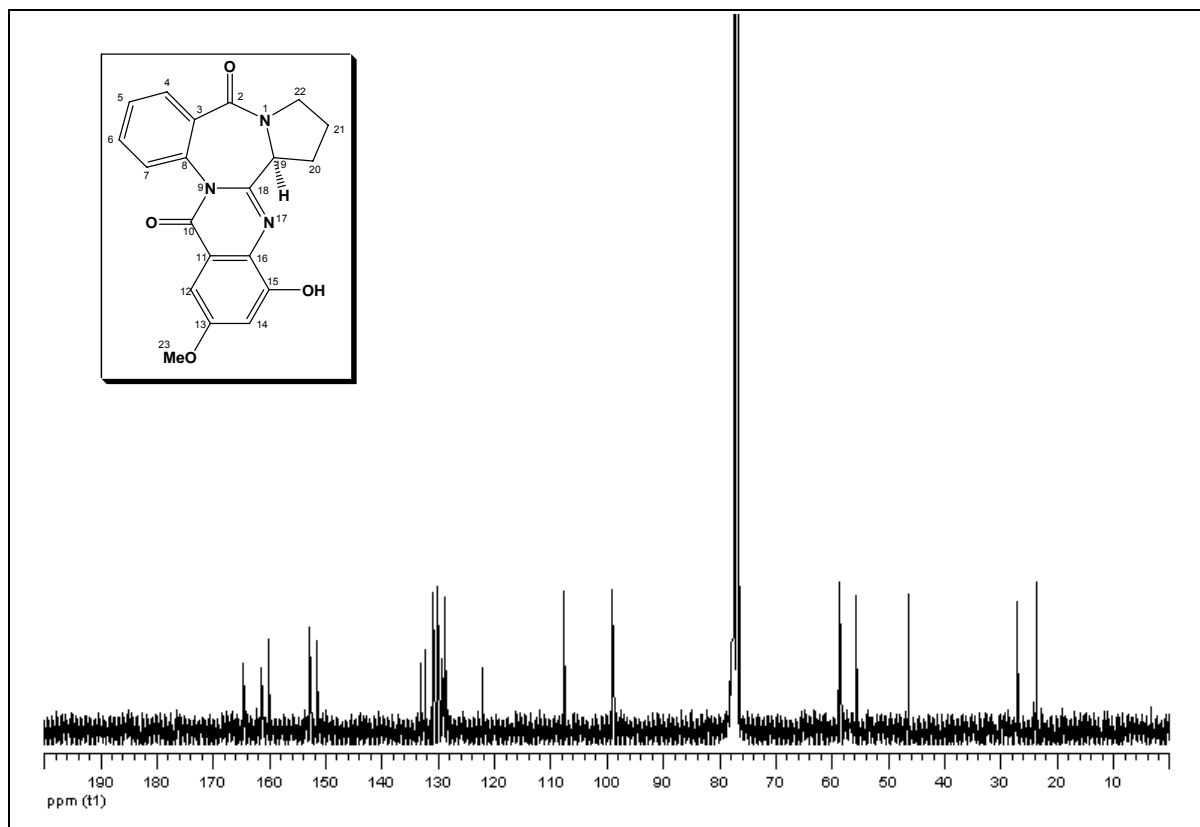


Fig 36. ^{13}C RMN 300 MHz de FIV-4-A (-) circumdatin E) en CDCl_3

Identificación del compuesto FIV-4-B

El espectro de masas por ES positivo presenta un pico molecular ($M+1$) a m/z 348.18, confirmado por el espectro de masas de alta resolución (EIHRMS; M^+ con una masa molecular encontrada de 347.1364 y con una masa calculada para $\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_3$ de 347.1269) lo que permite asignar al compuesto dicha fórmula molecular. Los fragmentos más destacables según EIHRMS son: m/z 347.1364 (100), 279.0821 (90.1), 201.1129 (10.3) y 161.9954 (10.1) (Fig 38).

El espectro de ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) (Fig 39) muestra las siguientes señales: δ 8.00 (1H, *dd*, $J=7.2$, 1.1, H-4), 7.68 (1H, *d*, $J=2.9$, H-12), 7.65 (1H, *d*, $J=8.9$, H-15), 7.57 (2H, *m*, H-6, H-7), 7.55 (1H, *m*, H-5), 7.38 (1H, *dd*, $J=8.9$, 2.9, H-14), 4.54 (1H, *brd*, $J=7.5$, H-19), 3.93 (3H, *s*, CH_3 -23), 3.79 (1H, *m*, H-22b), 3.62 (1H, *m*, H-22a), 3.16 (1H, *m*, H-20a), 2.32 (1H, *m*, H-21a), 2.18 (1H, *m*, H-20b) y 2.08 (1H, *m*, H-21b) ppm.

El espectro de ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3) (Fig 40) muestra las siguientes señales: δ 165.12 (C-2), 162.53 (C-10), 159.0 (C-13), 153.72 (C-18), 141.75 (C-16), 134.22 (C-8), 133.13 (C-3), 131.14 (C-6), 130.32 (C-4), 129.61 (C-15), 129.00 (C-5), 128.82 (C-7), 125.31 (C-14), 124.24 (C-11), 107.35 (C-12), 59.20 (C-19), 56.32 (C-23), 46.81 (C-22), 27.44 (C-20) y 24.12 (C-21) ppm.

No hay referencias en la bibliografía sobre este compuesto, así que se procede a la interpretación del resto de los datos espectroscópicos que conducen a la estructura propuesta para FIV-4-B.

La gran similitud existente entre los datos espectrales de este compuesto y los que presentan los compuestos del grupo de las circumdatinas, permite deducir que se trata de una molécula perteneciente a esta familia aunque de menor polaridad que el compuesto circumdatin E. La estructura de FIV-4-B se determina por comparación de sus datos espectroscópicos de ^1H RMN y ^{13}C RMN con los datos de otras circumdatinas y se confirma con los experimentos de dos dimensiones (COSY ^1H - ^1H (Fig 42), HSQC (Fig 43) y HMBC (Fig 44)). Su fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_3$ determinada por HREIMS, indica que FIV-4-B tiene un átomo menos de oxígeno que el compuesto circumdatin E. Esta molécula también presenta una estructura constituida por una benzodiazepina derivada de una molécula de prolina y de ácido antranílico unida a una unidad de ácido metoxiantranílico.

El estudio de los espectros COSY y HMBC (Tabla 4) indica la presencia de tres protones aromáticos en el anillo D (δ 7.68, *d*, *J* = 2.9 Hz; 7.65, *d*, *J* = 8.9 Hz; 7.38, *dd*, *J* = 8.9, 2.9 Hz) en lugar de los dos protones aromáticos que presentan las circumdatinas D y E, así como un grupo metoxilo en el C-13 de este mismo anillo, según las correlaciones ^1H - ^{13}C a larga distancia (C-13-H-23, C-13-H-15, C-16-H-14, C-14-H-12) observadas en el espectro HMBC y de acuerdo con la correlación ^1H - ^1H que se aprecia en el NOESY entre H-23 y H-12 (Fig 45).

La estereoquímica del C-19 se asigna por comparación del valor de poder rotatorio $[\alpha]_D^{25} = -26.3^\circ$ (*c* 0.078, MeOH) con otras circumdatinas. El espectro UV en MeOH presenta los siguientes máximos de absorción: λ_{max} ($\log \epsilon$) 329 (3.08), 276 (2.61) y 230 (2.04) nm característicos de este tipo de esqueletos¹⁶³, y el espectro IR muestra una banda de absorción a ν_{max} 1685 cm^{-1} típica de amidas, otra a ν_{max} 1644 cm^{-1} propia de lactamas de seis y siete miembros y otra banda a ν_{max} 1618 cm^{-1} característica del enlace conjugado C=N.

A la vista de la discusión realizada, se ha propuesto la siguiente estructura (Fig 37) para FIV-4-B, que ha sido aislada por primera vez de fuentes naturales. Este compuesto ha sido denominado **(-)** circumdatin H, siguiendo el orden de las circumdatinas ya descritas. Esta nueva molécula se diferencia únicamente de la circumdatin E por la ausencia del grupo hidroxilo en posición 15, lo que podría justificar su menor polaridad.

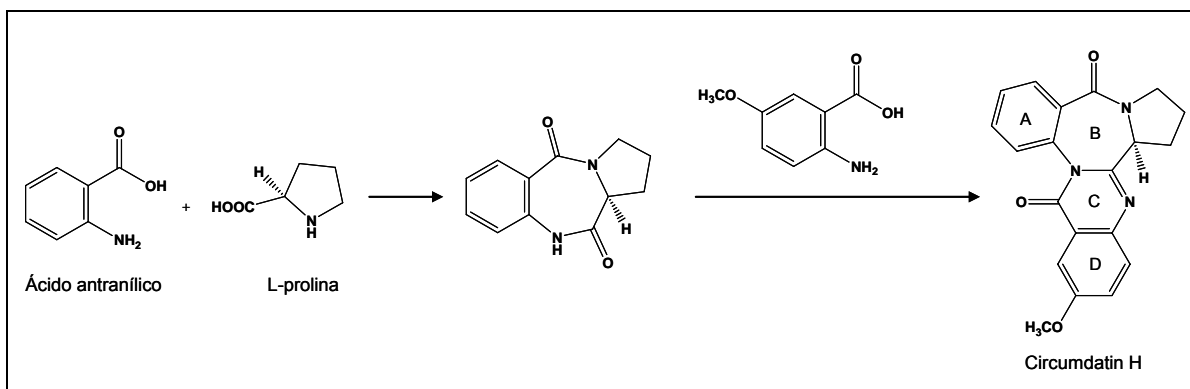


Fig 37. Ruta biosintética y estructura del compuesto circumdatin H

	δ_H (<i>mult</i> , J Hz)	δ_C (<i>mult</i> , DEPT)	Correlación	
			$^1H-^1H$ (COSY)	$^1H-^{13}C$ (HMBC)
2	-	165.12 (C)	-	8.00 (H-4)
3	-	133.13 (C)	-	7.57 (H-7), 8.00 (H-4)
4	8.00 (<i>dd</i> , 7.2, 1.1)	130.32 (CH)	7.55 (H-5)	-
5	7.55 (<i>m</i>)	129.0 (CH)	8.00 (H-4), 7.57 (H-6)	-
6	7.57 (<i>m</i>)	131.14 (CH)	7.55 (H-5)	8.00 (H-4)
7	7.57 (<i>m</i>)	128.82 (CH)	7.55 (H-5)	7.55 (H-5)
8	-	134.22 (C)	-	-
10	-	162.53 (C)	-	-
11	-	124.24 (C)	-	7.65 (H-15)
12	7.68 (<i>d</i> , 2.9)	107.35 (CH)	-	-
13	-	159.0 (C)	-	7.65 (H-15), 3.93 (H-23)
14	7.38 (<i>dd</i> , 8.9, 2.9)	125.31 (CH)	7.65 (H-15)	7.68 (H-12)
15	7.65 (<i>d</i> , 8.9)	129.61 (CH)	7.38 (H-14)	-
16	-	141.75 (C)	-	7.38 (H-14)
18	-	153.72 (C)	-	4.54 (H-19), 2.18 (H-20b)
19	4.54 (<i>brd</i> , 7.5)	59.20 (CH)	3.16 (H-20a), 2.18 (H-20b)	-
20a	3.16 (<i>m</i>)	27.44 (CH ₂)	4.54 (H-19), 2.18 (H-20b), 2.32 (H.21a), 2.08 (H-21b)	-
20b	2.18 (<i>m</i>)		4.54 (H-19), 3.16 (H-20a), 2.32 (H.21a), 2.08 (H-21b)	
21a	2.32 (<i>m</i>)	24.12 (CH ₂)	3.62 (H-22a), 3.79 (H-22b), 3.16 (H-20a), 2.18 (H-20b), 2.08 (H-21b)	4.54 (H-19)
21b	2.08 (<i>m</i>)		3.62 (H-22a), 3.79 (H-22b), 3.16 (H-20a), 2.32 (H-21a), 2.18 (H-20b)	
22a	3.62 (<i>m</i>)	46.81 (CH ₂)	3.79 (H-22b), 2.32 (H-21a), 2.08 (H-21b)	-
22b	3.79(<i>m</i>)		3.62 (H-22a), 2.32 (H-21a), 2.08 (H-21b)	
23	3.93 (<i>s</i>)	56.32 (CH ₃)	-	-

Tabla 4. 1H RMN, ^{13}C RMN y correlaciones $^1H-^1H$ (COSY) y $^1H-^{13}C$ (HMBC) de FIV-4-B ((-) circumdatin H) en $CDCl_3$

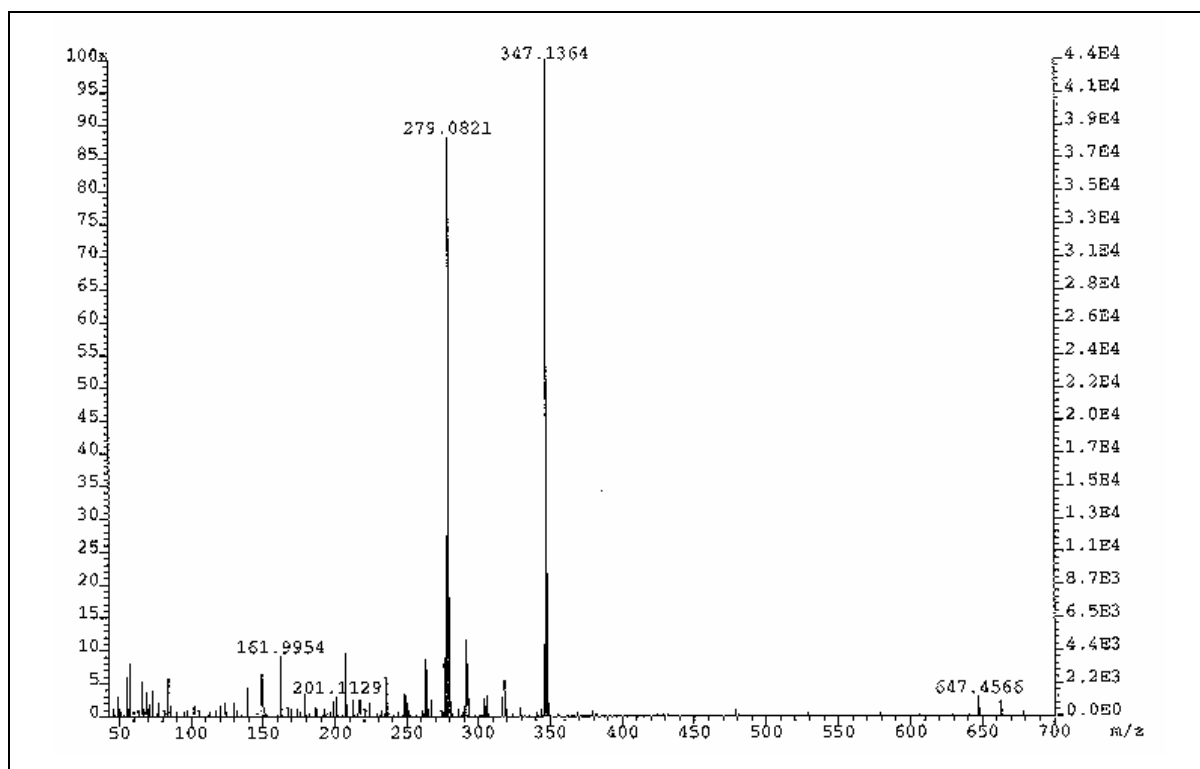
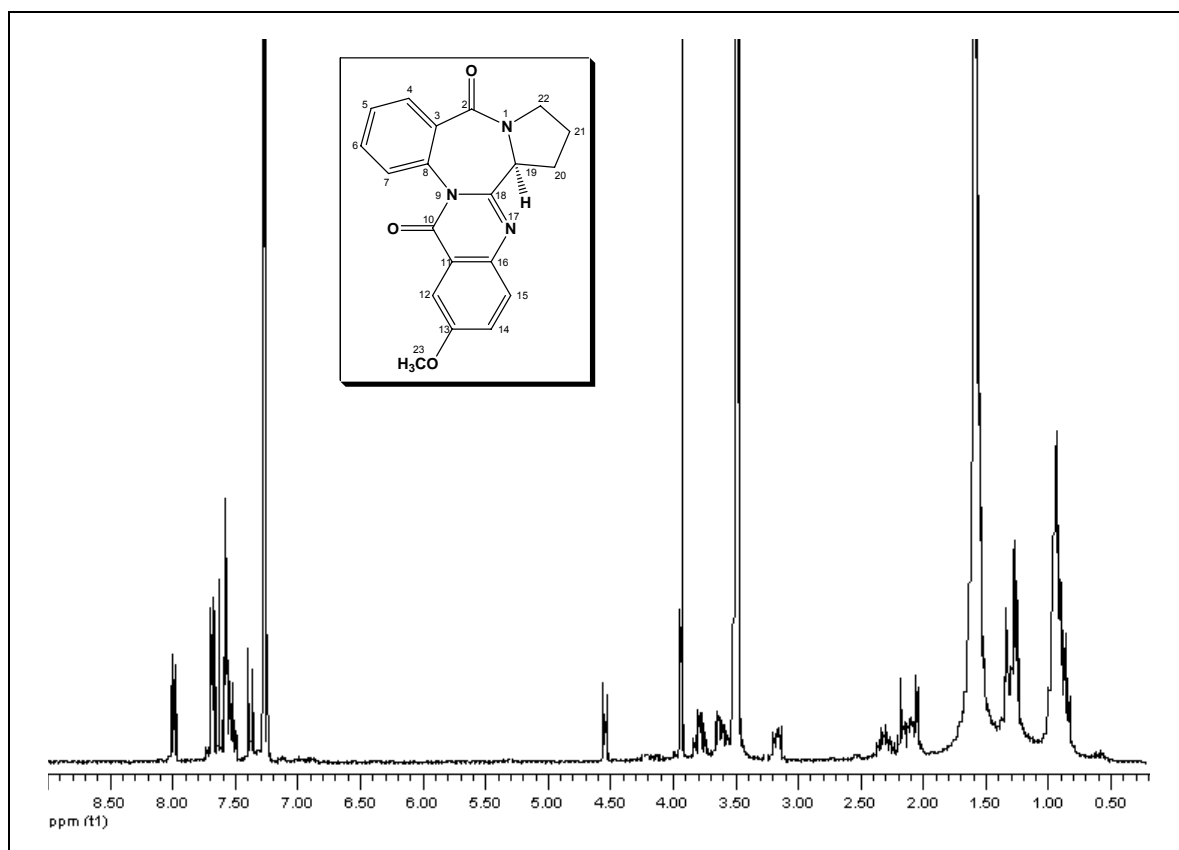
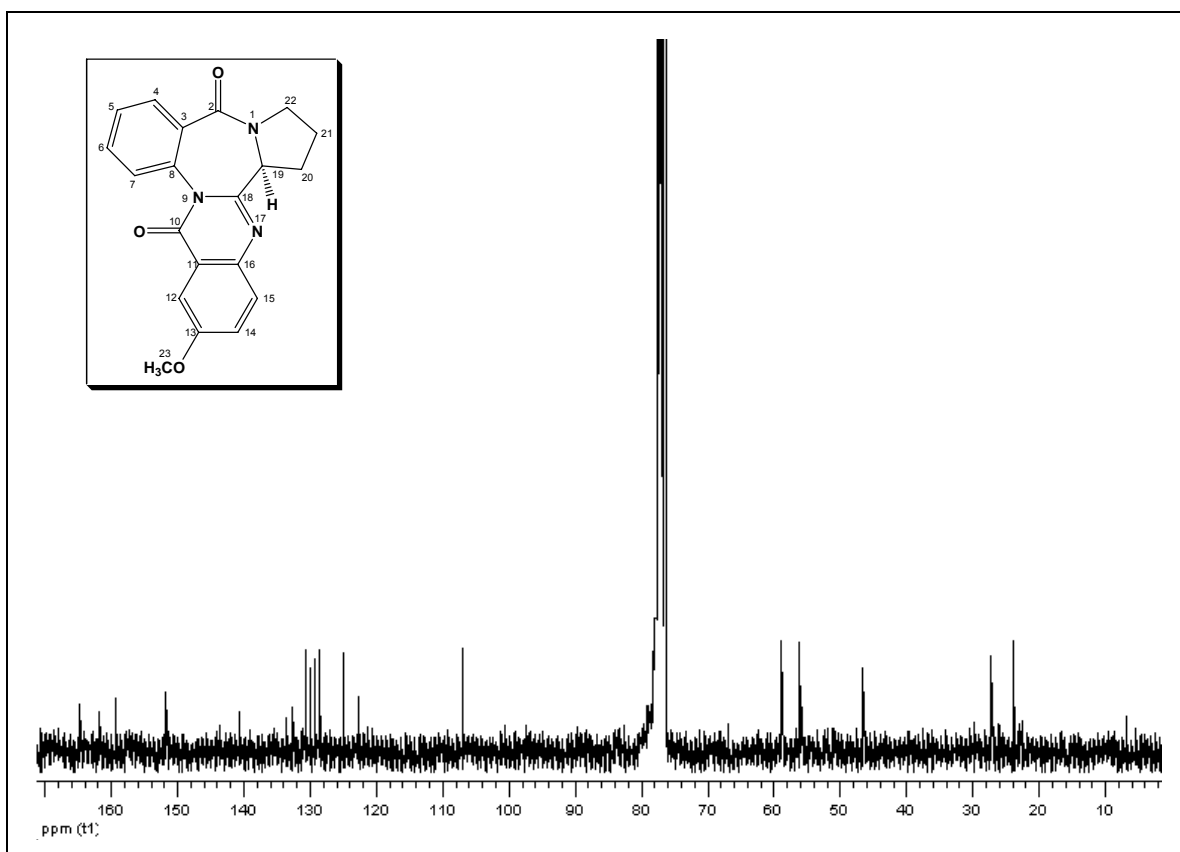
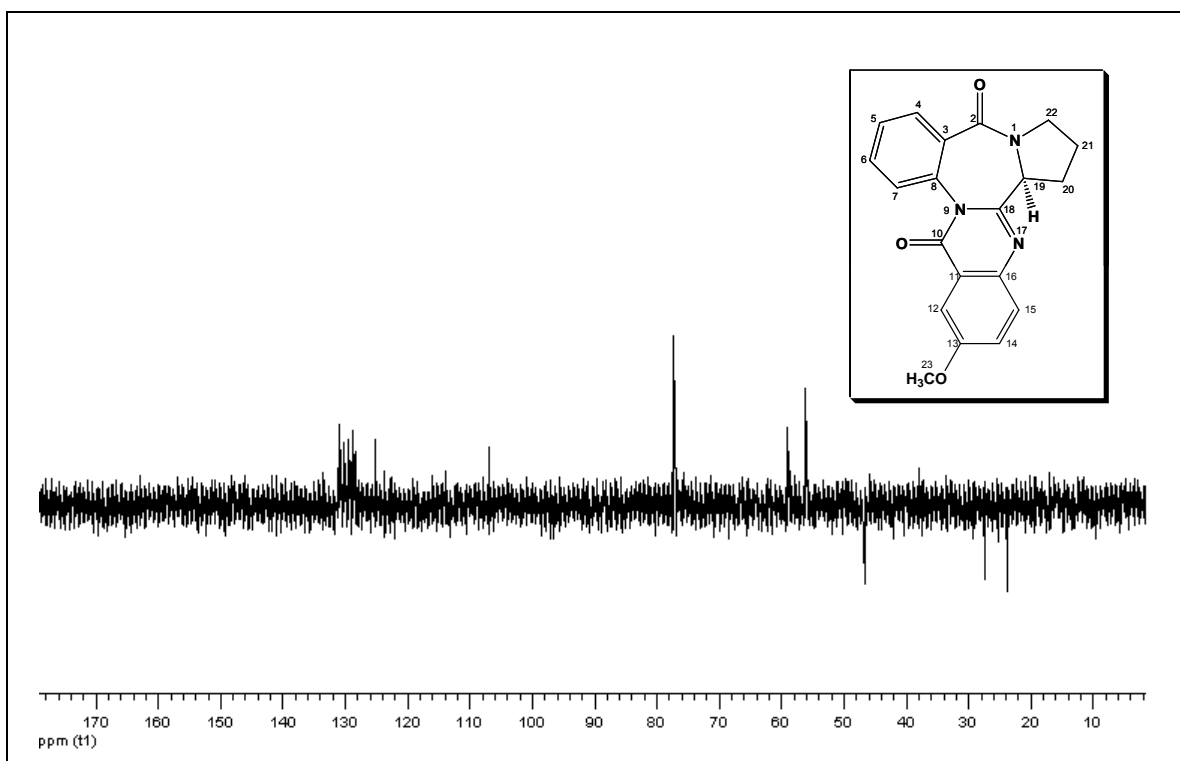
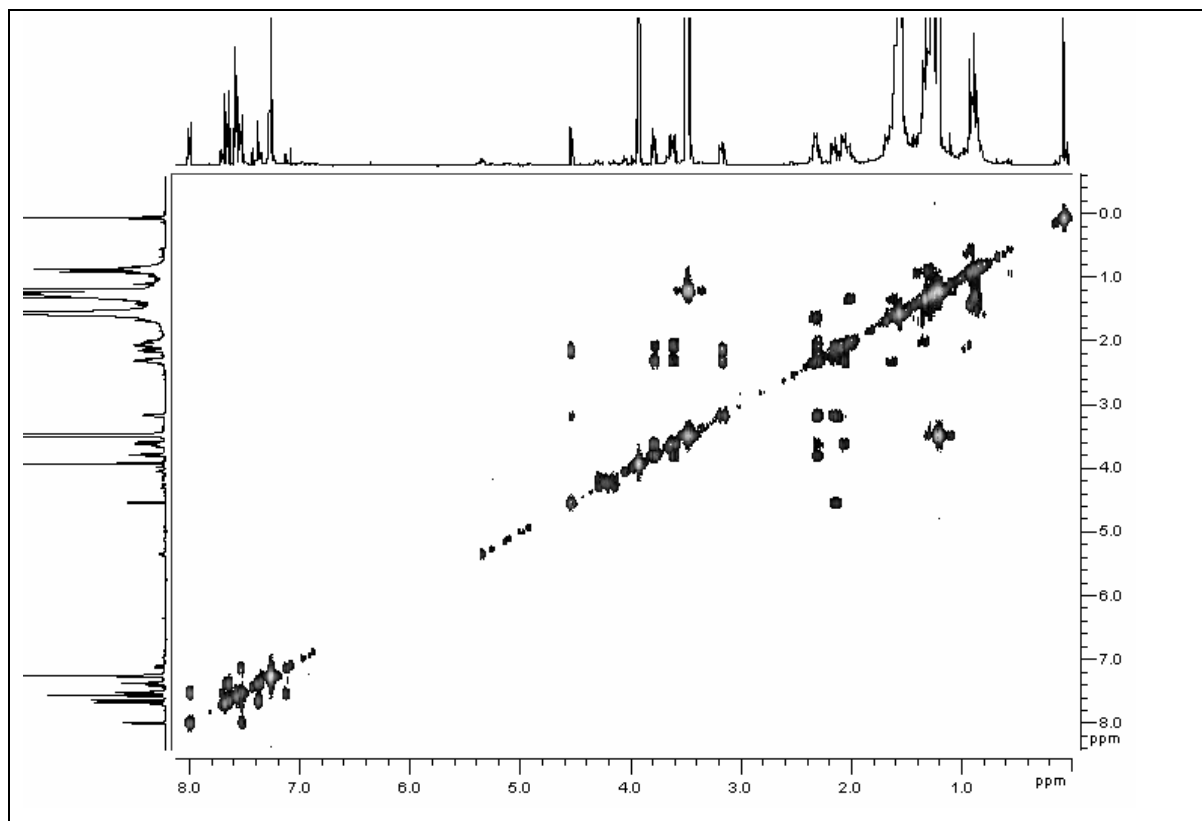
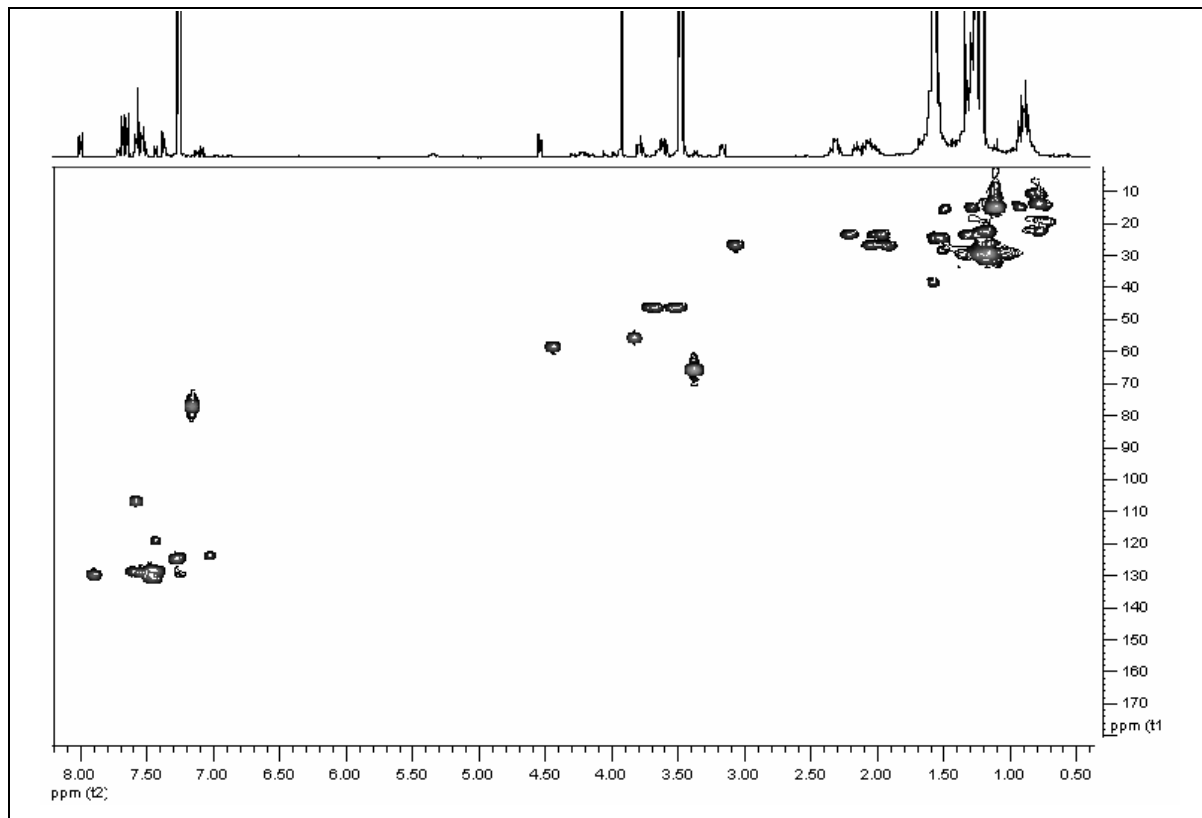
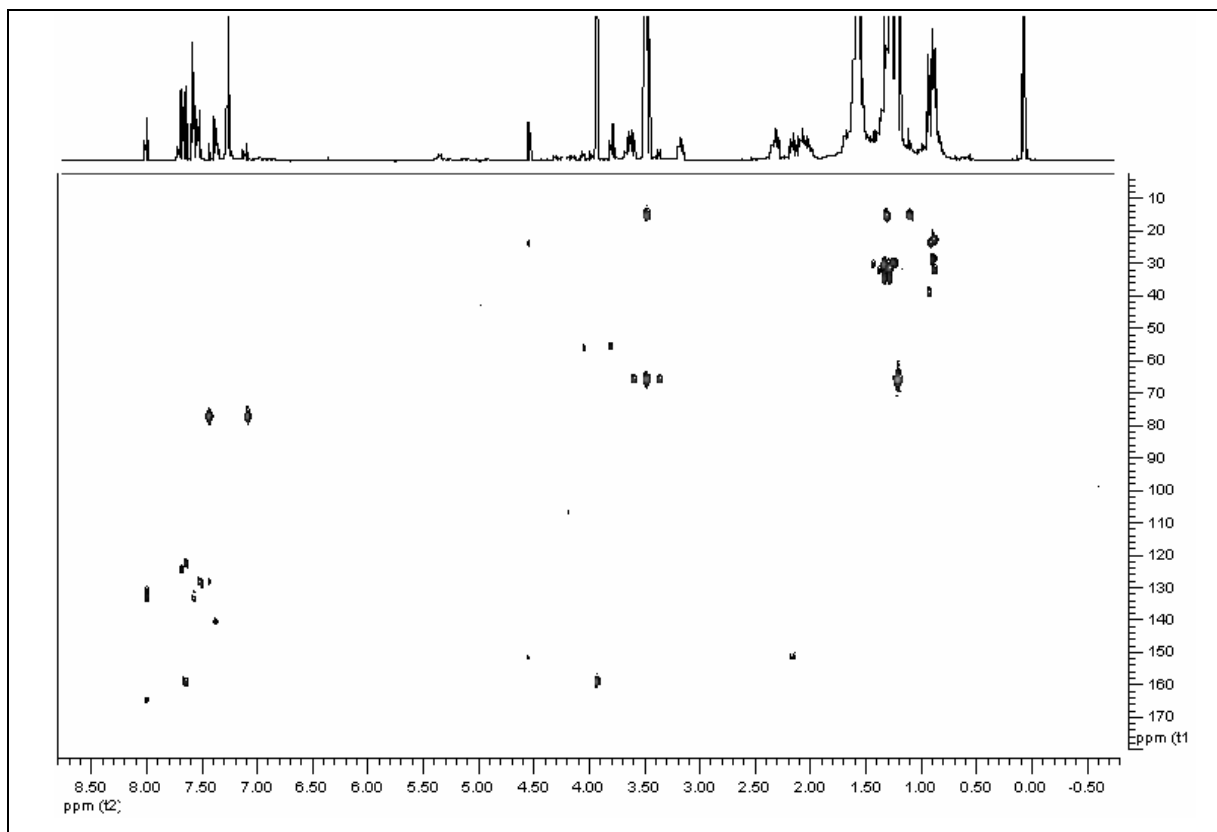
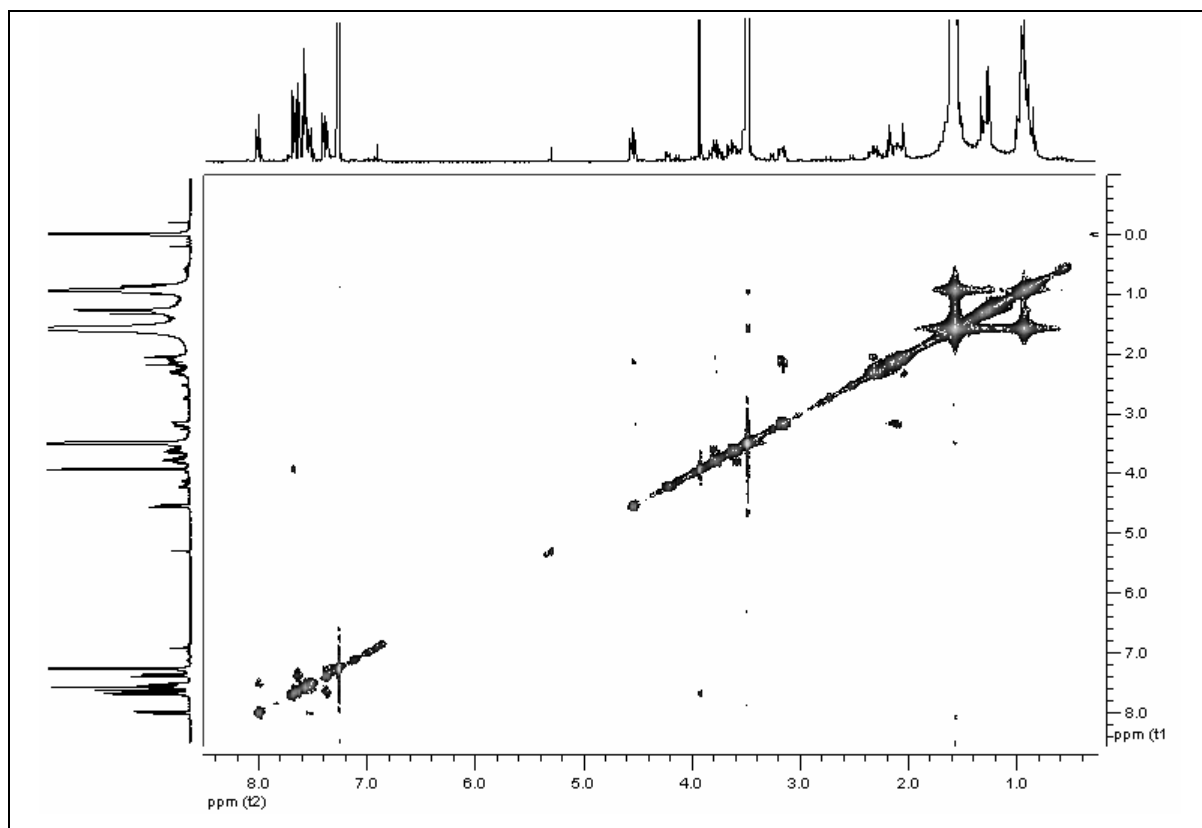


Fig 38. EIHRMS de FIV-4-B ((-) circumdatin H)

Fig 39. ¹H RMN 300 MHz de FIV-4-B ((-) circumdatin H) en CDCl₃

Fig 40. ^{13}C RMN 300 MHz de FIV-4-B ((-)-circumdatin H) en CDCl_3 Fig 41. DEPT 300 MHz de FIV-4-B ((-)-circumdatin H) en CDCl_3

Fig 42. COSY 600 MHz de FIV-4-B ((-)-circumdatin H) en CDCl_3 Fig 43. HSQC 600 MHz de FIV-4-B ((-)-circumdatin H) en CDCl_3

Fig 44. HMBC 600 MHz de FIV-4-B (-) circumdatin H) en CDCl_3 Fig 45. NOESY 300 MHz de FIV-4-B (-) circumdatin H) en CDCl_3

Identificación del compuesto FIV-5-A

El espectro de masas por EI de alta resolución (Fig 47) presenta un pico molecular (M^+) a m/z 208.1532, lo que permite asignar al compuesto la fórmula molecular $C_{12}H_{20}ON_2$. Los fragmentos más destacables según EIHRMS son: m/z 208.1532 (19.8), 166.1057 (100) y 123.0522 (64.1).

El espectro de 1H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) (Fig 48) muestra las siguientes señales: δ 7.16 (1H, s, H-5), 2.65 (2H, d, $J=7.1$, H-11), 2.37 (2H, d, $J=7.2$, H-7), 2.20 (1H, m, H-12), 2.01 (1H, m, H-8), 0.98 (6H, d, $J=2.9$, H-9, H-10) y 0.96 (6H, m, $J=2.9$, H-13, H-14) ppm.

El espectro de ^{13}C RMN (75 MHz, $CDCl_3$) (Fig 49) muestra las siguientes señales: δ 158.07 (C-2), 157.08 (C-3), 137.41 (C-6), 122.91 (C-5), 151.44 (C-18), 41.69 (C-11), 39.54 (C-7), 28.15 (C-8), 26.91 (C-12), 22.66 (C-13, C-14) y 22.18 (C-9, C-10) ppm.

Estos datos espectroscópicos coinciden con los datos descritos en bibliografía de **flavacol**¹⁶⁵. Esta pirazina fue descubierta en 1949 por Dunn *et al.* a partir de un extracto de *A. flavus*¹⁶⁶ y está relacionado estructuralmente con el ácido aspergílico^{167,168} aislado de *A. flavus* e importante por sus propiedades antibióticas. Este tipo de esqueleto proviene biosintéticamente de los aminoácidos; el flavacol es sintetizado por el hongo a partir de dos moléculas de leucina, mientras que el ácido aspergílico se forma a partir de una molécula de leucina y una de isoleucina¹⁶⁹.

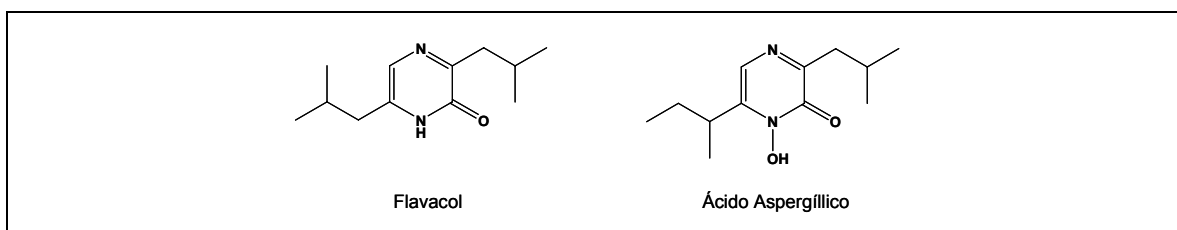


Fig 46. Estructuras de FIV-5-A (flavacol) y ácido aspergílico

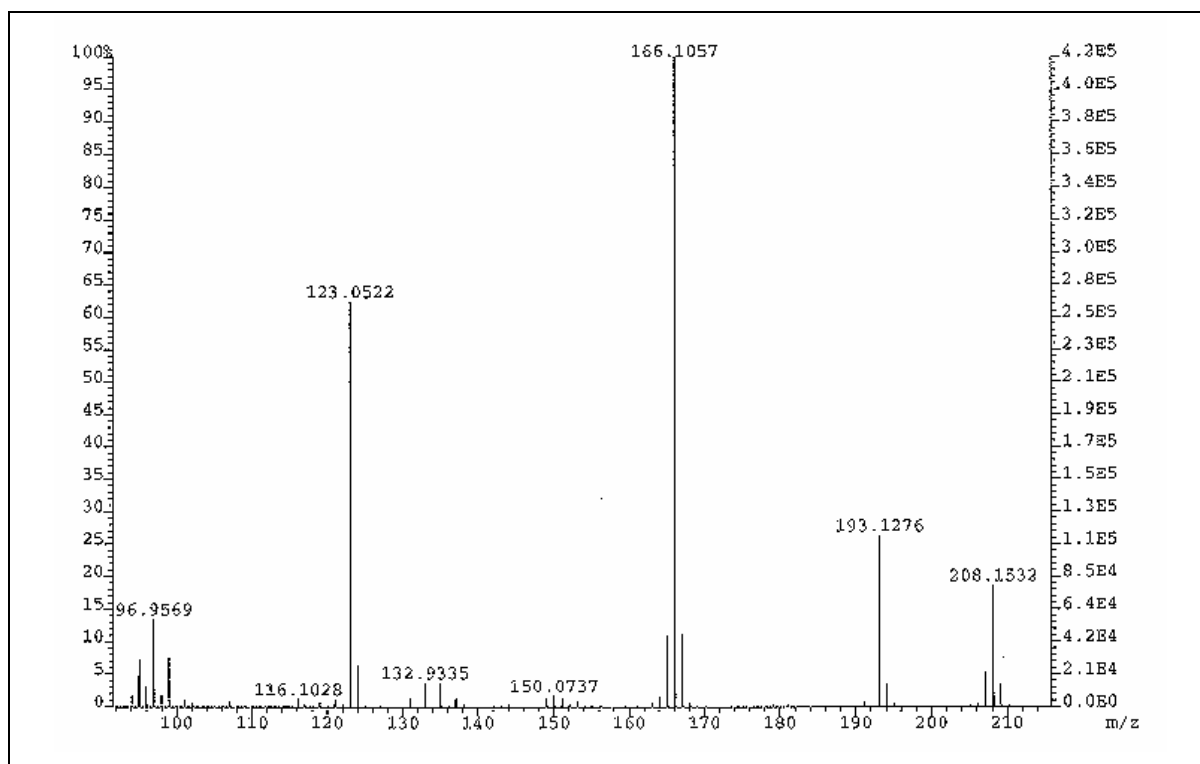
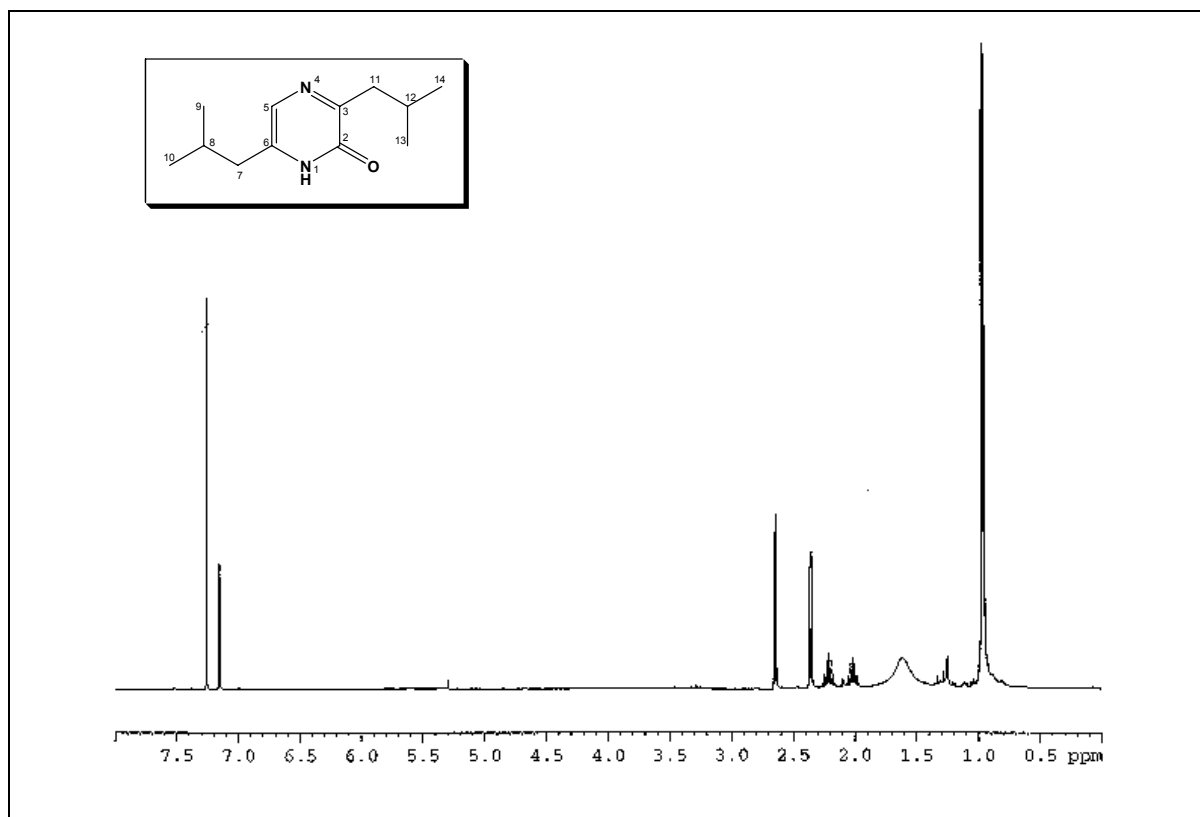


Fig 47. EIHRMS de FIV-5-A (flavacol)

Fig 48. ¹H RMN-600 MHz de FIV-5-A (flavacol) en CDCl₃

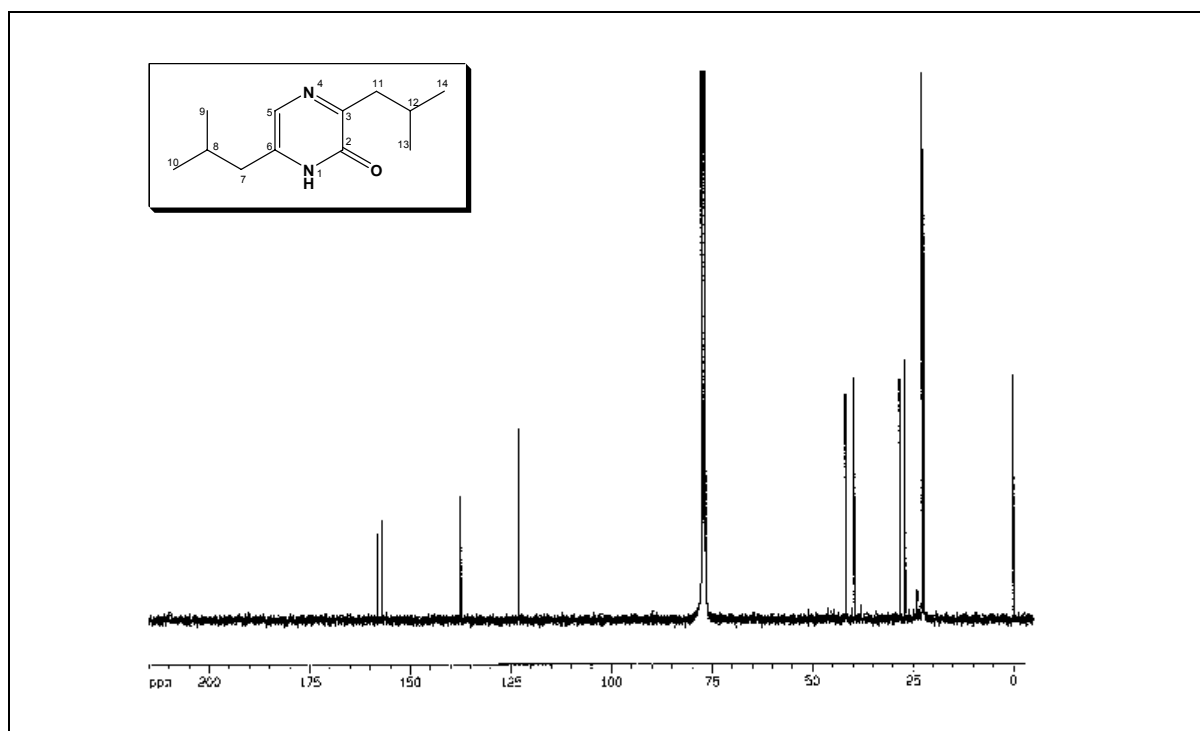


Fig 49. ^{13}C RMN-300 MHz de FIV-5-A (flavacol) en CDCl_3

1.6 Actividades biológicas de los compuestos puros

Se realizaron los ensayos de citotoxicidad de todos los compuestos puros aislados, midiendo la actividad NADH oxidasa, según el método descrito en el apartado 2.7 de Material y métodos; los resultados se describen en la tabla 5.

Esta actividad integrada implica el estudio combinado de los complejos I, III y IV de la cadena respiratoria mitocondrial, considerando todo el sistema como una única enzima. El mecanismo de acción de estos compuestos consiste principalmente en la inhibición íntegra de la cadena respiratoria mitocondrial, bloqueando el transporte electrónico, lo que supone una inhibición en la formación de ATP por parte de la célula.

Durante los últimos años, se ha acrecentado el interés por los complejos enzimáticos de la cadena respiratoria. Ello es debido al descubrimiento de la asociación entre diferentes patologías degenerativas, como el Parkinson, cardiopatía isquémica, episodios convulsivos similares a la epilepsia e incluso algunos casos de diabetes mellitus del adulto, con los defectos funcionales de estos complejos enzimáticos¹⁷⁰. Las deficiencias funcionales de estos complejos afectan directamente a la producción de ATP en condiciones aeróbicas y, por tanto, a aquellos órganos y tejidos más dependientes de este proceso metabólico, como son el sistema nervioso central y el músculo esquelético.

En conjunto, los inhibidores de la cadena respiratoria mitocondrial son una gran familia de compuestos naturales y sintéticos con estructuras químicas muy diversas¹⁷¹. Han adquirido especial relevancia los inhibidores de la NADH:ubiquinona oxidoreductasa (complejo I). Este es el complejo proteínico más grande y complicado de la membrana mitocondrial interna, implicado en la generación de energía por parte de la célula. Es el más conocido tanto estructural como

funcionalmente¹⁷², pero también es, dada sus especiales características, el complejo que mayor número de inhibidores presenta. Con el fin de entender los mecanismos moleculares de las patologías en las cuales está implicado este complejo, se ha impulsado la búsqueda de nuevos inhibidores específicos. Hay que destacar también la importancia del complejo I en el proceso de envejecimiento celular ya que se ha demostrado que es el mayor centro generador de especies de oxígeno reactivas (ROS) tanto en células como en tejidos fisiológicos¹⁷³. Recientemente se ha sugerido que las especies ROS juegan un papel importante en el desencadenamiento del proceso apoptótico¹⁷⁴. Además se ha demostrado que algunos inhibidores específicos del complejo I inducen la formación de ROS en determinadas líneas celulares tumorales humanas, lo que se traduce en una inducción del proceso apoptótico que desencadenaría la muerte celular¹⁷⁵. Esto pone de relevancia la importancia de estos inhibidores como posibles fármacos antitumorales.

Además la inhibición del enzima NADH:ubiquinona oxidoreductasa sigue siendo el punto central para el desarrollo comercial de insecticidas y acaricidas, ya que está demostrado que el complejo I de los insectos es especialmente sensible a la acción de estos inhibidores¹⁷¹.

Debido a todo esto, en los últimos años se ha visto reforzada la búsqueda y caracterización de nuevos inhibidores específicos del complejo I. De los inhibidores de dicho complejo¹⁷⁶ caben destacar los derivados de metilfenil piridinio (MPP⁺), utilizados para inducir el Parkinson experimental, la fenazaquina y el piridaben, comercializados como insecticidas y acaricidas, el raticida Vacor®, diversos neurolépticos utilizados en terapéutica y las acetogeninas de Annonaceas que han resultado ser las de mayor potencia¹⁷⁷.

En nuestro caso, las circumdatinas E y H muestran una actividad moderada como inhibidores de la cadena respiratoria mitocondrial respecto a uno de los inhibidores más activos del complejo I, la rotenona, que presenta una CI_{50} de 4.4 nM^{178} , aunque la actividad inhibitoria de las circumdatinas es similar a otros interesantes inhibidores del complejo I de la cadena respiratoria como los estolonoxidos¹⁷⁹. La circumdatin H es ligeramente más activa que la circumdatin E como se puede ver en la tabla 5.

Por otra parte, el flavacol y el stephacidin A son capaces de inhibir la cadena respiratoria con valores de CI_{50} entre 5 y 25 veces mayores que las benzodiazepinas. Esta baja potencia inhibitoria que muestra el stephacidin A podría demostrar que la inhibición de la cadena respiratoria mitocondrial no es el mecanismo responsable de su actividad antitumoral descrita por Cutrone *et al*¹⁶⁰.

Compuestos	CI_{50} (μM)
(-) Stephacidin A	34.6 ± 2.2
(-) Circumdatin E	2.5 ± 0.3
(-) Circumdatin H	1.5 ± 0.1
Flavacol	13.0 ± 0.4

Tabla 5. Actividad citotóxica de los compuestos aislados en *A. ochraceus*

2. *Penicillium cluniae* Quintanilla (CECT 2888)

2.1 Cultivo del hongo y obtención de los extractos

Con el cultivo de la cepa de *Penicillium cluniae* en 30 L de medio ATB se obtuvieron a partir del caldo 7.1 g de extracto seco y a partir del micelio 3.7 g de extracto diclorometánico y 0.7 g de extracto metanólico, tal como se describe en el apartado 1 de Material y métodos.

2.2 Actividad biológica de los extractos

Los extractos orgánicos se sometieron a los ensayos de actividades biológicas descritos en el apartado 2 de Material y métodos, resultando el extracto del caldo significativamente activo como citostático con una $CI_{50}=70 \mu\text{g/mL}$ y como insecticida frente a *Oncopeltus fasciatus* con una $DL_{50}=23.4 \pm 2.02 \mu\text{g/ninfa}$, por lo que se procedió a su estudio.

2.3 Estudio del extracto orgánico del caldo

7.1 g del extracto orgánico del caldo se fraccionaron en columna abierta sobre un relleno de sílice (1:80 p/p), usando eluyentes de polaridad creciente, desde DCM hasta MeOH. Se obtuvieron 11 fracciones cuyos pesos y disolventes se indican en la tabla 6.

Fracción	Volumen (L)	Eluyente	Peso (mg)
FI	3.5	DCM	434.2
FII	3.5	DCM/AcOEt:9/1	176.2
FIII	3.5	DCM/AcOEt:7/3	1623.2
FIV	3.5	DCM/AcOEt:5/5	808.2
FV	3.5	DCM/AcOEt:3/7	1501.3
FVI	3.5	AcOEt	913.2
FVII	3.5	AcOEt/MeOH:9/1	450.7
FVIII	3.5	AcOEt/MeOH:8/2	195.4
FIX	3.5	AcOEt/MeOH:7/3	96.8
FX	3.5	AcOEt/MeOH:5/5	152.6
FXI	3.5	MeOH	73.4

Tabla 6. Fraccionamiento en columna del extracto del caldo de *Penicillium cluniae*

2.4 Actividades biológicas de las fracciones

Las fracciones cromatográficas del extracto orgánico del caldo se ensayaron como citostáticas (según el apartado 2.6 de Material y métodos) e insecticidas (según el apartado 2.5 de Material y métodos). La fracción VII destacó por su actividad citostática con una $CI_{50}=2.2 \mu\text{g/mL}$ y las fracciones IX y X destacaron por su actividad insecticida frente a *Oncopeltus fasciatus*, con una mortalidad del $43.3\% \pm 6.6$ y $86.6\% \pm 3.3$ a una dosis de $50 \mu\text{g/cm}^2$, respectivamente. Se procedió al aislamiento e identificación de los componentes causantes de dichas actividades.

2.5 Aislamiento e identificación de los compuestos de las fracciones seleccionadas

2.5.1 Estudio de la fracción VII

Aislamiento

La fracción VII (448 mg) se sometió a cromatografía líquida en columna abierta sobre sílice (1:100 p/p) usando como fase móvil DCM/MeOH:98/2. La mezcla se fraccionó en alícuotas de 20 mL, las cuales se reunieron en 11 subfracciones de acuerdo con su similitud en CCF. La subfracción 7 (FVII-7) se cristalizó en acetona y se obtuvieron 35.5 mg de un producto puro denominado FVII-7-A.

Identificación del compuesto FVII-7-A

El espectro de masas por EI de alta resolución (Fig 51) presenta un pico molecular (M^+) a m/z 280.2311, lo que permite asignar al compuesto la fórmula molecular $C_{16}H_{24}O_4$. Los fragmentos más destacables según este espectro son: m/z (intensidad relativa): 220 (10.79), 202 (25.25), 161 (26.61), 167 (37.50), 120 (74.73), 107 (39.23), 91.3 (49.30), 81.4 (54.41), 79.4 (64.85), 67.5 (62.60) y 55.4 (100).

El espectro de 1H RMN (MeOD) (Fig 52) muestra las siguientes señales: δ 7.46 (1H, *dd*, $J=15.6$, 3.0, H-3), 5.82 (1H, *dd*, $J=15.6$, 2.1, H-2), 5.74 (1H, *m*, H-11), 5.27 (1H, *dd*, $J=15.0$, 9.6, H-10), 4.79 (1H, *m*, H-15), 4.21 (1H, *m*, H-7), 4.02 (1H, *m*, H-4), 2.39 (1H, *m*, H-9), 2.12 (1H, *m*, H-8a), 2.05-1.95 (2H, *m*, H-6a, H-12a), 1.92-1.66 (5H, *m*, H-5, H-13b, H-12b, H-6b, H-14a), 1.56 (1H, *m*, H-14b), 1.35 (1H, *m*, H-8b), 1.24 (3H, *d*, $J=6.3$, CH_3 -16) y 0.92 (1H, *m*, H-13a) ppm.

El espectro de ^{13}C RMN (MeOD) (Fig 53) muestra las siguientes señales: δ 168.76 (C-1), 155.49 (C-3), 138.51 (C-10), 131.79 (C-11), 118.17 (C-2), 77.02 (C-4), 73.59 (C-7), 73.37 (C-15), 53.57 (C-5), 45.84 (C-9), 44.49 (C-8), 42.24 (C-6), 35.38 (C-14), 33.36 (C-12), 28.39 (C-13) y 21.45 (C-16) ppm.

Los datos espectroscópicos y el poder rotatorio coinciden con los datos descritos en literatura del **(+) brefeldin A**¹⁸⁰. Este antibiótico de estructura macrólida fue descrito por Singleton *et al.*¹⁸¹ en 1958 a partir de *Penicillium decumbens*, por lo que también es denominado en numerosas ocasiones decumbin. En 1963 fue también aislado por Haerri *et al.*¹⁸² a partir de *P. brefeldianum*. Su ruta biosintética es la del acetato¹⁸³ y ha sido descrito como una sustancia antitumoral¹⁸⁴ siendo su mecanismo de acción la inhibición de la secreción de proteínas al interferir en las funciones del aparato del Golgi¹⁸⁵.

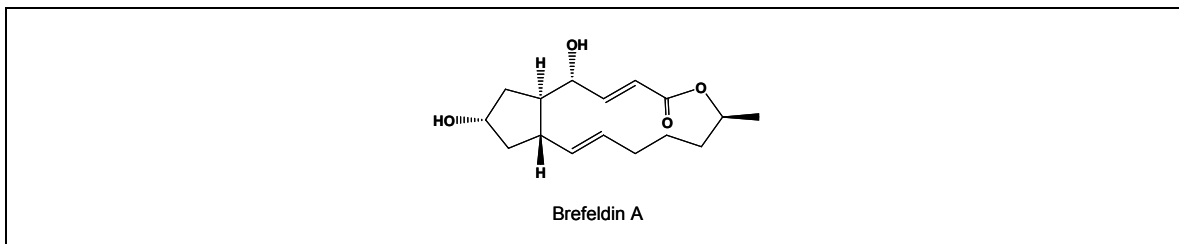


Fig 50. Estructura del (+) brefeldin A

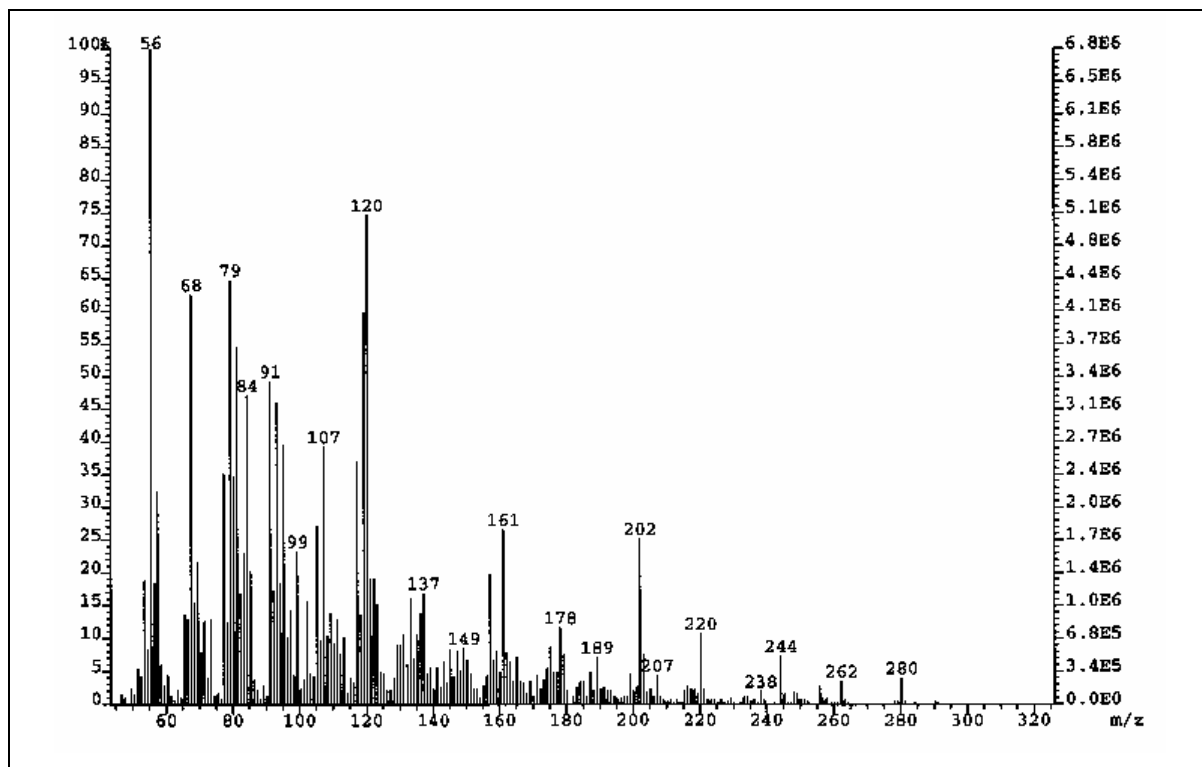
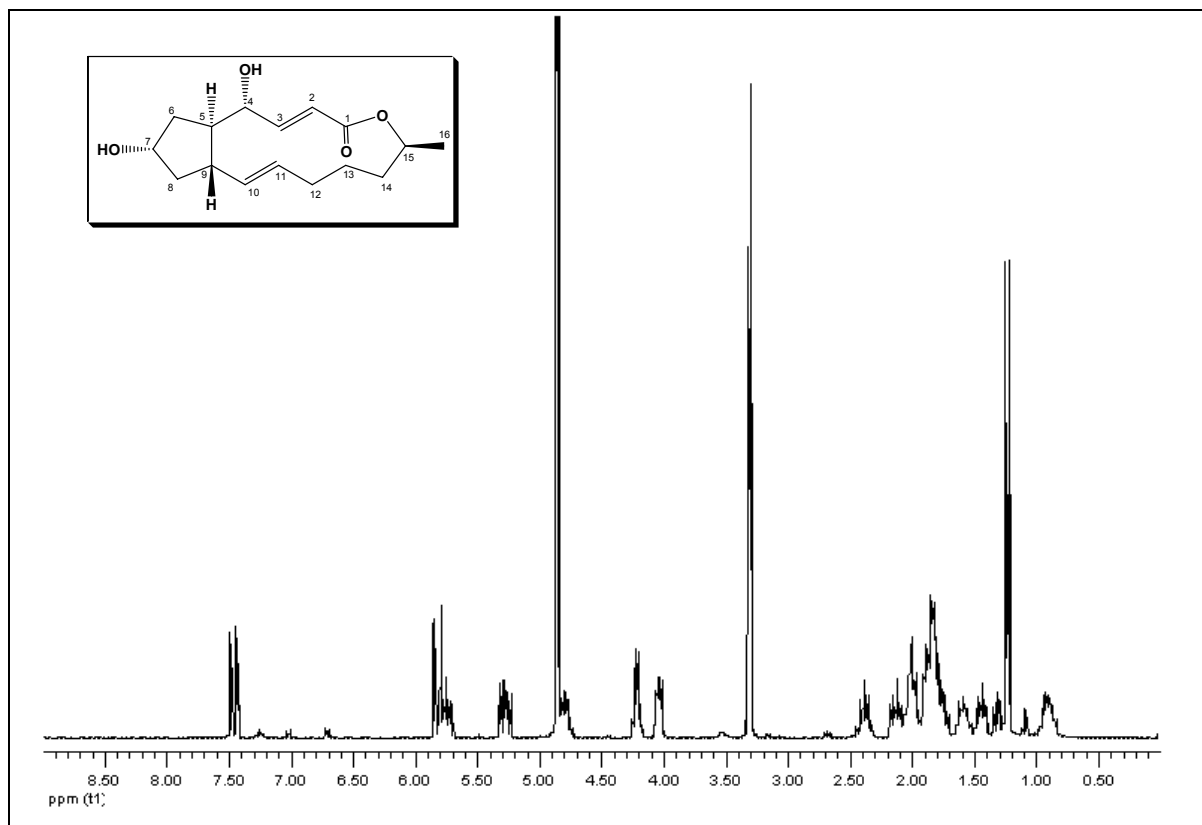
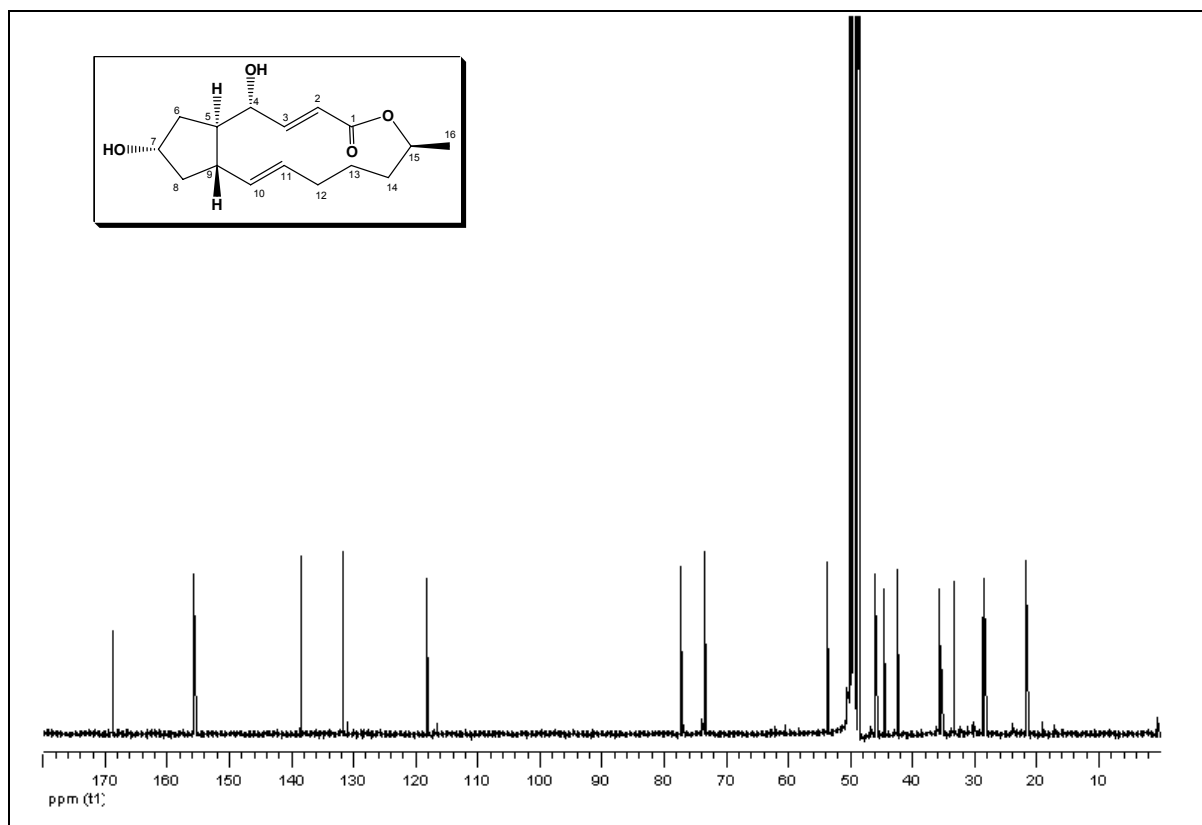


Fig 51. EIHRMS de FVII-7-A ((+) brefeldin A)

Fig 52. ^1H RMN 300 MHz de FVII-7-A ((+) brefeldin A) en MeODFig 53. ^{13}C RMN 300 MHz de FVII-7-A ((+) brefeldin A) en MeOD

2.5.2 Estudio de las fracciones IX y X

Aislamiento

La fracción IX (95 mg) se sometió a cromatografía líquida en columna abierta sobre sílice (1:100 p/p) usando como fase móvil DCM/MeOH:94/6. La mezcla se fraccionó en alícuotas de 3 mL, las cuales se reunieron en 11 subfracciones de acuerdo con su similitud en CCF. Todas las subfracciones se ensayaron como insecticidas siendo las subfracciones 1 (FIX-1) y 2 (FIX-2) las que mostraron mayor actividad por lo que se procedió a su análisis por HPLC.

La subfracción FIX-1 (29.3 mg) se fraccionó en HPLC mediante una columna semipreparativa Spherisorb ODS2 C18 column, 5 μm (25.0 x 0.7 cm) usando como fase móvil MeOH/H₂O (70:30, v/v) a flujo 1 mL/min. Se aislaron seis compuestos que se purificaron en HPLC con una columna analítica Explore Luna (Phenomenex) C18 column, 5 μm (25.0 x 0.46 cm) usando la misma fase móvil a un flujo de 0.5 mL/min. Las propiedades cromatográficas de éstos fueron las siguientes; FIX-1-A [Tr= 5.9 minutos; 4.9 mg], FIX-1-B [Tr= 6.5 minutos; 5.5 mg], FIX-1-C [Tr= 7.2 minutos; 1.4 mg], FIX-1-D [Tr= 7.3 minutos; 1.6 mg], FIX-1-E [Tr= 7.6 minutos; 3.4 mg] y FIX-1-F [Tr= 11.1 minutos; 3.3 mg].

La subfracción FIX-2 también fue sometida a un fraccionamiento por HPLC semipreparativo usando las condiciones que se han descrito para la subfracción FIX-1. Así se aisló el compuesto FIX-2-A [Tr= 14.5 minutos; 0.7 mg], que se purificó mediante HPLC analítico con las mismas condiciones cromatográficas que se describen anteriormente.

La fracción X fue directamente fraccionada mediante HPLC semipreparativo en las mismas condiciones que las subfracciones anteriores y se aislaron cinco compuestos, que a su vez se purificaron mediante HPLC analítico con las mismas condiciones cromatográficas. Las propiedades cromatográficas de éstos fueron las siguientes: FX-1 [Tr= 18.0 minutos; 0.5 mg], FX-2 [Tr = 18.7 minutos; 2.7 mg], FX-3 [Tr = 22.4 minutos; 1.8 mg], FX-4 [Tr = 33 minutos; 2.1 mg] y FX-5 [Tr = 18.9 minutos; 1.1 mg].

Identificación de los compuestos FIX-1-A, FIX-1-B, FIX-1-C, FIX-1-D y FIX-1-E

El estudio de los espectros de RMN y de los espectros de masas permitió determinar una estructura peptídica cíclica para este tipo de compuestos (Tablas 7-9). La presencia de este sistema fue evidente por los desplazamientos químicos en el ¹³C RMN de los dos grupos amida (δ_{C} 165-170 ppm) así como los desplazamientos en el ¹H RMN de dos metinos desapantallados próximos al nitrógeno (δ_{H} 3.9-4.3 ppm).

Los ciclodipeptidos, también conocidos en la literatura como diketopiperazinas (DKPZs), son una clase importante de productos naturales, muchos de los cuales muestran un amplio rango de actividades biológicas¹⁸⁶, incluyendo actividad antimicrobiana, antiviral, antitumoral e inmunosupresiva. Se han aislado a partir de levaduras, líquenes, hongos, bacterias y esponjas marinas¹⁸⁷ y su esqueleto se genera por la ciclación de dos *L*- α -aminoácidos, por lo que la mayor parte de DKPZs de origen natural tienen una configuración *cis*¹⁸⁸. El aminoácido *L*-prolina está

presente en todas las DKPZs aisladas a partir de *P. cluniae*, de acuerdo con la presencia de tres metilenos entre 1.8 y 3.7 ppm en el espectro de ^1H RMN.

Ciclo-(L-Pro-L-Tyr)¹⁸⁹ (FIX-1-A), **ciclo-(L-Pro-L-Val)**¹⁹⁰ (FIX-1-B), **ciclo-(L-Pro-L-Ile)**¹⁹¹ (FIX-1-C), **ciclo-(L-Pro-L-Leu)**¹⁹⁰ (FIX-1-D) y **ciclo-(L-Pro-L-Phe)**¹⁹¹ (FIX-1-E) (Fig 54) son diketopiperazinas ya conocidas, aunque es la primera vez que se describen en *P. cluniae*. Los datos espectroscópicos de RMN y el poder rotatorio de estos compuestos coinciden con los datos previamente descritos en bibliografía.

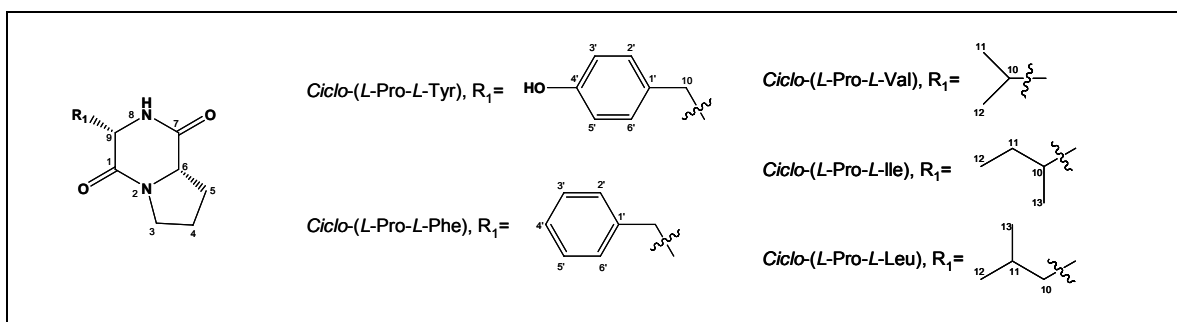


Fig 54. Estructuras de las diketopiperazinas aisladas a partir de *Penicillium cluniae*

	<i>Ciclo-(L-Pro-L-Tyr)</i>	<i>Ciclo-(L-Pro-L-Phe)</i>	<i>Ciclo-(L-Pro-L-Val)</i>	<i>Ciclo-(L-Pro-L-Ile)</i>	<i>Ciclo-(L-Pro-L-Leu)</i>
	$\delta\text{H, m (Hz)}$	$\delta\text{H, m (Hz)}$	$\delta\text{H, m (Hz)}$	$\delta\text{H, m (Hz)}$	$\delta\text{H, m (Hz)}$
3	3.57, <i>m</i>	3.61, <i>m</i>	3.61, <i>m</i>	3.59, <i>m</i>	3.62, <i>m</i> 3.52, <i>m</i>
4	1.96, <i>m</i>	2.01, <i>m</i>	2.01, <i>m</i>	1.98, <i>m</i>	1.92, <i>m</i>
5	2.32, <i>m</i>	2.34, <i>m</i>	2.37, <i>m</i>	2.35, <i>m</i>	2.41, <i>m</i>
6	4.07, <i>t</i> (7.2)	4.08, <i>t</i> (7.2)	4.08, <i>t</i> (7.2)	4.07, <i>t</i> (7.2)	4.09, <i>m</i>
8	5.88, <i>s</i>	5.60, <i>s</i>	5.84, <i>s</i>	5.71, <i>s</i>	6.04, <i>s</i>
9	4.22, <i>dd</i> (9.9, 2.7)	4.27, <i>dd</i> (10.5, 2.7)	3.94, <i>br s</i>	3.97, <i>br s</i>	3.93, <i>m</i>
10	3.46, <i>dd</i> (14.7, 2.7) 2.78, <i>dd</i> (14.7, 9.9)	3.61, <i>m</i> 2.77, <i>dd</i> (14.7, 10.5)	2.64, <i>m</i>	2.35, <i>m</i>	2.02, <i>m</i> 1.63, <i>m</i>
11	-	-	1.06, <i>d</i> (7.2)*	1.42, <i>m</i> 1.18, <i>m</i>	1.75, <i>m</i>
12	-	-	0.91, <i>d</i> (7.2)*	0.93, <i>t</i> (7.2)	0.99, <i>d</i> (6.6)*
13	-	-	-	1.05, <i>d</i> (7.2)	0.95, <i>d</i> (6.6)*
1'	-	7.3, <i>m</i>	-	-	-
2'	7.06, <i>d</i> (8.4)	7.3, <i>m</i>	-	-	-
3'	6.78, <i>d</i> (8.4)	7.3, <i>m</i>	-	-	-
4'	-	7.3, <i>m</i>	-	-	-
5'	6.78, <i>d</i> (8.4)	7.3, <i>m</i>	-	-	-
6'	7.06, <i>d</i> (8.4)	7.3, <i>m</i>	-	-	-

* Intercambiables

Tabla 7. ^1H RMN 300 MHz de las diketopiperazinas aisladas en *P. cluniae* en CDCl_3

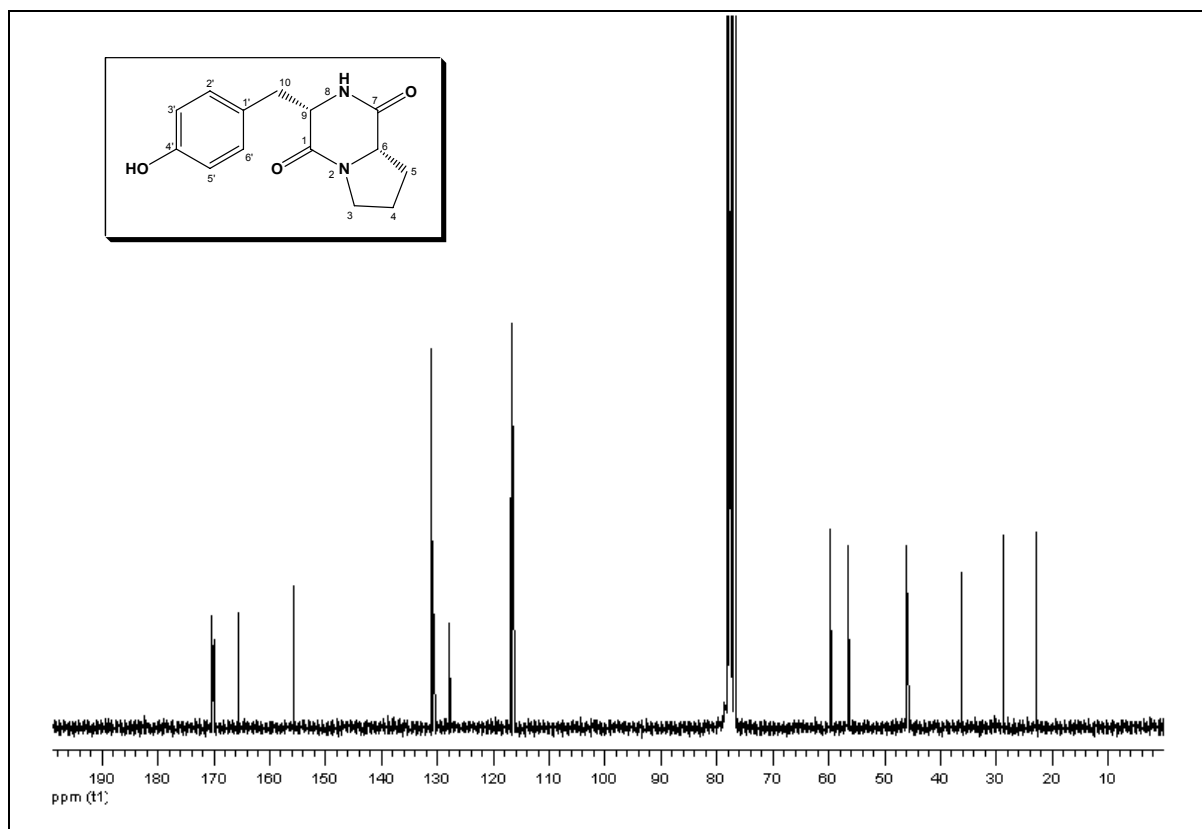
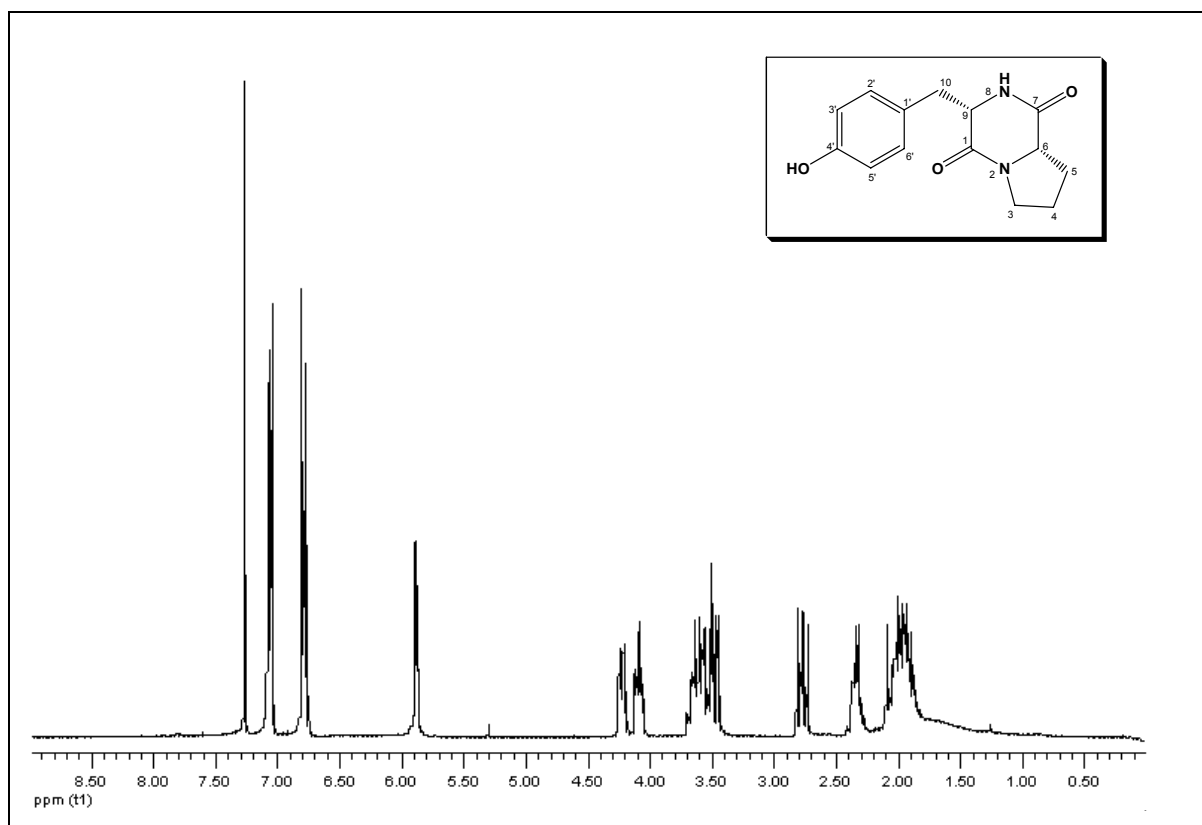
	<i>Ciclo-(L-Pro-L-Tyr)</i>	<i>Ciclo-(L-Pro-L-Phe)</i>	<i>Ciclo-(L-Pro-L-Val)</i>	<i>Ciclo-(L-Pro-L-Ile)</i>	<i>Ciclo-(L-Pro-L-Leu)</i>
	$\delta C, m$ (DEPT)	$\delta C, m$ (DEPT)	$\delta C, m$ (DEPT)	$\delta C, m$ (DEPT)	$\delta C, m$ (DEPT)
1	169.99 (C)	169.84 (C)	170.44 (C)	170.13 (C)	169.58 (C)
3		45.85 (CH ₂)	45.53 (CH ₂)	45.53 (CH ₂)	46.03 (CH ₂)
4		22.93 (CH ₂)	22.74 (CH ₂)	22.74 (CH ₂)	23.39 (CH ₂)
5		28.74 (CH ₂)	28.91 (CH ₂)	28.92 (CH ₂)	29.37 (CH ₂)
6	59.53 (CH)	59.52 (CH)	59.21 (CH)	59.18 (CH)	58.42 (CH)
7	165.52 (C)	165.46 (C)	165.31 (C)	165.31 (C)	166.60 (C)
9		56.59 (CH)	60.78 (CH)	60.87 (CH)	56.80 (CH)
10		170.13 (C)	28.76 (CH)	35.66 (CH)	42.99 (CH ₂)
11		-	19.61 (CH ₃)*	24.43 (CH ₂)	24.86 (CH)
12		-	16.43 (CH ₃)*	12.43 (CH ₃)	22.59* (CH ₃)
13		-	-	16.35 (CH ₃)	21.77* (CH ₃)
1'	127.66 (C)	136.30 (C)	-	-	-
2'	130.71 (CH)	129.51 (CH)	-	-	-
3'	116.53 (CH)	129.67 (CH)	-	-	-
4'	155.76 (C)	127.95 (CH)	-	-	-
5'	116.53 (CH)	129.67 (CH)	-	-	-
6'	130.71 (CH)	129.51 (CH)	-	-	-

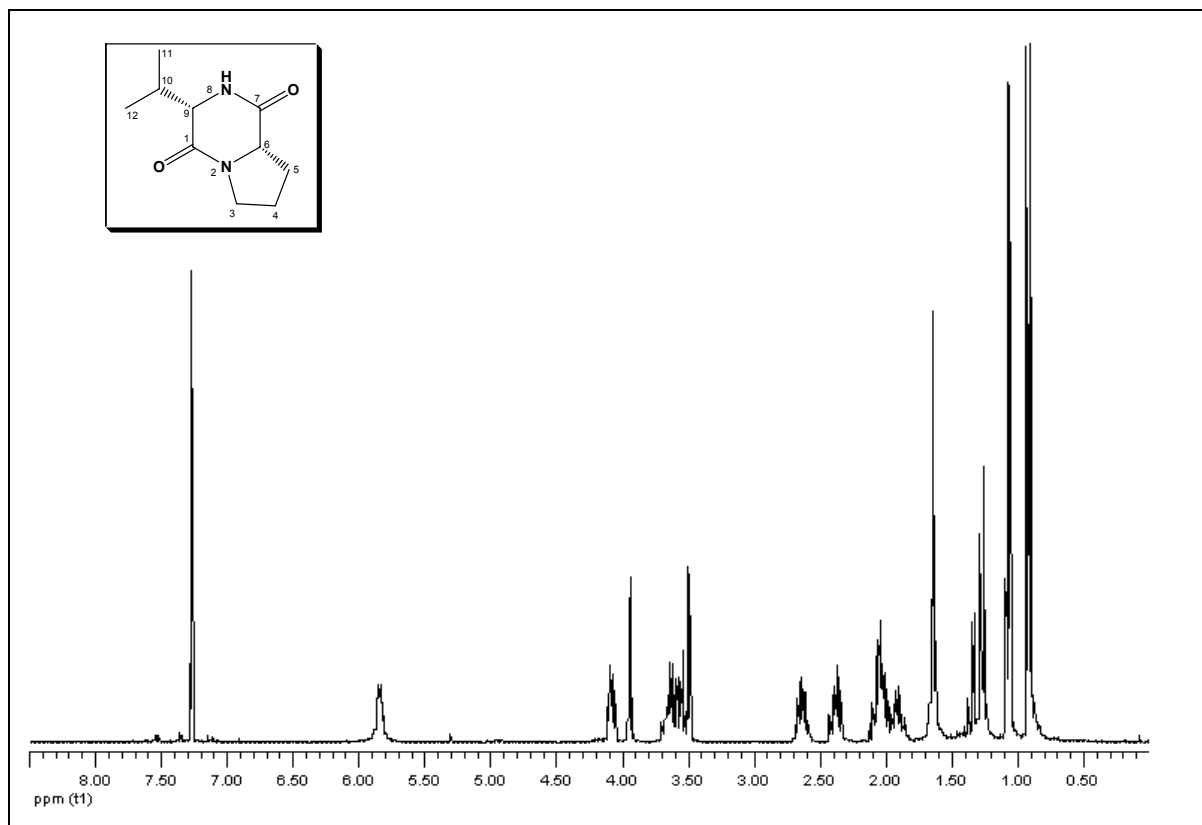
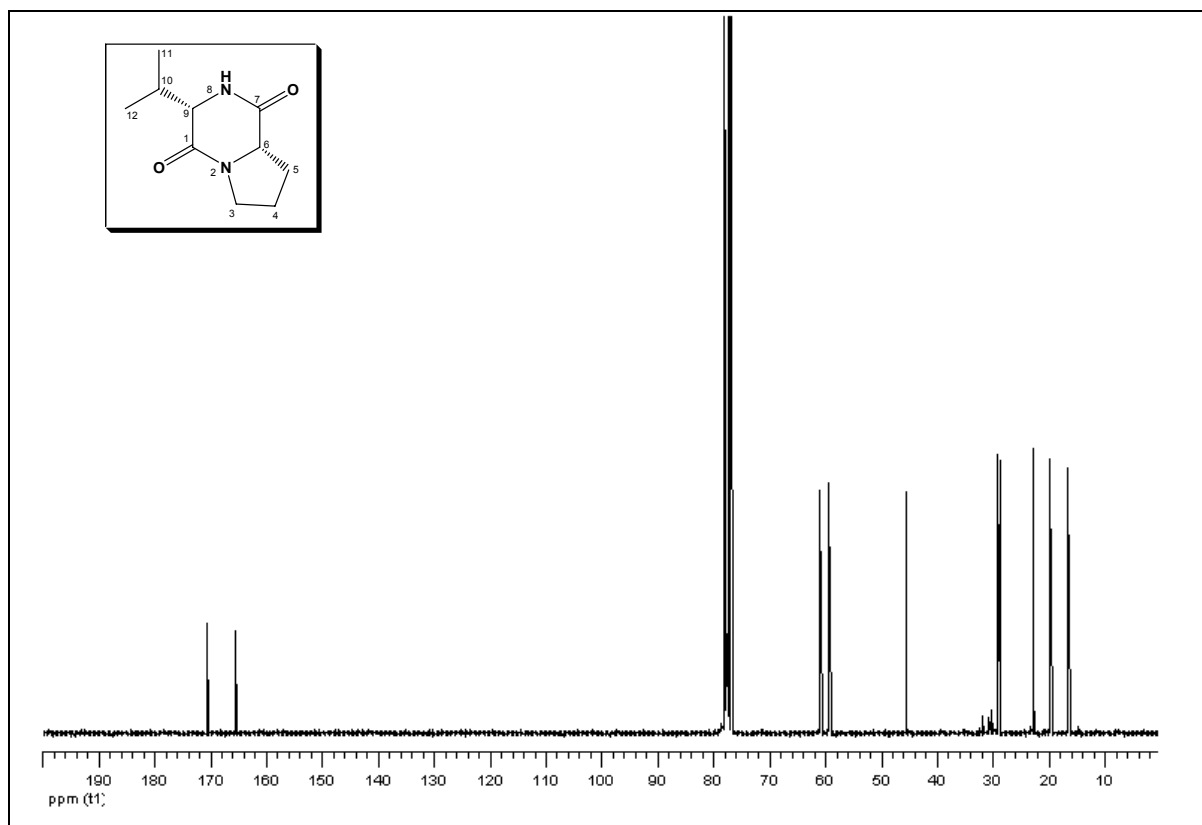
* Intercambiables

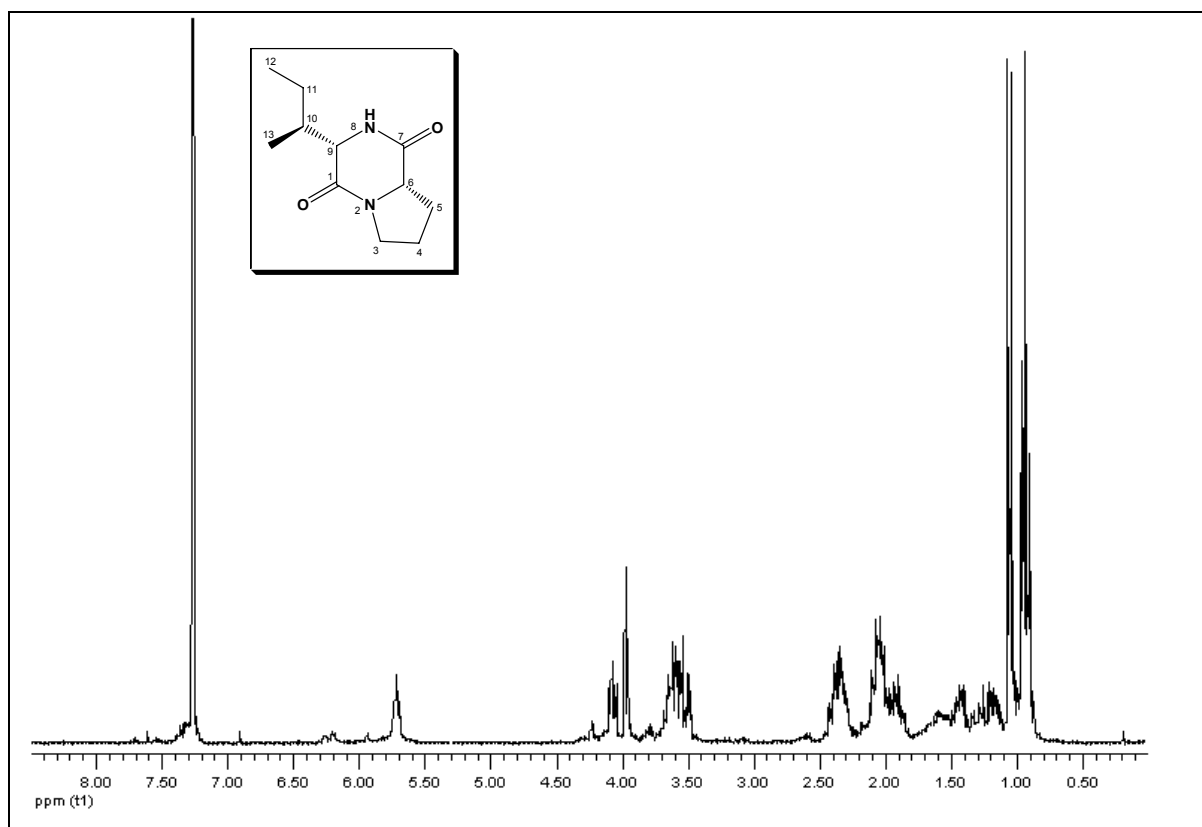
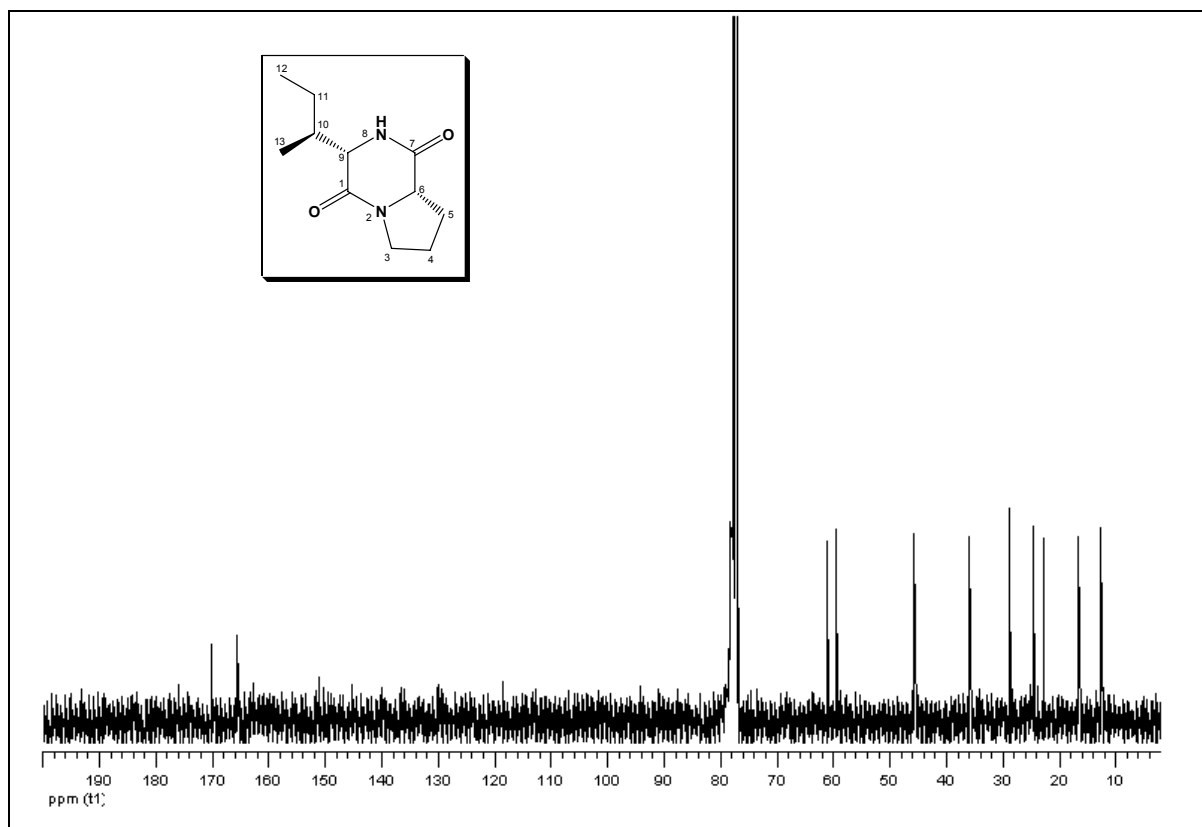
Tabla 8. ¹³C RMN 75 MHz de las diketopiperazinas aisladas en *P. cluniae* en CDCl₃

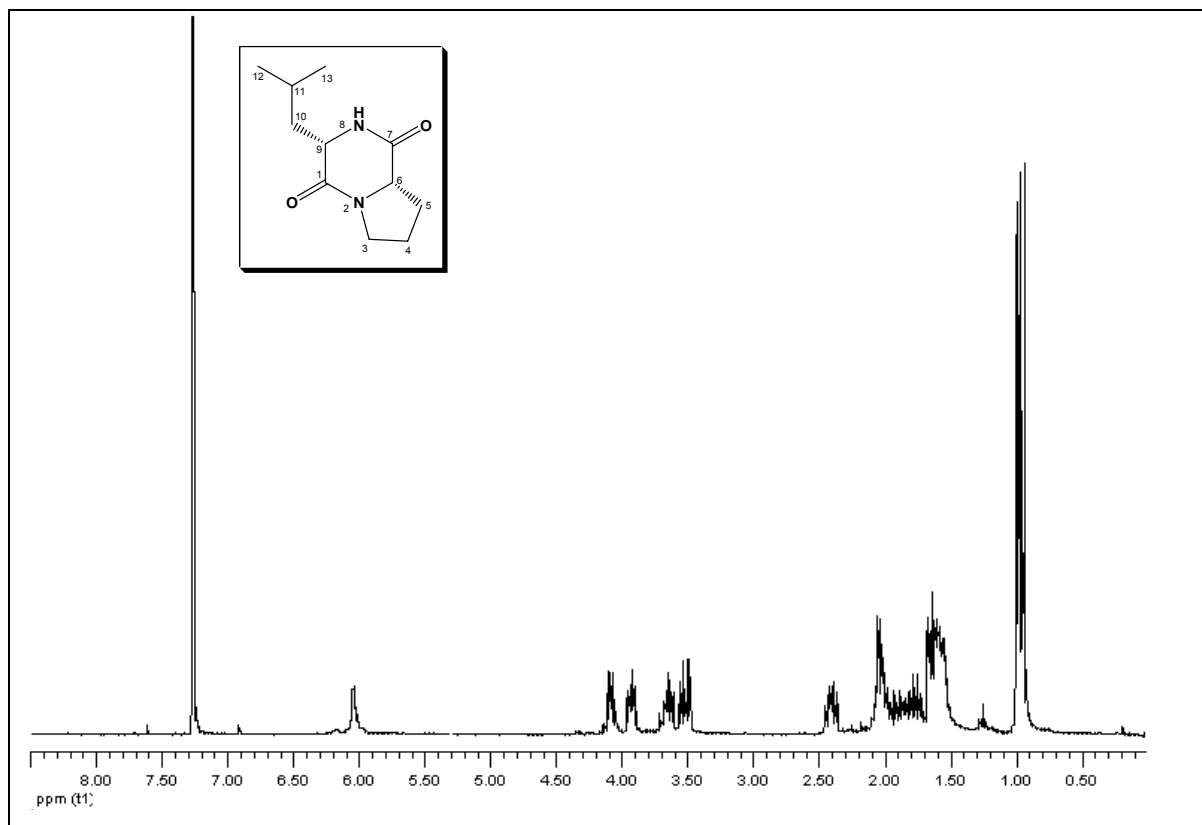
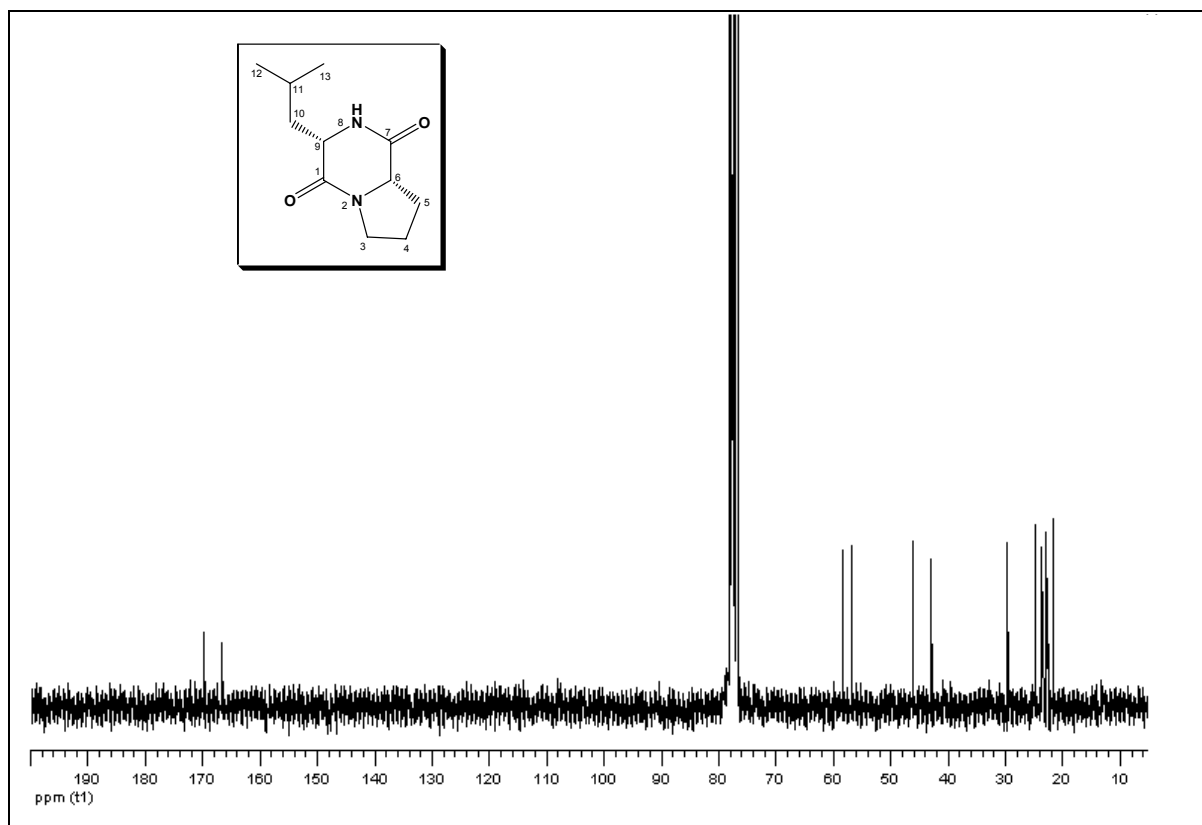
	<i>Ciclo-(L-Pro-L-Tyr)</i>	<i>Ciclo-(L-Pro-L-Phe)</i>	<i>Ciclo-(L-Pro-L-Val)</i>	<i>Ciclo-(L-Pro-L-Ile)</i>	<i>Ciclo-(L-Pro-L-Leu)</i>
EIMS	m/z 261.12 (M+1)	m/z 245.13 (M+1)	m/z 197.07 (M+1)	m/z 211.13 (M+1)	m/z 211.09 (M+1)
FM	C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₃	C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₂	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₂	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₂	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₂

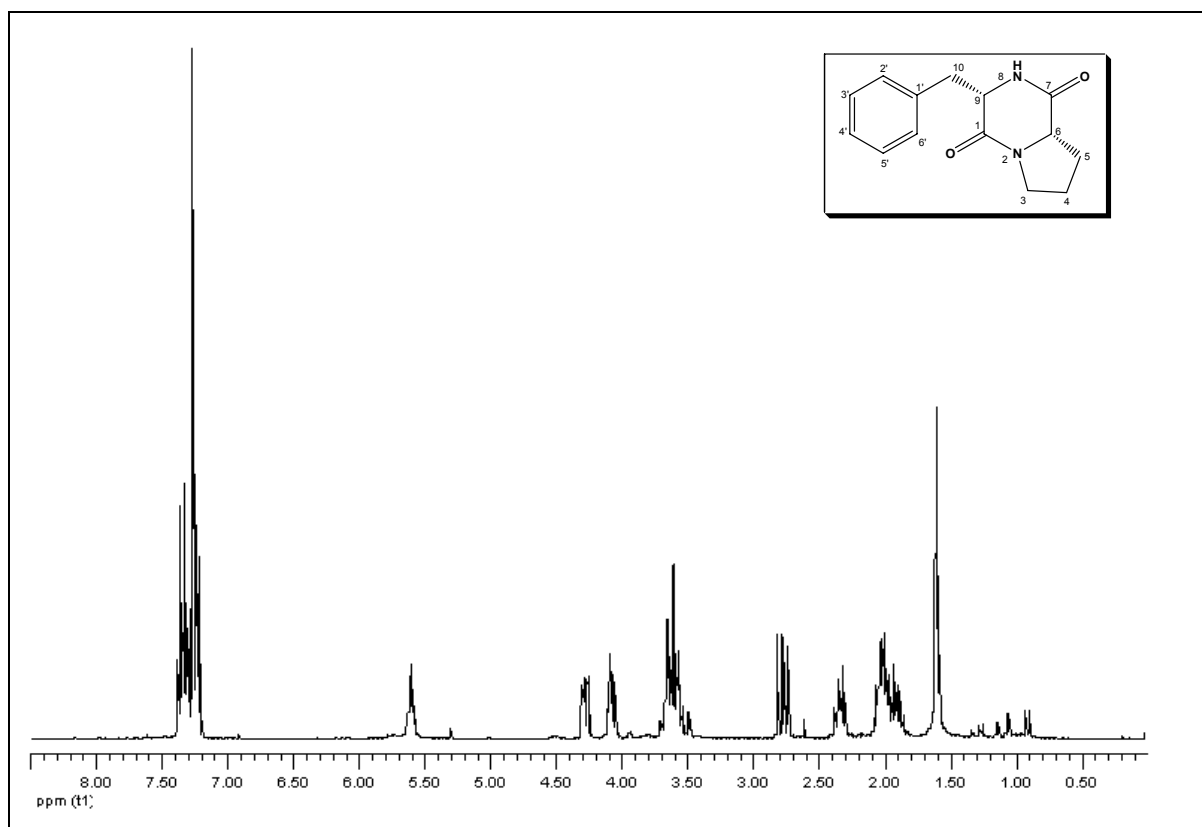
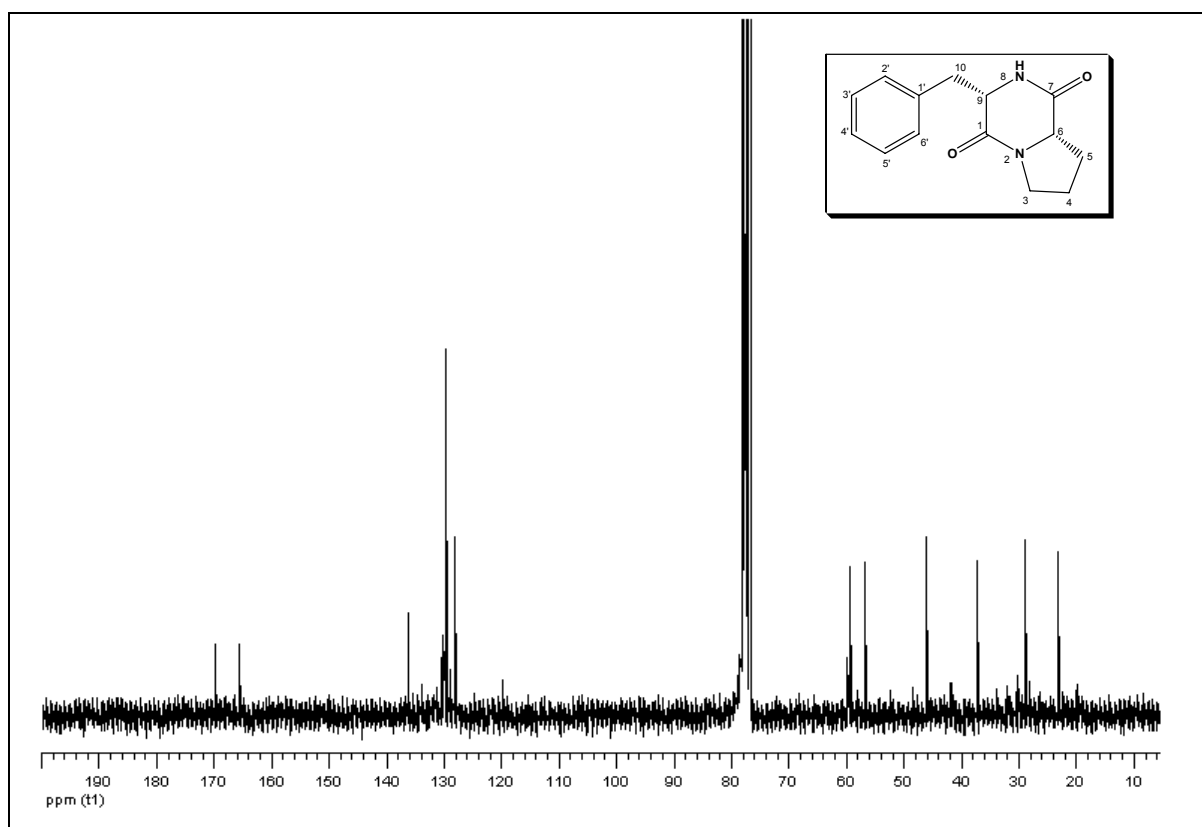
Tabla 9. EIMS de las diketopiperazinas aisladas en *P. cluniae*



Fig 57. ^1H RMN 300 MHz de FIX-1-B (ciclo-(L-Pro-L-Val)) en CDCl_3 Fig 58. ^{13}C RMN 75 MHz de FIX-1-B (ciclo-(L-Pro-L-Val)) en CDCl_3

Fig 59. ^1H RMN 300 MHz de FIX-1-C (ciclo-(L-Pro-L-Ileu)) en CDCl_3 Fig 60. ^{13}C RMN 75 MHz de FIX-1-C (ciclo-(L-Pro-L-Ileu)) en CDCl_3

Fig 61. ^1H RMN 300 MHz de FIX-1-D (ciclo-(L-Pro-L-Leu)) en CDCl_3 Fig 62. ^{13}C RMN 75 MHz de FIX-1-D (ciclo-(L-Pro-L-Leu)) en CDCl_3

Fig 63. ^1H RMN 300 MHz de FIX-1-E (*ciclo-(L-Pro-L-Phe)*) en CDCl_3 Fig 64. ^{13}C RMN 75 MHz de FIX-1-E (*ciclo-(L-Pro-L-Phe)*) en CDCl_3

Identificación de los compuestos FIX-1F, FIX-2-A, FX-1, FX-2, FX-3, FX-4 y FX-5

El análisis de los espectros de RMN, así como de los espectros de masas de estos compuestos, permitió determinar que se trata de estructuras de la familia de las paraherquamidas (PHQ). La PHQ-A, el primer miembro de esta familia, fue aislado y cristalizado por primera vez en 1981 por Yamazaki *et al.*¹⁰⁶ a partir de *P. paraherquei*. En la década de los 90 comenzaron a identificarse distintos miembros de la familia (PHQ-B-PHQ-G) a partir de *P. charlesii*¹⁹² y de otras especies de *Penicillium* (VM5595-97)¹⁹³ (Fig 55). Este tipo de alcaloides, de estructura oxindólica, destacan por su potente actividad antiparasitaria, especialmente como antihelmínticos¹⁹⁴.

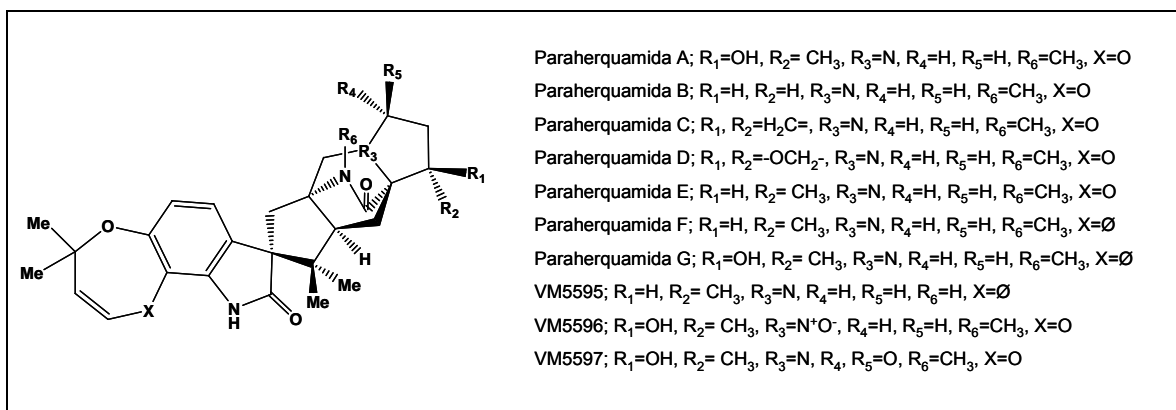


Fig 65. Estructuras de la familia paraherquamida

Estos compuestos, al igual que las brevianamidas¹⁰⁹, las marcfortinas¹⁰², la esclerotiamida¹⁹⁵, el stephacidin¹⁵⁹, la avrainvillamida¹⁶¹, las aspergillimidias⁸⁹ y las asperparalinas⁸⁷ constituyen una familia de metabolitos fúngicos que poseen un único sistema de anillo biciclo [2.2.2] diazocetano que la naturaleza forma mediante una reacción de *Diels-Alder* entre una subunidad de isopreno y los carbonos α de dos aminoácidos¹⁹⁶⁻¹⁹⁸. En el caso de las paraherquamidas (PHQ) estos aminoácidos son el *L*-triptófano y la *L*-isoleucina¹⁹⁹ transformándose ésta última mediante una ciclación oxidativa en la β -metil-prolina²⁰⁰. Una segunda subunidad de isopreno se incorpora para formar el anillo dioxigenado de siete miembros que completa la estructura de las paraherquamidas aisladas en *P. cluniae*¹⁹⁶ (Fig 66).

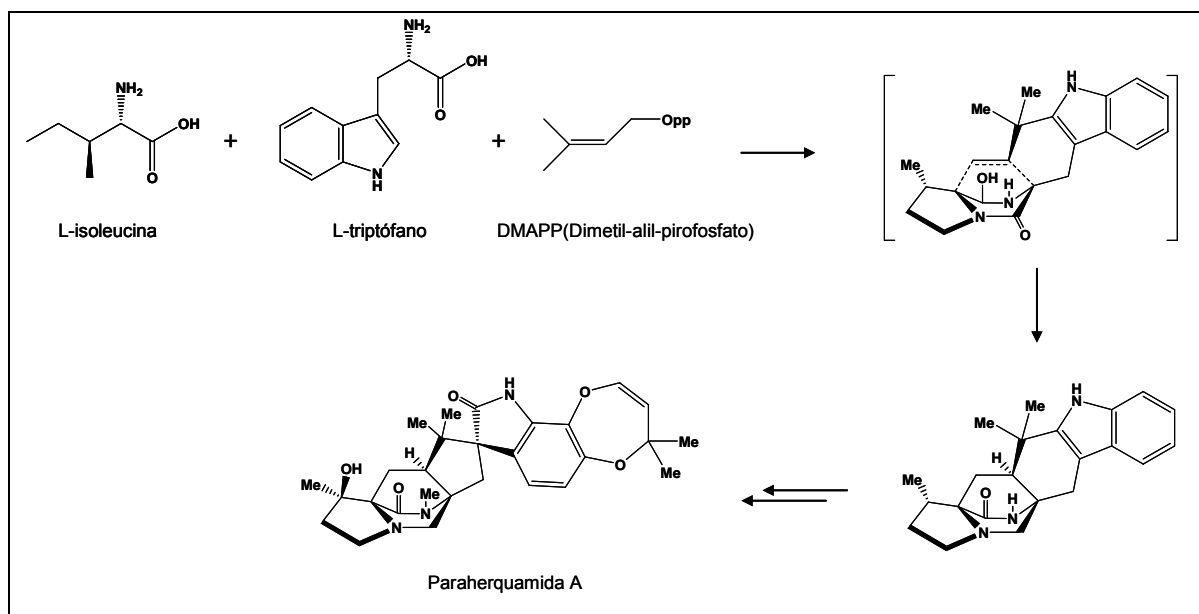
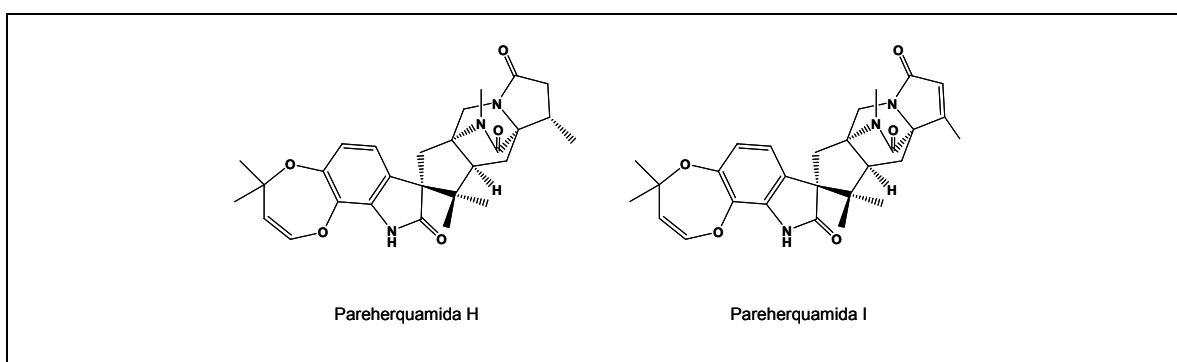


Fig 66. Ruta biosintética y estructura de paraherquamida A

(-) PHQ-A¹⁰⁶ (FX-2), (-) PHQ-B¹⁹² (FX-3), (-) PHQ-E¹⁹² (FX-4), (-) VM55597¹⁹³ (FX-5) y (-) VM55596¹⁹² (FIX-1-F) (Fig 65) son paraherquamidas ya conocidas aunque es la primera vez que se describen en *P. cluniae*. Sin embargo, los datos espectroscópicos y espectrométricos de FX-1 y FIX-2-A no coinciden con ningún compuesto descrito hasta el momento en la bibliografía. La gran similitud existente entre los datos espectrales de estos compuestos y los derivados de la familia paraherquamida, permite deducir que se trata de moléculas pertenecientes a este grupo, así que han sido denominadas por nuestro laboratorio como **PHQ-H** y **PHQ-I**, respectivamente. La estructura se determina por comparación de sus datos espectroscópicos de ¹H RMN y ¹³C RMN con los datos de otras paraherquamidas y se confirma con los experimentos de dos dimensiones (COSY ¹H-¹H, NOESY ¹H-¹H, HSQC y HMBC) y espectrometría de masas de alta resolución (Tabla 10).

Fig 67. Estructura de las nuevas paraherquamidas aisladas a partir de *Penicillium cluniae*

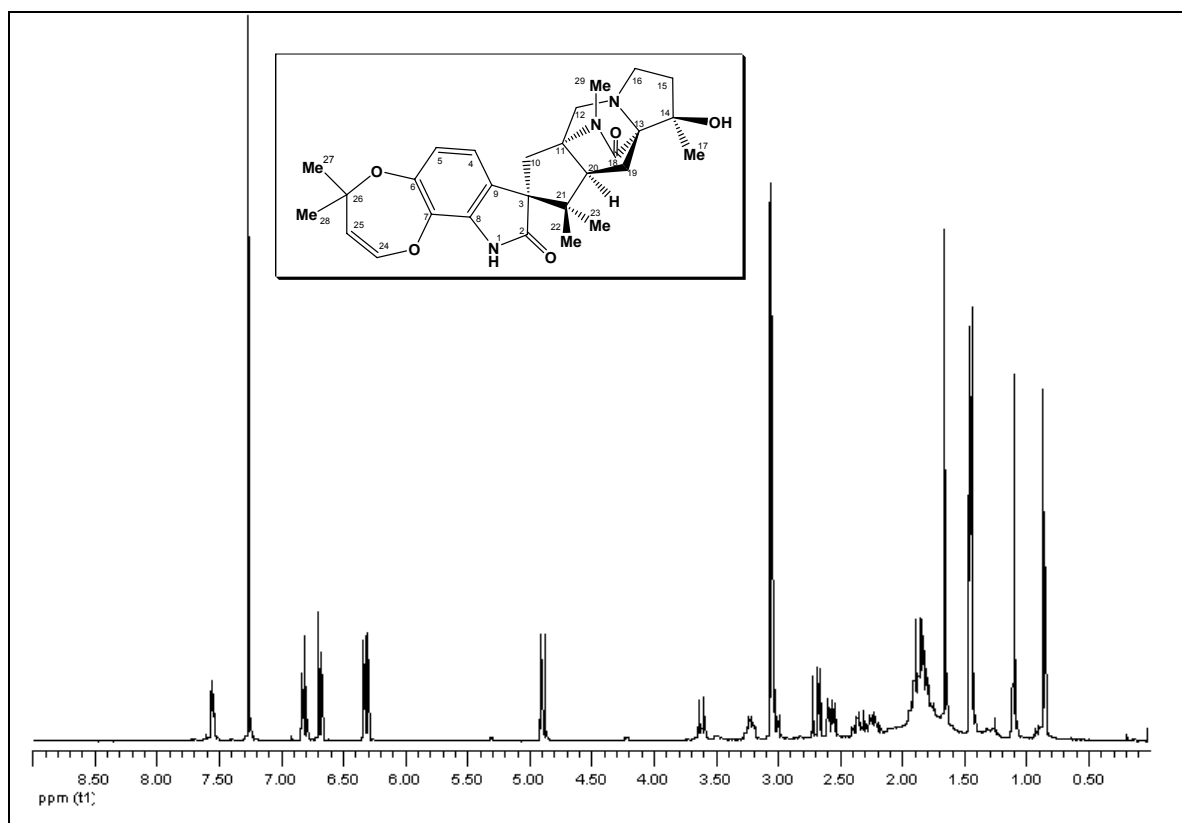
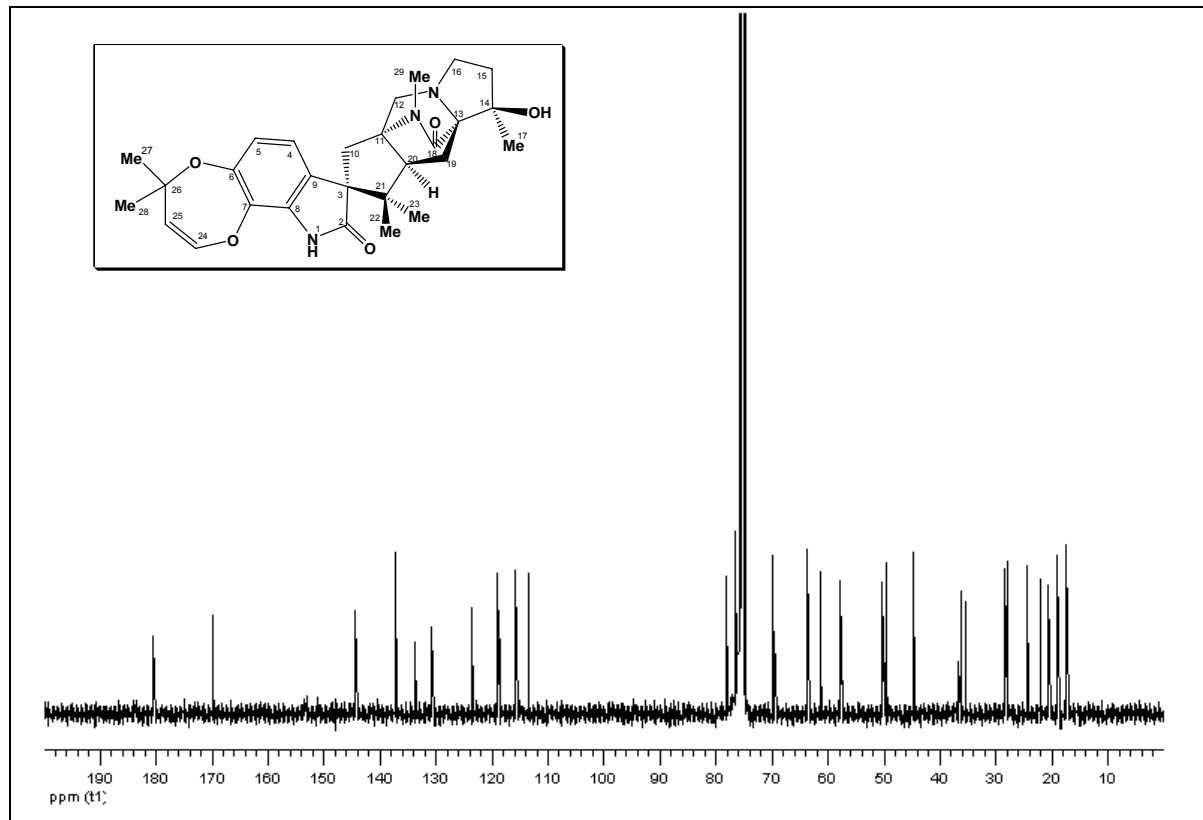
El estudio de los espectros de RMN permitió identificar el anillo de siete miembros dioxigenado insaturado 1,2-disustituído unido a un *spiro*-indol y el anillo biciclo [2.2.2] diazocetano unido a una unidad de prolina. Diferencias en los sustituyentes de este aminoácido establecen las

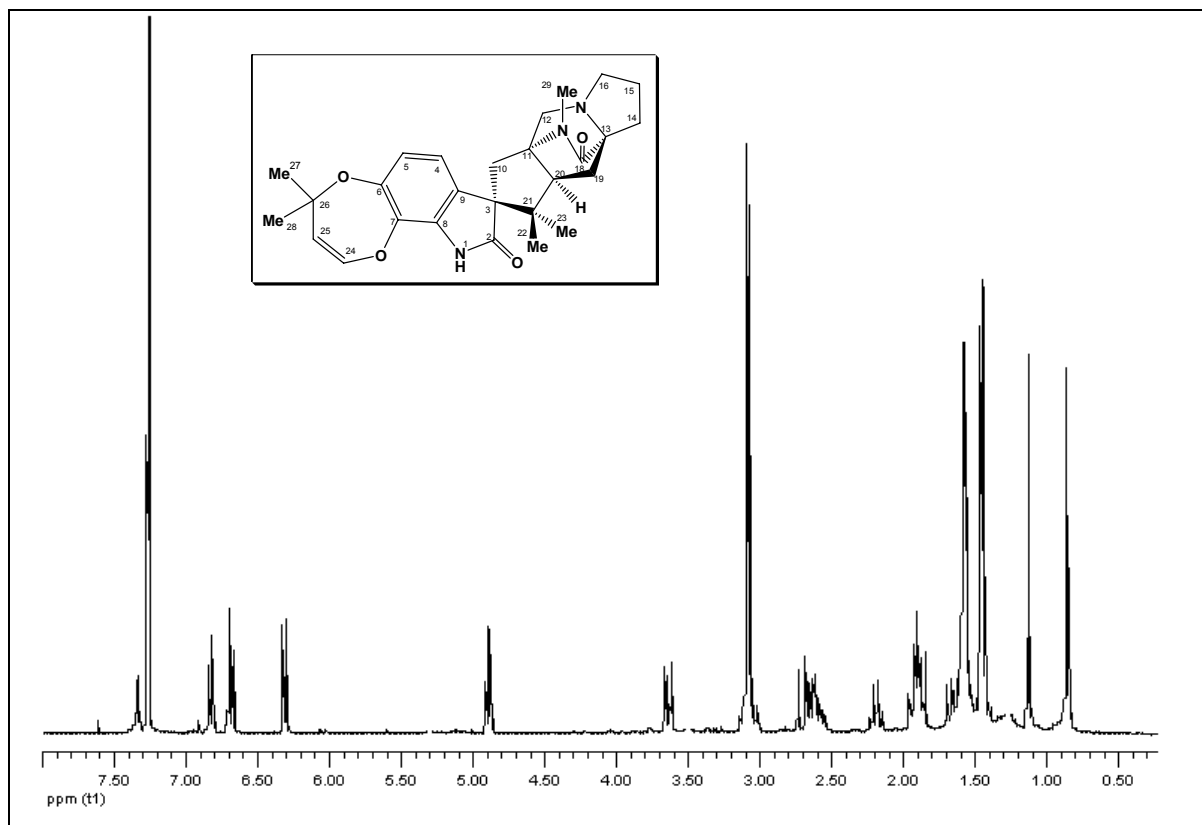
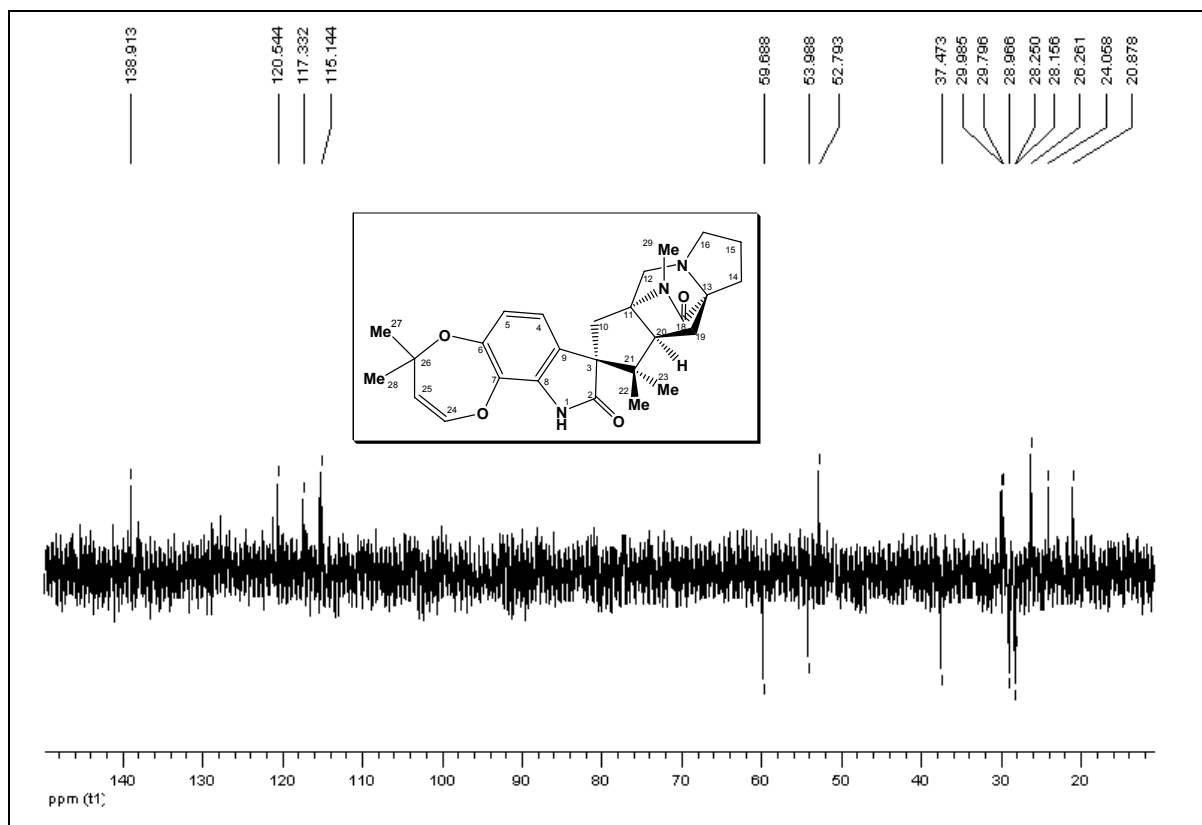
distintas paraherquamidias aisladas en *P. cluniae*. La presencia en el espectro de ^1H RMN de un singulete alrededor de 2.90 ppm que integra por tres protones para todos los compuestos aislados, indica que todos ellos poseen un grupo N-metilo. Los datos proporcionados por los espectros de masas fueron determinantes para la elucidación de las estructuras de los compuestos aislados.

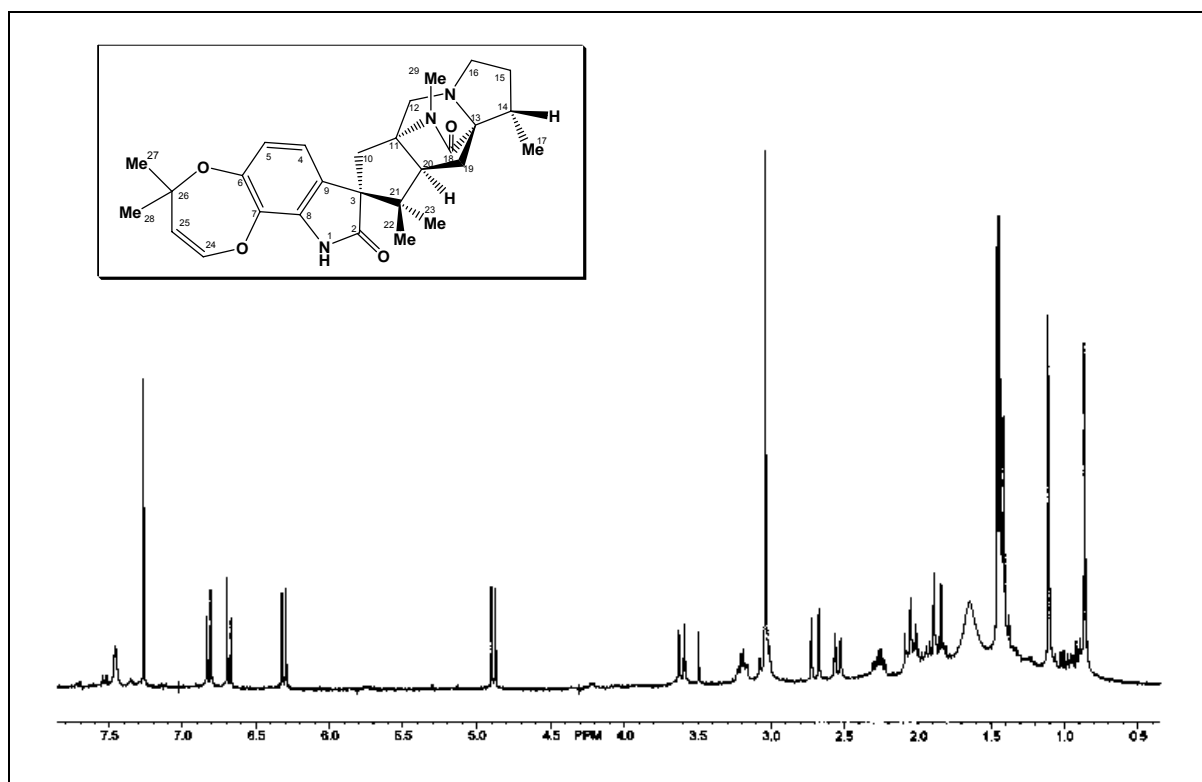
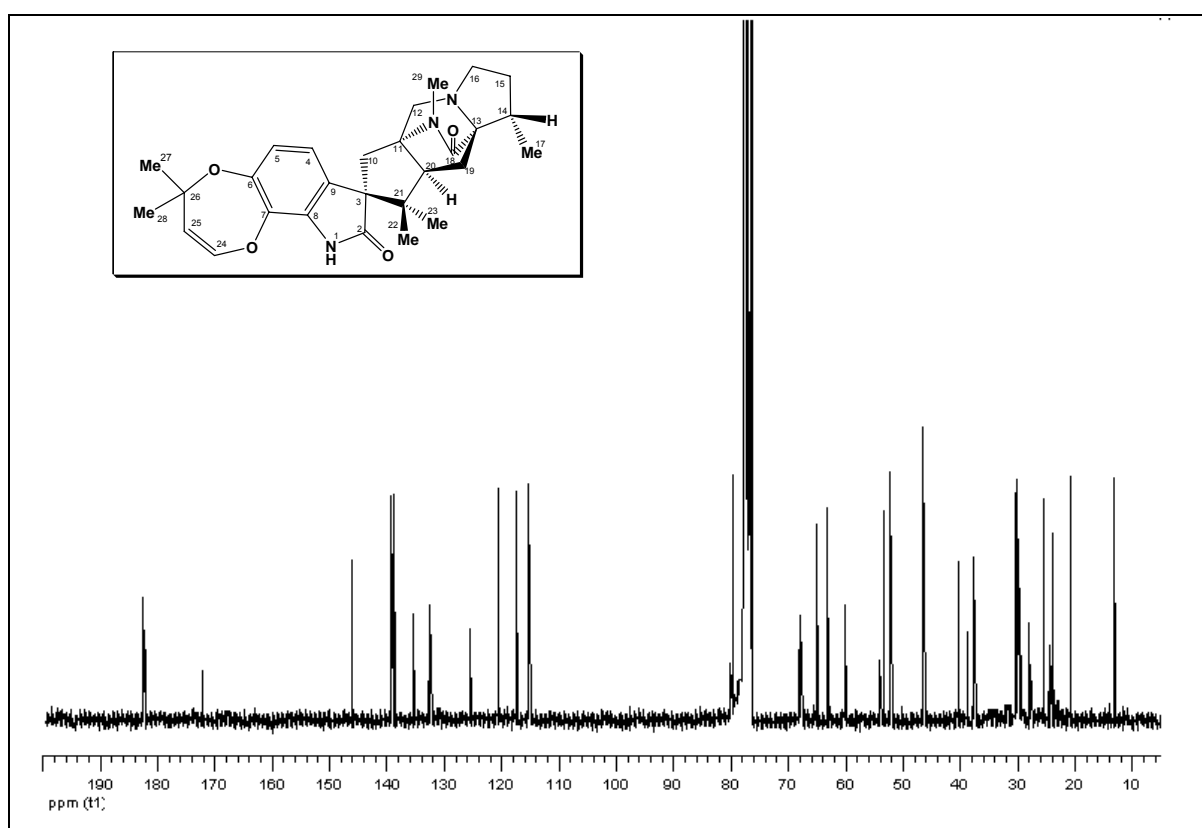
(-) PHQ-A (FX-2); ^1H (300 MHz, CDCl_3) RMN: 7.55 (1H, s, NH-1), 6.81 (1H, d, $J_{4-5}=8.1$, H-4), 6.68 (1H, d, $J_{4-5}=8.1$, H-5), 6.31 (1H, d, $J_{24-25}=7.8$, H-24), 4.89 (1H, d, $J_{24-25}=7.8$, H-25), 3.62 (1H, d, $J_{12a-12b}=11.4$, H-12a), 3.23 (1H, td, $J_{16a-15}=8.7$, $J_{16a-16b}=3.9$, H-16a), 3.05 (3H, s, CH_3 -29), 3.02 (1H, m, H-20), 2.69 (1H, d, $J_{10a-10b}=15.6$, H-10a), 2.57 (1H, d, $J_{12a-12b}=11.4$, H-12b), 2.35 (1H, m, H-16b), 2.31 (1H, m, H-15a), 1.88 (1H, m, H-15b), 1.85 (2H, m, H-19a, H-10b), 1.79 (1H, m, H-19b), 1.65 (3H, s, CH_3 -17), 1.45 (3H, s, CH_3 -27), 1.44 (3H, s, CH_3 -28), 1.10 (3H, s, CH_3 -22) y 0.95 (3H, s, CH_3 -23). ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) RMN: 182.34 (C-2), 169.72 (C-18), 144.29 (C-6), 137.18 (C-24), 133.42 (C-7), 130.47 (C-8), 123.36 (C-9), 118.69 (C-4), 115.55 (C-5), 113.38 (C-25), 78.05 (C-26), 76.35 (C-14), 69.50 (C-13), 63.56 (C-11), 61.22 (C-3), 57.50 (C-12), 50.17 (C-16), 49.7 (C-20), 44.65 (C-21), 36.35 (C-15), 35.50 (C-10), 28.21 (C-27), 28.05 (C-28), 24.14 (C-29), 22.09 (C-19), 20.44 (C-23), 18.76 (C-22) y 17.33 (C-17). EIMS m/z 494.1 (M+1) $\text{C}_{28}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_5$.

(-) PHQ-B (FX-3); ^1H (300 MHz, CDCl_3) RMN: 7.33 (1H, s, NH-1), 6.81 (1H, d, $J_{4-5}=8.4$, H-4), 6.71 (1H, d, $J_{4-5}=8.4$, H-5), 6.30 (1H, d, $J_{24-25}=7.5$, H-24), 4.88 (1H, d, $J_{24-25}=7.5$, H-25), 3.63 (1H, d, $J_{12a-12b}=11.1$, H-12a), 3.11 (1H, m, H-16a), 3.05 (3H, s, CH_3 -29), 3.02 (1H, m, H-20), 2.70 (1H, d, $J_{10a-10b}=15.3$, H-10a), 2.63 (1H, d, $J_{12a-12b}=11.1$, H-12b), 2.55 (1H, m, H-14a), 2.18 (1H, m, H-16a), 1.85 (1H, m, H-15a), 1.83 (1H, m, H-19a), 1.84 (1H, m, H-10b), 1.65 (1H, m, H-19b), 1.55 (1H, s, H-15b), 1.45 (1H, m, H-14b), 1.45 (3H, s, CH_3 -27), 1.43 (3H, s, CH_3 -28), 1.09 (3H, s, CH_3 -22), y 0.85 (3H, s, CH_3 -23). ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) RMN: 182.24 (C-2), 174.72 (C-18), 147.19 (C-6), 138.91 (C-24), 135.00 (C-7), 133.21 (C-8), 125.36 (C-9), 120.54 (C-4), 117.33 (C-5), 115.14 (C-25), 80.01 (C-26), 74.02 (C-13), 66.32 (C-11), 63.01 (C-3), 59.69 (C-12), 53.99 (C-16), 52.79 (C-20), 46.45 (C-21), 37.47 (C-10), 29.98 (C-27), 29.80 (C-28), 28.97 (C-14), 28.25 (C-15), 26.26 (C-29), 28.15 (C-19), 24.06 (C-23) y 20.88 (C-22). EIMS m/z 464.4 (M+1) $\text{C}_{27}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_4$.

(-) PHQ-E (FX-4); ^1H (300 MHz, CDCl_3) RMN: 7.43 (1H, s, NH-1), 6.82 (1H, d, $J_{4-5}=8.1$, H-4), 6.68 (1H, d, $J_{4-5}=8.1$, H-5), 6.31 (1H, d, $J_{24-25}=7.8$, H-24), 4.88 (1H, d, $J_{24-25}=7.8$, H-25), 3.61 (1H, d, $J_{12a-12b}=11.1$, H-12a), 3.20 (1H, td, $J_{16a-15}=9$, $J_{16a-16b}=4.2$, H-16a), 3.06 (3H, s, CH_3 -29), 3.05 (1H, m, H-20), 2.70 (1H, d, $J_{10a-10b}=15.3$, H-10a), 2.54 (1H, d, $J_{12a-12b}=11.1$, H-12b), 2.30 (1H, m, H-16b), 2.10 (1H, m, H-15a), 2.05 (1H, m, H-19a), 1.93 (1H, m, H-14), 1.90 (1H, d, $J_{10a-10b}=15.3$, H-10b), 1.85 (1H, m, H-15b), 1.58 (1H, m, H-19b), 1.45 (3H, s, CH_3 -27), 1.43 (3H, s, CH_3 -28), 1.42 (1H, m, H-19b), 1.42 (3H, d, $J=7$, CH_3 -17), 1.09 (3H, s, CH_3 -22) y 0.85 (3H, s, CH_3 -23). ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) RMN: 182.21 (C-2), 172.12 (C-18), 146.00 (C-6), 138.95 (C-24), 135.17 (C-7), 132.29 (C-8), 125.40 (C-9), 120.53 (C-4), 117.32 (C-5), 115.15 (C-25), 79.79 (C-26), 67.65 (C-13), 65.17 (C-11), 62.89 (C-3), 60.05 (C-12), 53.38 (C-16), 52.06 (C-20), 46.28 (C-21), 40.30 (C-14), 37.53 (C-10), 30.21 (C-15), 29.98 (C-27), 29.79 (C-28), 27.71 (C-19), 25.55 (C-29), 24.03 (C-23), 20.80 (C-22) y 13.08 (C-17). EIMS m/z 478.4 (M+1) $\text{C}_{28}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_4$.

Fig 68. ¹H RMN 300 MHz de FX-2 ((-)-PHQ-A) en CDCl₃Fig 69. ¹³C RMN 75 MHz de FX-2 ((-)-PHQ-A) en CDCl₃

Fig 70. ¹H RMN 300 MHz de FX-3 ((-)-PHQ-B) en CDCl₃Fig 71. DEPT 75 MHz de FX-3 ((-)-PHQ-B) en CDCl₃

Fig 72. ¹H RMN 300 MHz de FX-4 ((-)-PHQ-E) en CDCl₃Fig 73. ¹³C RMN 75 MHz de FX-4 ((-)-PHQ-E) en CDCl₃

(-) **VM55597** (FX-5); ^1H (300 MHz, CDCl_3) RMN: 7.39 (NH-1), 6.82 (H-4, *d*, $J_{4-5}=7.5$ Hz), 6.72 (H-5, *d*, $J_{4-5}=7.5$ Hz), 6.30 (H-24, *d*, $J_{24-25}=7.8$ Hz), 4.90 (H-25, *d*, $J_{24-25}=7.8$ Hz), 3.62 (H-12a, *d*, $J_{12a-12b}=11.4$ Hz), 3.49 (H-12b, *m*), 3.21 (H-20, *m*), 3.03 (H-29, *s*), 3.05 (H-20, *m*), 2.70 (H-10a, *d*, $J_{10a-10b}=15.0$ Hz), 2.66 (H-15a, *m*), 2.52 (H-15b, *m*), 2.03 (H-10b, *m*), 2.00 (H-19a, *m*), 2.00 (H-19b, *m*), 1.64 (H-17, *s*), 1.47 (H-27, *s*), 1.43 (H-28, *s*), 1.09 (H-22, *s*) y 0.89 (H-23, *s*). EIMS m/z 508.3 (M+1) $\text{C}_{28}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_6$.

(-) **VM55596** (FIX-1-F); ^1H (300 MHz, CDCl_3) RMN: 7.46 (NH-1), 6.80 (H-4, *d*, $J_{4-5}=8.1$ Hz), 6.71 (H-5, *d*, $J_{4-5}=8.1$ Hz), 6.30 (H-24, *d*, $J_{24-25}=7.8$ Hz), 4.90 (H-25, *d*, $J_{24-25}=7.8$ Hz), 4.12 (H-12a, *d*, $J_{12a-12b}=12.6$ Hz), 4.05 (H-16a, *m*), 3.87 (H-12b, *d*, $J_{12a-12b}=12.6$ Hz), 3.36 (H-16b, *m*), 3.25 (H-20, *m*), 3.14 (H-19a, *m*), 3.07 (H-29, *s*), 2.70 (H-10a, *d*, $J_{10a-10b}=15.6$ Hz), 2.51 (H-15a, *m*), 2.51 (H-15b, *m*), 1.88 (H-10b, *m*), 1.85 (H-19b, *m*), 1.74 (H-17, *s*), 1.45 (H-27, *s*), 1.44 (H-28, *s*), 1.23 (H-22, *s*) y 0.92 (H-23, *s*). ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) RMN: 181.62 (C-2), 168.07 (C-18), 147.05 (C-6), 138.85 (C-24), 135.26 (C-7), 132.15 (C-8), 124.01 (C-9), 120.42 (C-4), 117.70 (C-5), 115.27 (C-25), 83.60 (C-13), 79.90 (C-26), 77.92 (C-14), 76.61 (C-12), 69.79 (C-16), 62.93 (C-3), 62.81 (C-11), 53.42 (C-20), 46.93 (C-21), 39.24 (C-15), 36.29 (C-10), 30.94 (C-27), 29.93 (C-28), 27.12 (C-29), 23.44 (C-23), 22.40 (C-17), 21.41 (C-22) y 14.64 (C-19). EIMS m/z 510.3 (M+1) $\text{C}_{28}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_6$.

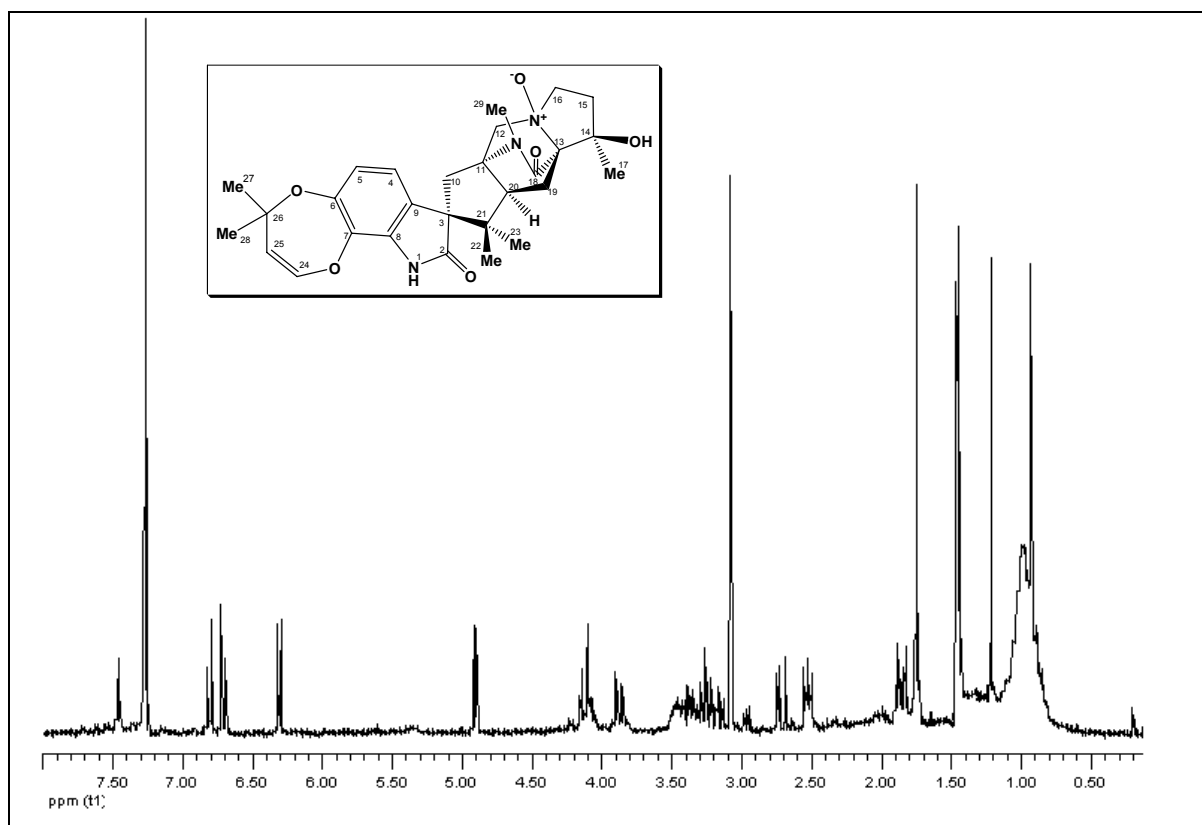


Fig 74. ^1H RMN 300 MHz de FIX-1-F ((-) VM55596) en CDCl_3

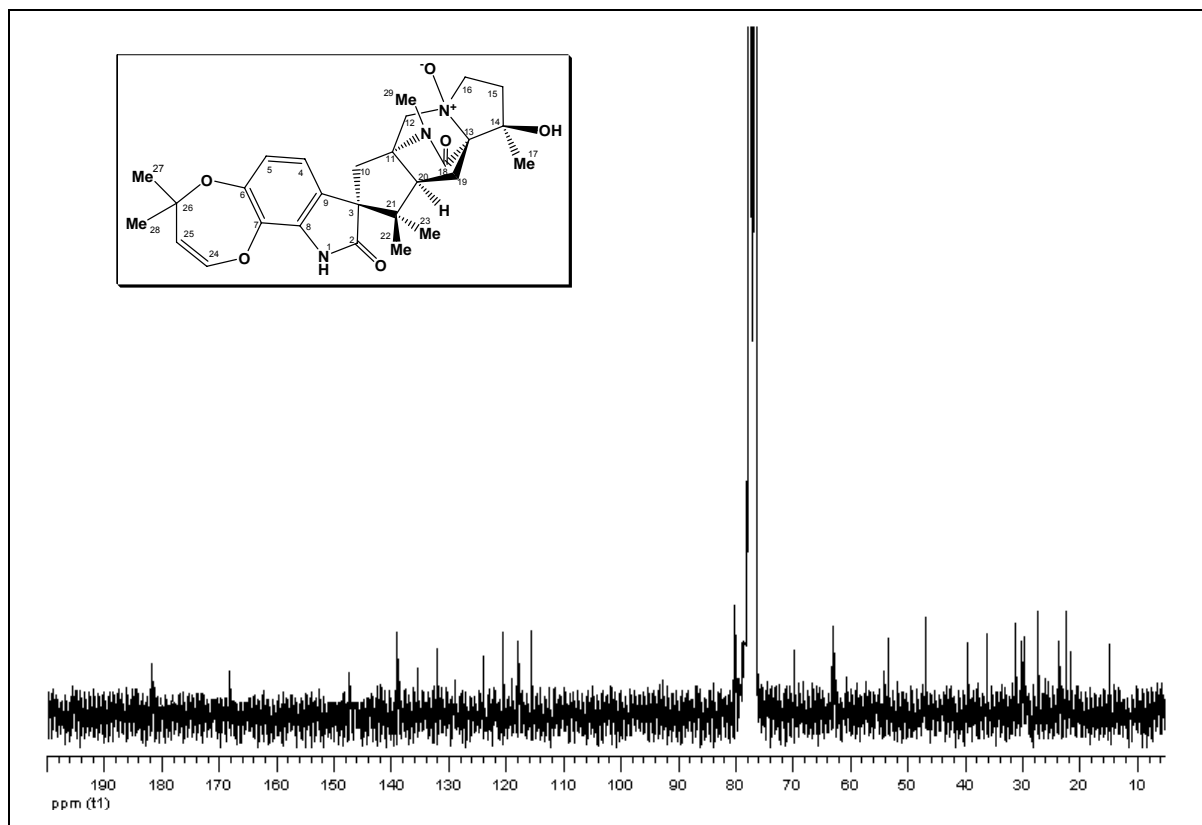


Fig 75. ^{13}C RMN 75 MHz de FIX-1-F ((-)-VM55596) en CDCl_3

(-) PHQ-H (FX-1) se obtuvo como un sólido blanco con un poder rotatorio $[\alpha]_D -30.0^\circ$ (c 0.03, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} ($\log \epsilon$) 222 (1.00) nm; IR (film) ν_{max} 1736, 1706, 1669, 1459, 1188, 1081, 968 cm^{-1} . Posee la siguiente fórmula molecular $\text{C}_{28}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_5$, de acuerdo con el espectro de masas de alta resolución por ES positivo que presenta un pico molecular m/z 514.2292 $[(\text{M}+\text{Na})^+]$. El análisis de los datos de RMN permitió reconocer el esqueleto de la familia paraherquamida. En el espectro de ^1H -RMN se observaron las señales de los protones aromáticos del triptófano y los protones olefínicos del ciclo de siete miembros dioxigenado como cuatro dobletes a campo bajo. Se atribuyeron los desplazamientos a 171.01, 174.82 y 182.21 ppm en el espectro de ^{13}C -RMN a tres carbonilos tipo amida. El experimento de resonancia bidimensional a larga distancia localizó la señal del carbonilo a 174 ppm en el C-16 de la unidad de prolina por la correlación entre este carbono y el protón a δ 2.43 (H-15a). Sólo la PHQ VM55597 posee esta posición oxidada, y también ha sido aislada en este hongo y en otras cepas de *Penicillium*¹⁹⁴. La única diferencia estructural entre FX-1 y VM55597 es la presencia en ésta última de un grupo hidroxilo en C-14. El estudio exhaustivo de los experimentos de resonancia de COSY y HMBC permitió observar la presencia del fragmento CH_2CHCH_3 de la subunidad de la prolina con un metilo en la posición 14, comprobándose así la ausencia del grupo OH en la nueva paraherquamida.

(-) PHQ-I (FIX-2-A) se obtuvo como un sólido blanco con un poder rotatorio $[\alpha]_D - 25.1^\circ$ (c 0.04, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} ($\log \epsilon$) 225 (1.01) nm; IR (film) ν_{max} 1740, 1716, 1674, 1470, 1178, 1081, 968 cm^{-1} . La estructura de FIX-2-A se estableció por comparación de sus espectros de RMN y EM con los de PHQ-H. HRESMS muestra un pico molecular m/z 512.2159 $[(\text{M}+\text{Na})^+]$ que

corresponde a la fórmula molecular $C_{28}H_{31}N_3O_5$, dos unidades menos que PHQ-H. De acuerdo con los datos de RMN, PHQ-I y PHQ-H son muy similares, con diferencias apreciables solamente en la subunidad de prolina. Este compuesto posee también el carbonilo en posición 16 y el metilo en posición 14, al igual que PHQ-H, pero difiere de ésta en un doble enlace entre C-14 y C-15. Esto se estableció por la ausencia en su espectro de ^{13}C RMN de las señales a δ 34.21 y 39.6, correspondientes a C-14 y C-15 en PHQ-H. En este caso, dos nuevas señales a δ 159.2 y 125.5 aparecen en el espectro de ^{13}C RMN, correspondiendo a un carbono sp^2 cuaternario y un carbono sp^2 protonado respectivamente, localizados en las posiciones 14 y 15 de acuerdo con los datos registrados por el HMBC.

La estereoquímica relativa de PHQ-H y PHQ-I fue la misma que el resto de las paraherquamidas y se estableció en base a la similitud de los desplazamientos químicos de 1H RMN y ^{13}C RMN y a las correlaciones observadas en el NOESY para cada una de ellas. En el caso de PHQ-H, la correlación entre el H-4 con H-5 y CH_3 -22 fue crítica para establecer la estereoquímica del *spiro* centro, mientras que las interacciones NOESY entre H-20 con H-12b, H-19b y CH_3 -23, localizaron a estos sustituyentes en el lado opuesto del anillo ciclopentano. Estos datos NOESY también permitieron determinar la estereoquímica relativa de los protones geminales H-10 y H-15 y del protón H-14 y los protones del CH_3 -17. De esta manera el C-13 por tensión del anillo debe tener la configuración relativa descrita para permitir el enlace de puente amida con el C-11. Las correlaciones NOESY observadas para PHQ-I fueron muy similares a las de PHQ-H, indicando la misma estereoquímica relativa. Asumiendo que la configuración absoluta del C-20 en ambas moléculas es la misma que la que se determinó por difracción de Rayos X para el derivado de paraherquamida A^{201} , se podría establecer que la configuración absoluta para PHQ-H y PHQ-I es: 3*R*, 11*S*, 13*R*, 14*S*, 20*S* y 3*R*, 11*S*, 13*R*, 20*S*, respectivamente.

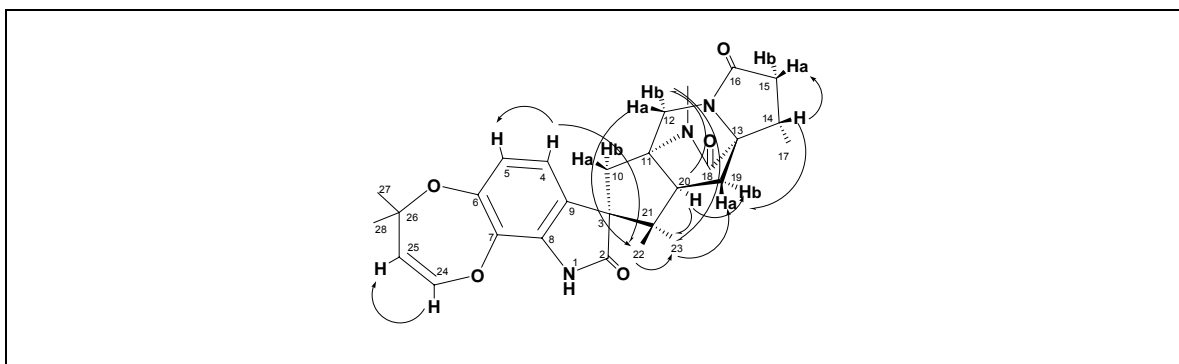


Fig 76. Correlaciones NOESY observadas para el compuesto FX-1 ((-) PHQ-H)

	PHQ-H				PHQ-I			
	δ_H (m, <i>J</i> en Hz)	δ_C	HMBC con H	COSY	δ_H (m, <i>J</i> en Hz)	δ_C	HMBC con H	COSY
2	-	182.2	1.92, 2.69	-	-	182.0	2.05, 2.85	-
3	-	63.2	2.69, 1.08, 0.88	-	-	62.8	0.95, 1.10, 2.85, 2.05	-
4	6.80 (<i>d</i> , 8.1)	120.6	-	6.71	6.82 (<i>d</i> , 8.2)	121.1	-	6.72
5	6.71 (<i>d</i> , 8.1)	117.4	-	6.80	6.72 (<i>d</i> , 8.2)	118.9	-	6.82
6	-	147.2	6.71, 6.80	-	-	147.6	6.82	-
7	-	135.5	6.31, 6.71	-	-	135.4	6.31, 6.72	-
8	-	131.5	6.80	-	-	133.1	6.82	-
9	-	125.0	1.92, 6.71	-	-	125.0	6.72	-
10a	2.69 (<i>d</i> , 15.7)	37.2	-	1.92	2.85 (<i>d</i> , 16.2)	37.2	-	2.05
10b	1.92 (<i>d</i> , 15.7)			2.69	2.05 (<i>d</i> , 16.2)			2.85
11	-	64.0	2.69, 2.90, 3.16, 3.42	-	-	66.5	2.85, 3.60, 3.36, 3.07	-
12a	3.53 (<i>d</i> , 11.6)	49.1	1.92-	3.42	3.91 (<i>d</i> , 12.0)	48.0	2.05	3.60
12b	3.42 (<i>d</i> , 11.6)			3.53	3.60 (<i>d</i> , 12.0)			3.91
13	-	65.4	1.52, 2.43	-	-	70.2	2.26, 5.90	-
14	2.20 (<i>m</i>)	34.2	-	1.52, 2.31, 2.43	-	159.2	2.26	-
15a	2.43 (<i>dd</i> , 16.1, 8.3)	39.6	1.52	2.31	5.90 (<i>s</i>)	125.5	2.26	2.26
15b	2.31 (<i>dd</i> , 16.1, 8.3)			2.43				
16	-	174.8	2.43	-	-	171.0	-	-
17	1.52 (<i>m</i>)	24.8	2.20	2.20	2.26 (<i>s</i>)	14.9	-	5.90
18	-	171.0	2.90	-	-	169.0	5.90, 3.07	-
19a	2.10 (<i>m</i>)	28.2	0.88, 3.16	3.16, 1.48	2.32 (<i>m</i>)	27.5	-	3.36, 1.51
19b	1.48 (<i>m</i>)			3.16, 2.10	1.51 (<i>m</i>)			3.36, 2.32
20	3.16 (<i>td</i> , 10.3, 1.3)	53.2	0.88, 1.08	2.10, 1.48	3.36 (<i>m</i>)	52.7	1.10, 0.95	2.32, 1.51
21	-	46.4	0.88, 1.08, 2.69, 3.16	-	-	46.5	2.85, 3.36, 1.10, 0.95	-
22	1.08 (<i>s</i>)	20.4	0.88	0.88	1.10 (<i>s</i>)	21.0	0.95	-
23	0.88 (<i>s</i>)	23.8	1.08	1.08	0.95 (<i>s</i>)	24.0	1.10	-
24	6.31 (<i>d</i> , 7.7)	138.4	1.46, 4.90	4.90	6.31 (<i>d</i> , 7.2)	140.0	4.90	4.90
25	4.90 (<i>d</i> , 7.7)	115.0	1.44, 1.46, 6.31	6.31	4.90 (<i>d</i> , 7.2)	116.0	6.31	6.31
26	-	80.1	1.44, 1.46, 6.31, 4.90	-	-	80.1	6.31	-
27	1.46 (<i>s</i>)	30.6	1.44	1.44	1.46 (<i>s</i>)	30.2	-	-
28	1.44 (<i>s</i>)	30.0	1.46	1.46	1.44 (<i>s</i>)	30.0	-	-
29	2.90 (<i>s</i>)	26.8	-	-	3.07 (<i>s</i>)	25.9	-	-

Tabla 10. ^1H RMN, ^{13}C RMN, ^1H - ^1H (COSY) y ^1H - ^{13}C (HMBC) de FX-1 ((-) PHQ-H) y FIX-2-A ((-) PHQ-I) en CDCl_3

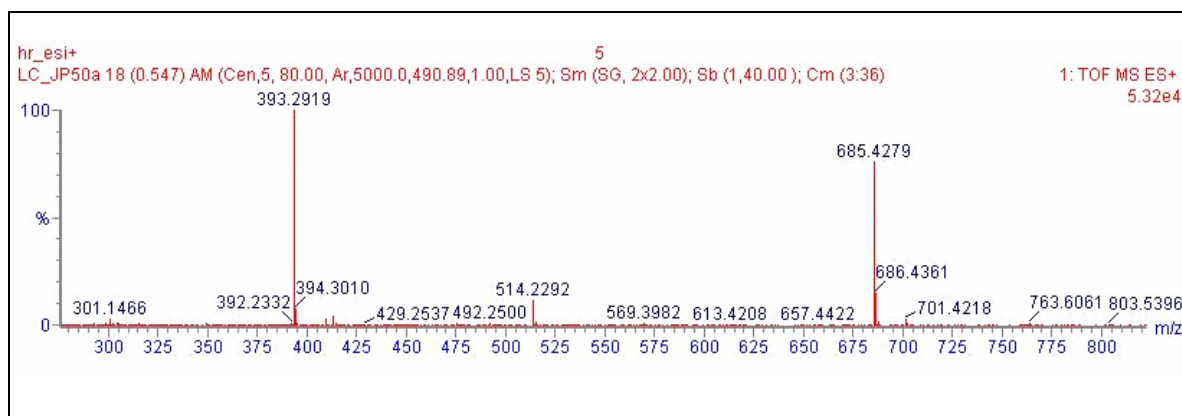
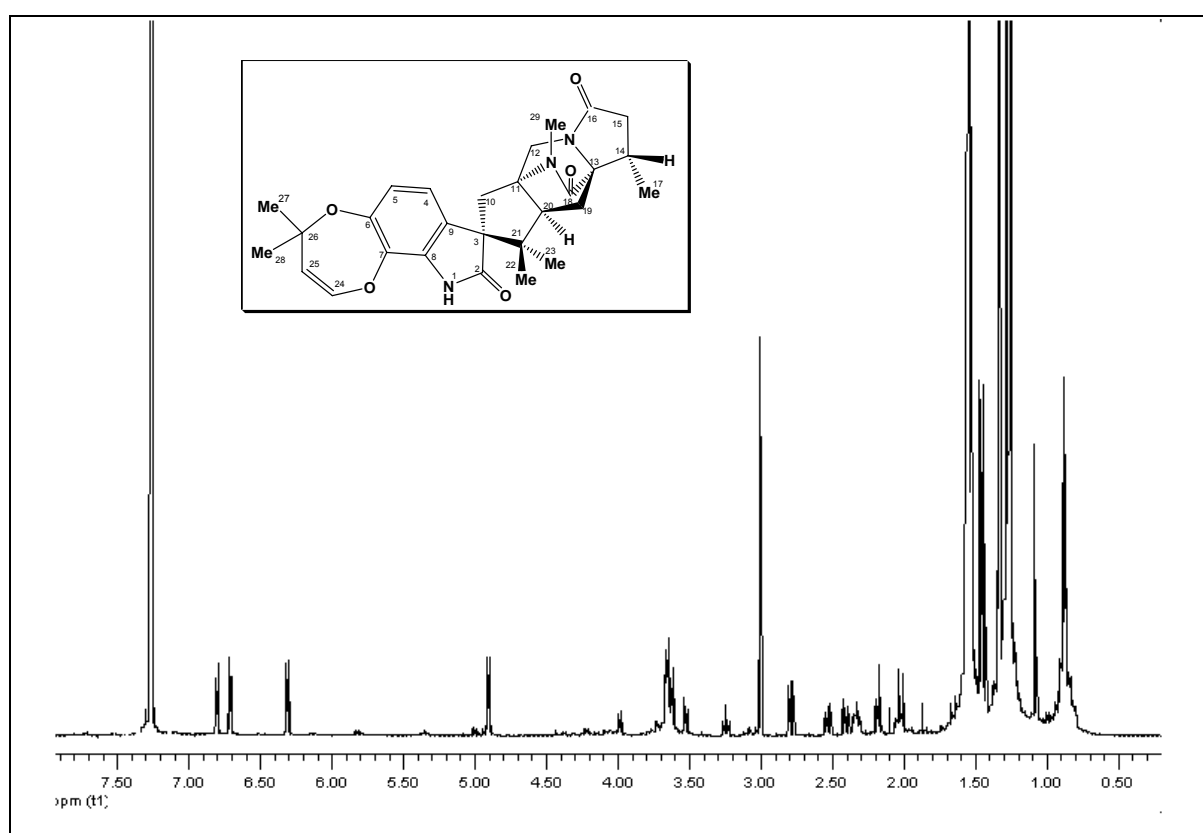
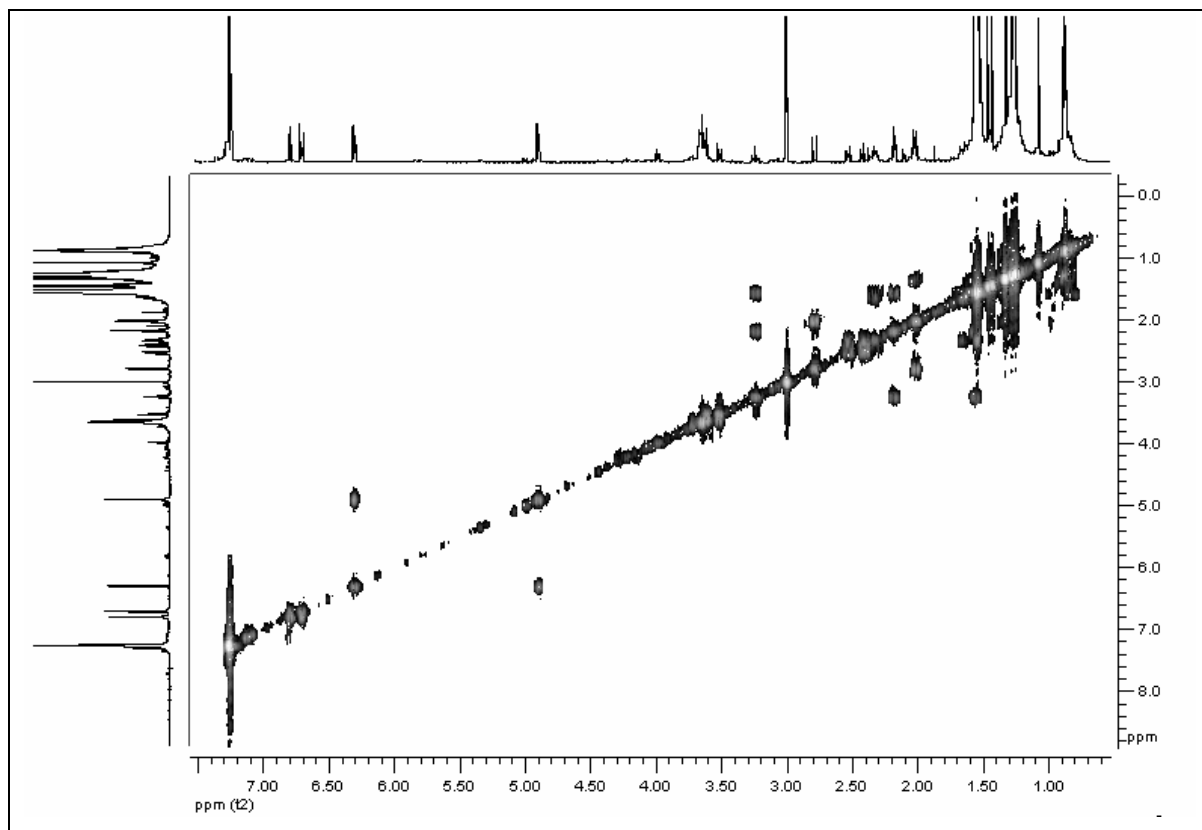
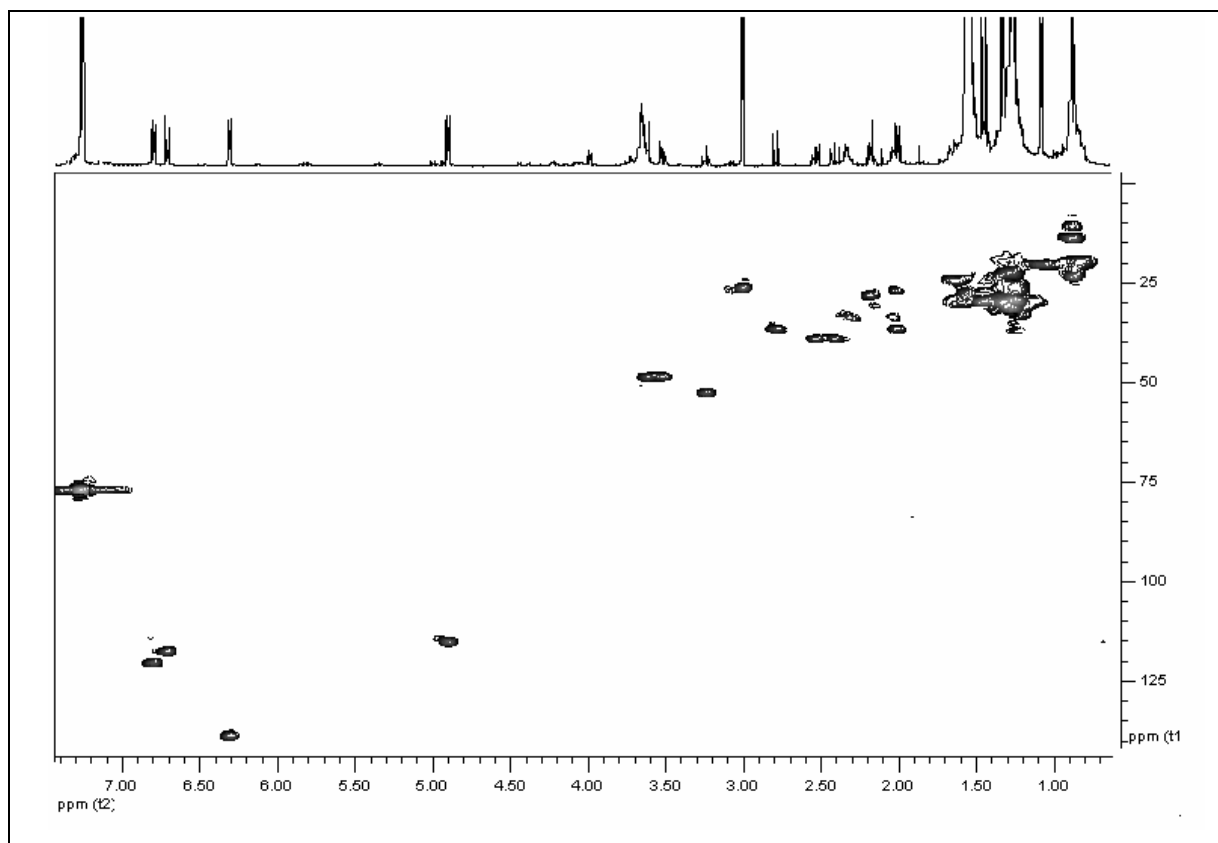
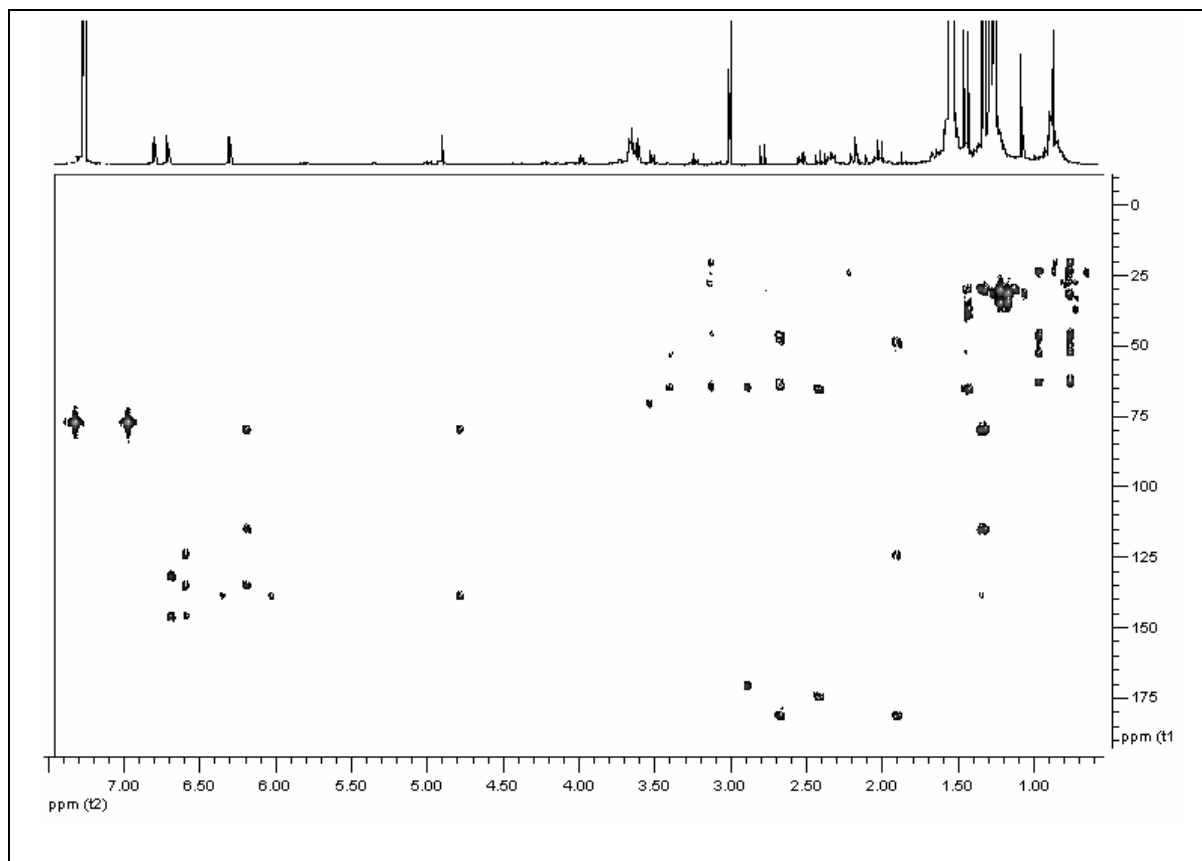
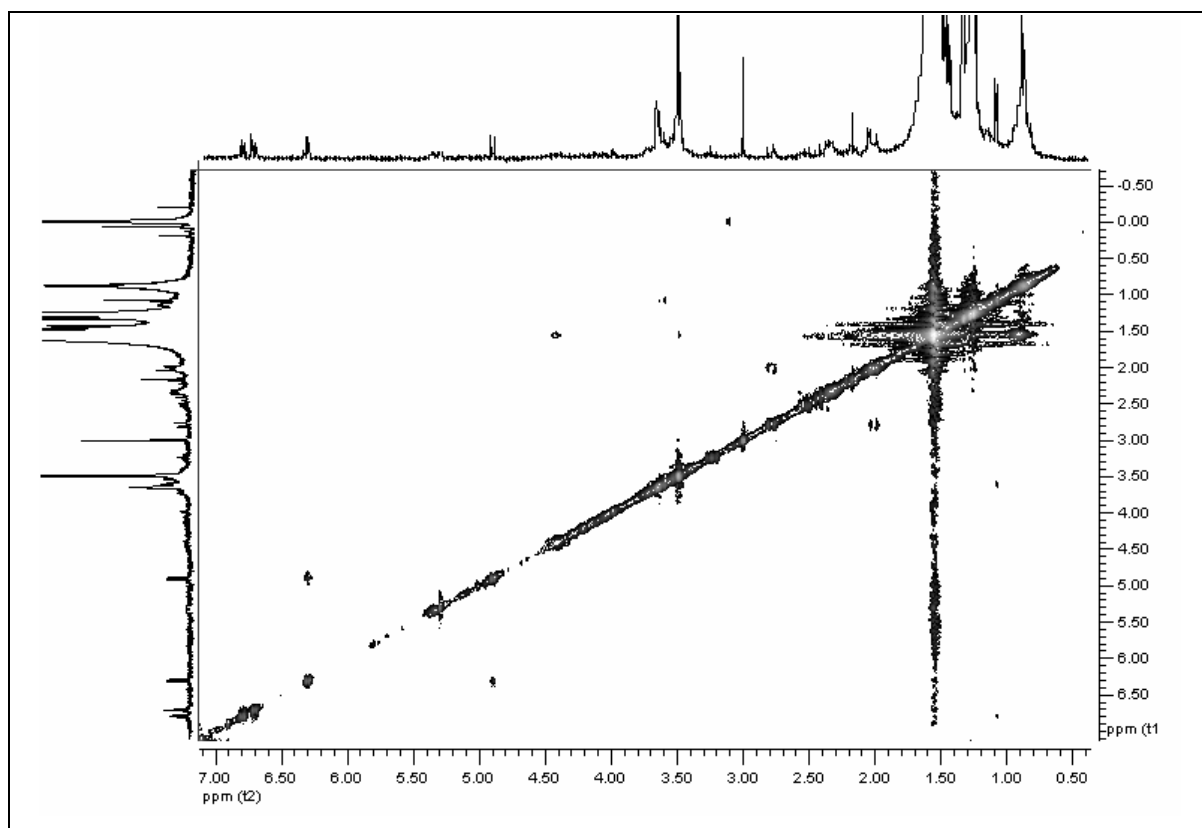


Fig 77. EHRMS de FX-1 ((-)-PHQ-H)

Fig 78. ^1H RMN 600 MHz de FX-1 ((-)-PHQ-H) en CDCl_3

Fig 79. COSY 600MHz de FX-1 ((-) PHQ-H) en CDCl_3 Fig 80. HSQC 600MHz de FX-1 ((-) PHQ-H) en CDCl_3

Fig 81. HMBC 600MHz de FX-1 ((-) PHQ-H) en CDCl_3 Fig 82. NOESY 300MHz de FX-1 ((-) PHQ-H) en CDCl_3

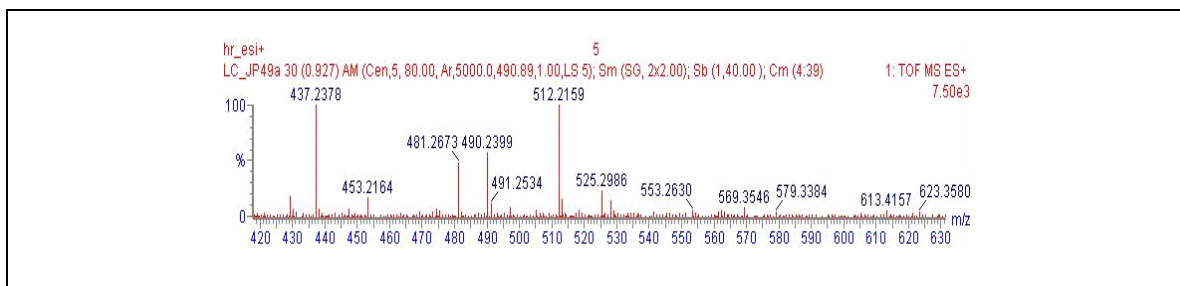
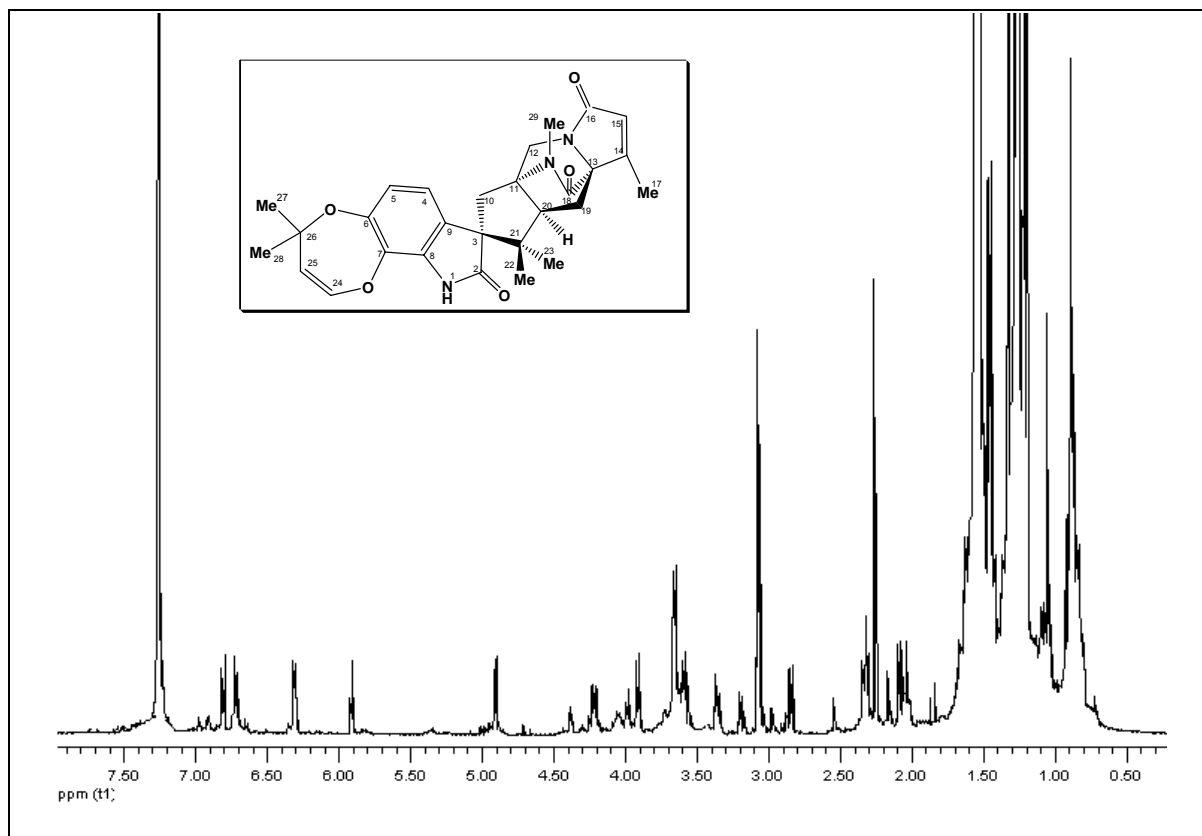
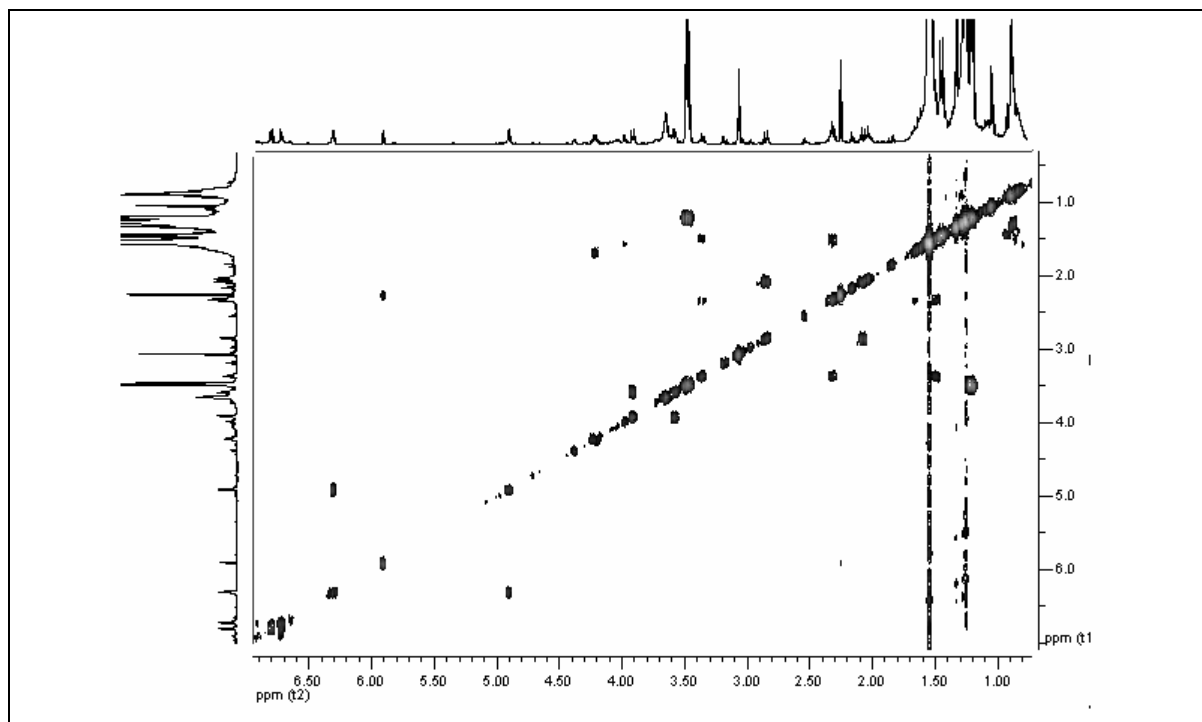
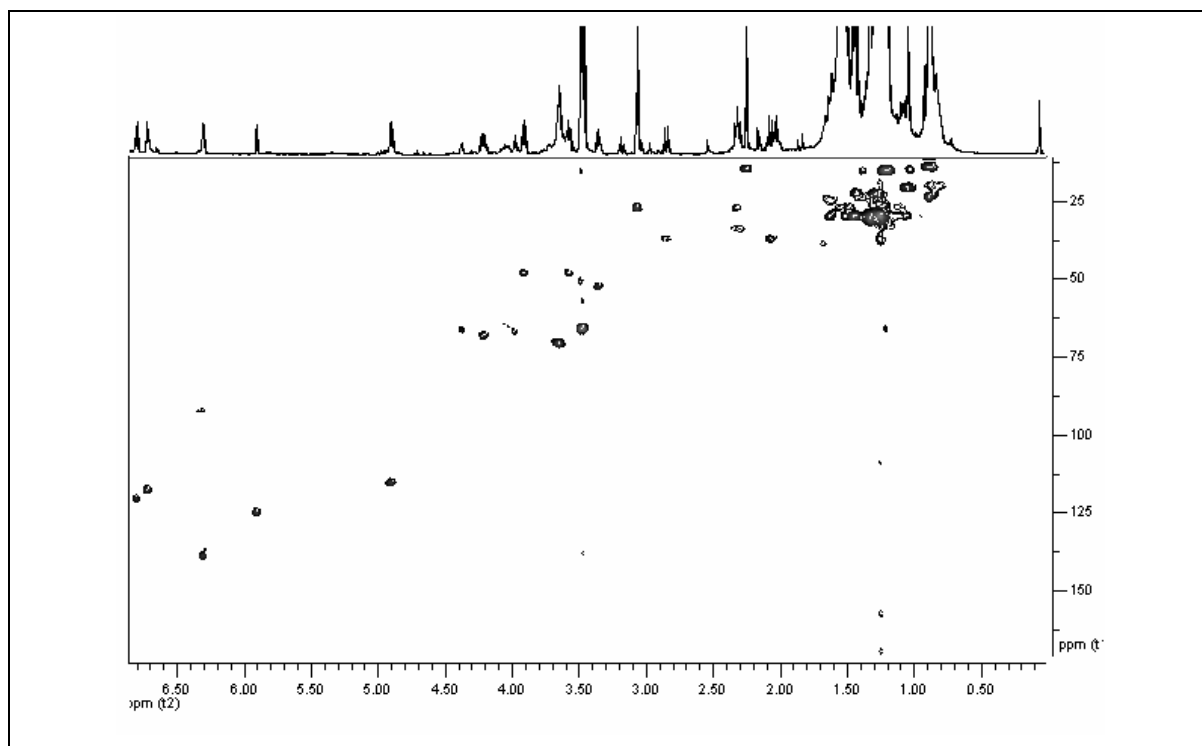
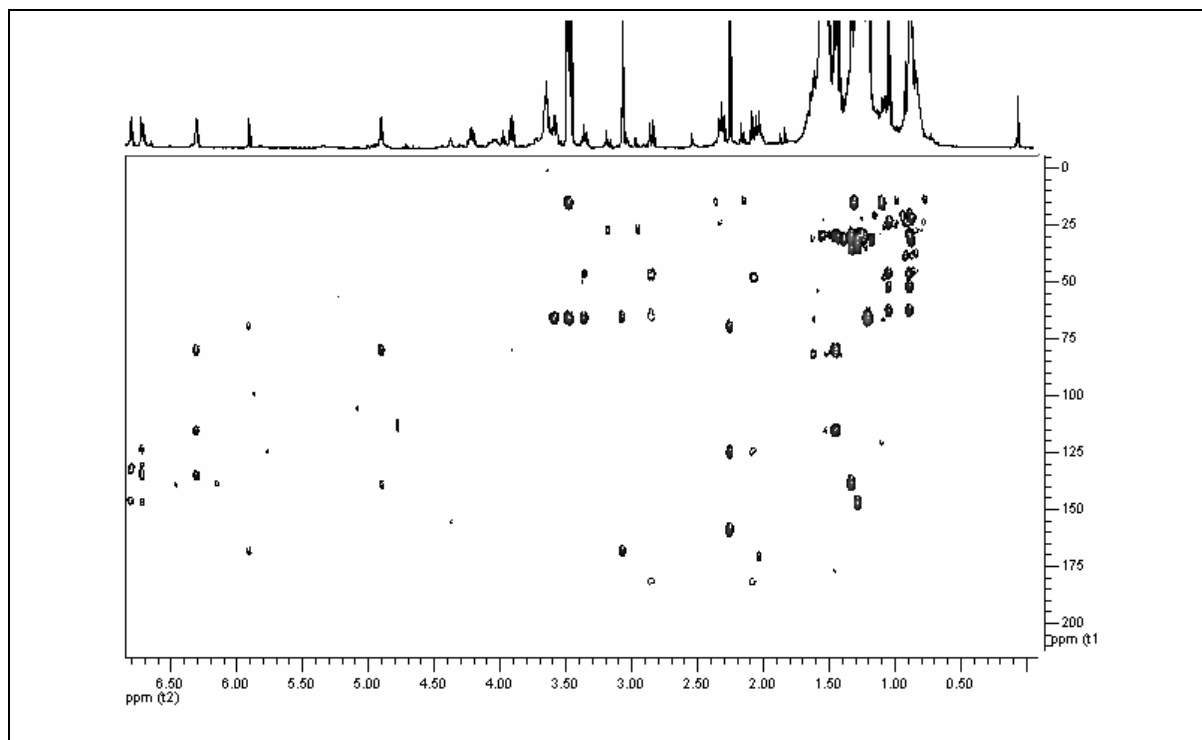
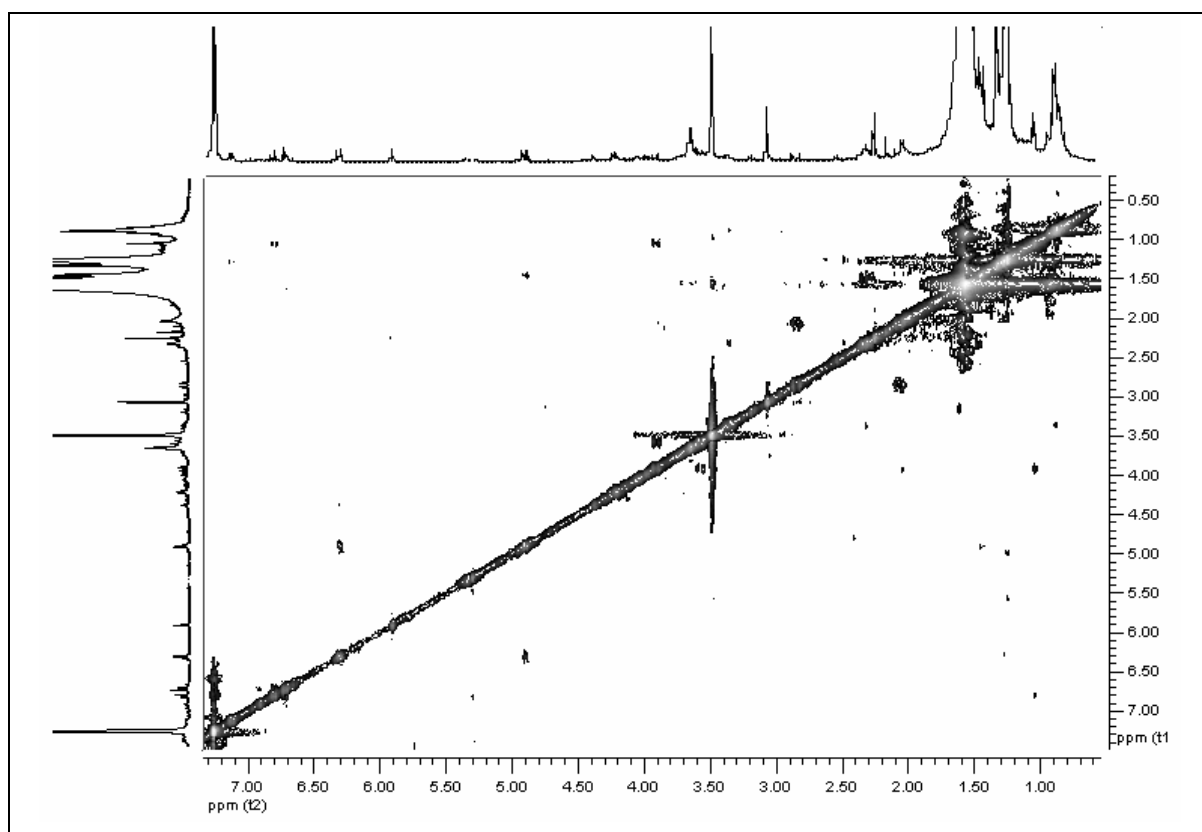


Fig 83. EIHRMS de FIX-2-A ((-)-PHQ-I)

Fig 84. ^1H RMN 600 MHz de FIX-2-A ((-)-PHQ-I) en CDCl_3

Fig 85. COSY 600 MHz de FIX-2-A ((-) PHQ-I) en CDCl_3 Fig 86. HSQC 600 MHz de FIX-2-A ((-) PHQ-I) en CDCl_3

Fig 87. HMBC 600 MHz de FIX-2-A ((-)-PHQ-I) en CDCl_3 Fig 88. NOESY 300 MHz de FIX-2-A ((-)-PHQ-I) en CDCl_3

2.6 Actividades biológicas de los compuestos puros

2.6.1. Actividad citostática

A partir de la fracción VII que mostró actividad citostática se aisló el **(+)** **brefeldin A** (BFA), macrólido ya conocido por sus propiedades antitumorales¹⁸⁴ y se procedió a la realización de los ensayos citostáticos según el método descrito en el apartado 2.6 de Material y métodos. Se obtuvo una CI_{50} de proliferación de fibroblastos NIH-3T3 de 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Fig 89).

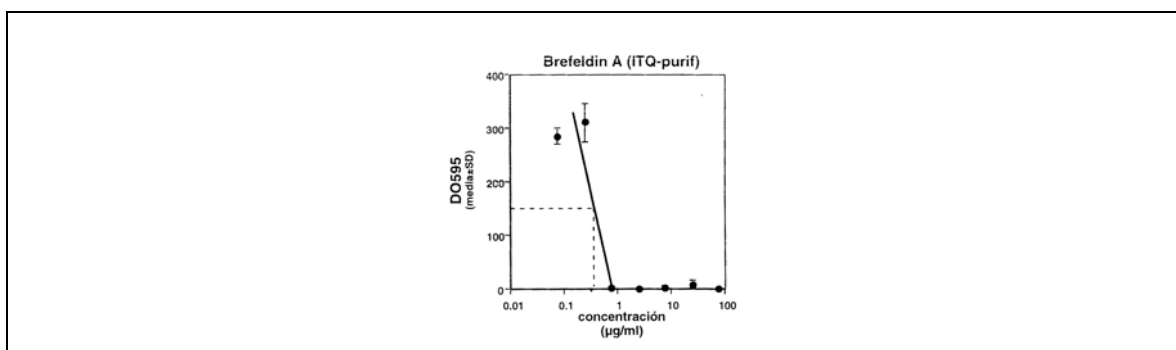


Fig 89. CI_{50} de (+) brefeldin A en células NIH-3T3

Los resultados obtenidos muestran que efectivamente BFA es el compuesto responsable de la actividad citostática del extracto fúngico inicial. A pesar de que BFA presenta una CI_{50} de 1.78 μM , el docetaxel y el paclitaxel, antitumorales de origen natural empleados en clínica, muestran una IC_{50} del orden nM frente a la misma línea celular²⁰². El mecanismo de acción de BFA se basa en el bloqueo específico y reversible del transporte de proteínas desde el retículo endoplasmático hasta el aparato de Golgi²⁰³. Por estos efectos BFA se ha convertido en una buena herramienta en el desarrollo de técnicas de biología molecular. Aunque su síntesis estereoselectiva ya ha sido descrita²⁰⁴, BFA se sigue aislando a partir de *P. brefeldianum*, por lo que *P. cluniae* se puede considerar ahora una nueva fuente de obtención de BFA.

2.6.2. Actividad insecticida frente a *O. fasciatus*

A partir de las fracciones IX y X que mostraron actividad insecticida, se aislaron dos familias de compuestos: diketopiperazinas y paraherquamidas. Ambas se sometieron a los ensayos insecticidas según el apartado 2.5 de Material y métodos, siendo las paraherquamidas las responsables de la actividad insecticida del extracto fúngico inicial, ya que las DKPs no mostraron actividad a altas dosis (20 $\mu\text{g}/\text{ninfa}$). En la tabla 11 se muestran los resultados obtenidos para las PHQ aisladas en los ensayos insecticidas por aplicación tópica frente a *O. fasciatus*. PHQ.H y PHQ.I no fueron ensayadas porque no se dispuso de cantidad suficiente para realizar estos ensayos.

Compuestos	DL ₅₀ (95%LC) ^a
(-) PHQ-A	0.320 (0.260, 0.380)
(-) PHQ-B	16.540 (13.140, 19.940)
(-) PHQ-E	0.089 (0.086, 0.092)
(-) VM55596	7.010 (4.680, 9.340)
(-) VM55597	0.910 (0.850, 0.970)

^a Valores en µg/ninfa

Tabla 11. Actividad insecticida de PHQ aisladas en *P. cluniae*

Teniendo en cuenta la mortalidad aguda de *O. fasciatus*, calculada como DL₅₀ a las 72h, los compuestos se podrían ordenar en términos de toxicidad relativa como: PHQ-E > PHQ-A > VM55597 > VM55596 > PHQ-B. Esta información nos permite establecer las siguientes relaciones estructura-actividad: PHQ-E es el compuesto más activo, seguido de PHQ-A y la única diferencia estructural entre ambos es la presencia de un grupo hidroxilo en el C-14 en PHQ-A, ausente en PHQ-E: esto parece indicar que este OH reduce la actividad insecticida. Por otra parte, VM55597 es el tercer compuesto más potente de los ensayados y la única diferencia con PHQ-A es la presencia de un grupo carbonilo en C-16. Si se tiene en cuenta que PHQ-A es tres veces más activa que VM55597, es posible establecer que el grupo carbonilo disminuye la actividad insecticida. El cuarto compuesto más activo es VM55596 y la diferencia química con PHQ-A es el oxígeno en el N-12 que posee VM55596, así que esta sustitución oxidada en el N reduce la actividad insecticida. Por último, PHQ-B es el compuesto con menor actividad de los cinco ensayados a pesar de que tiene una estructura muy parecida a PHQ-E, siendo la presencia de un metilo en el C-14 la única diferencia estructural entre ambas, por lo que esta sustitución alquímica parece ser decisiva para la actividad insecticida.

A la vista de todas estas correlaciones, es posible concluir que sustituciones oxidadas en la unidad prolina de las PHQs disminuyen la actividad insecticida, mientras que sustituciones alquímicas la aumentan. La importancia de esta posición alquilada ha sido ya demostrada en otras actividades biológicas de las paraherquamidas¹⁰⁷.

El mecanismo de acción de las PHQs y compuestos relacionados se basa en el bloqueo antagonista de los receptores nicotínicos de la acetilcolina (nAChR)²⁰⁵⁻²⁰⁷. Estos receptores son actualmente objetivo de nuevos compuestos insecticidas, siendo los compuestos antagonistas generalmente menos activos como insecticidas que los agonistas. A pesar del mecanismo de acción postulado, por el que las PHQs podrían ser tóxicas para mamíferos, en realidad se requieren niveles mucho más altos de sustrato para la inhibición de estos receptores en vertebrados que en insectos.

Así pues, las PHQs han demostrado ser potentes insecticidas frente a *O. fasciatus* produciendo síntomas típicos de los compuestos que afectan al sistema nervioso del insecto tales como lentitud de movimientos y temblores. Esta interesante actividad estimula el aislamiento o la síntesis de nuevos análogos estructurales con menor toxicidad en mamíferos pero manteniendo su selectiva propiedad insecticida.

3. *Penicillium coalescens* Quintanilla (CECT 2764)

3.1 Cultivo del hongo y obtención del extracto

Con el cultivo de la cepa de *Penicillium coalescens* (CECT 2764) en 60 L de medio ATB se obtuvieron 5.8 g de extracto seco a partir del caldo y 6.2 g de extracto diclorometánico y 39.7 g de extracto metanólico a partir del micelio, según el apartado 1 de Material y métodos.

3.2 Actividad biológica del extracto

Los extractos orgánicos se sometieron a los ensayos de actividades biológicas descritos en el apartado 2 de Material y métodos, resultando el extracto del caldo significativamente activo como insecticida frente a *Oncopeltus fasciatus* con una $DL_{50} = 28.31 \pm 19.56 \mu\text{g/ninfa}$ y frente a *Ceratitis capitata* con un $73.33\% \pm 8.8$ de mortalidad a una dosis de $100 \mu\text{g/mosca}$, destacando además el dato de $80.99\% \pm 2.11$ de reducción en la eclosión de huevos en el estudio de fertilidad, por lo que se procedió a su estudio.

3.3 Estudio del extracto

5.3 g del extracto orgánico del caldo se fraccionaron en columna abierta sobre un relleno de sílice (1:80 p/p), usando eluyentes de polaridad creciente, desde DCM hasta MeOH. Se obtuvieron 10 fracciones cuyos pesos y disolventes se indican en la tabla 12.

Fracción	Volumen (L)	Eluyente	Peso (mg)
FI	3	DCM/AcOEt:9/1	848.4
FII	3	DCM/AcOEt:7/3	494.9
FIII	3	DCM/AcOEt:5/5	285.1
FIV	3	DCM/AcOEt:3/7	115.0
FV	3	AcOEt	263.1
FVI	3	AcOEt/MeOH:9/1	798.6
FVII	3	AcOEt/MeOH:7/3	763.1
FVIII	3	AcOEt/MeOH:5/5	575.1
FIX	3	AcOEt/MeOH:3/7	548.8
FX	3	MeOH	388.7

Tabla 12. Fraccionamiento en columna del extracto del caldo de *Penicillium coalescens*

3.4 Actividades biológicas de las fracciones

Las fracciones cromatográficas del extracto orgánico del caldo se ensayaron como insecticidas (según el apartado 2.5 de Material y métodos). La fracción III fue la que destacó por su actividad insecticida frente a *Oncopeltus fasciatus*, con una mortalidad del 100% a una dosis de $25 \mu\text{g/ninfa}$ y frente a *Ceratitis capitata* con un $80.0\% \pm 10$ de mortalidad a una dosis de $25 \mu\text{g/mosca}$. También la fracción I produjo un $83.3\% \pm 3.3$ de mortalidad a una dosis de $25 \mu\text{g/mosca}$.

$\mu\text{g}/\text{mosca}$ frente a *Ceratitis capitata*. Se procedió al aislamiento e identificación de los componentes causantes de dichas actividades.

3.5 Aislamiento e identificación de los compuestos de las fracciones seleccionadas

3.5.1. Estudio de la fracción III

Aislamiento

La fracción III (270 mg) se sometió a cromatografía líquida en columna abierta sobre sílice (1:100 p/p) usando como fase móvil Hex/AcOEt:6/4. La mezcla se fraccionó en alícuotas de 20 mL, las cuales se reunieron en 7 subfracciones de acuerdo con su similitud en CCF. Todas las subfracciones se ensayaron como insecticidas frente a *O. fasciatus* y *C. capitata* siendo la subfracción FIII/E la causante de ambas actividades: 100% de mortalidad aguda frente a *O. fasciatus* a una dosis de 20 $\mu\text{g}/\text{ninfa}$ y un 50% de mortalidad aguda (muerte total de todos los machos) frente a *C. capitata* a una dosis de 20 $\mu\text{g}/\text{mosca}$ (destaca el dato de la disminución de la fecundidad que impide valorar la fertilidad), por lo que se procedió a su análisis.

La subfracción FIII/E (40.8 mg) se fraccionó de nuevo en columna abierta sobre sílice (1:100 p/p) usando como fase móvil DCM/MeOH:98/2. La mezcla se fraccionó en alícuotas de 5 mL, las cuales se reunieron en 11 subfracciones de acuerdo con su similitud en CCF. La subfracción FIII/E-4 (28.3 mg) resultó ser el producto mayoritario, compuesto que no era visible a una λ de 254 nm y que para cuyo seguimiento fue necesario la utilización de sulfato de cerio (IV) como revelador inespecífico.

Identificación

El espectro de masas mediante la técnica de ionización por electro-spray presenta un pico molecular m/z 167.1 [(M+Na)⁺] que corresponde a la fórmula molecular C₇H₁₂O₃. El fragmento más destacable según este espectro es m/z (intensidad relativa) 127.1 (100) correspondiente a [(M+1-H₂O)⁺].

El espectro de ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) (Fig 91) muestra la presencia de una mezcla anomérica en una proporción 65:35: δ 5.18 (1H, *brs*, H-2), 4.89 (1H, *d*, $J=12.0$, H-2'), 4.26 (1H, *t*, $J=8.6$, CH_{2a}-5), 4.04 (3H, *m*, CH_{2b}-5, CH₂-5'), 3.67 (1H, *m*, H-4), 3.42 (1H, *td*, $J=7.8$, 3.0, H-4'), 3.23 (1H, *s*, OH-2), 2.59 (1H, *m*, H-3), 2.46 (1H, *m*, H-3'), 2.30 (3H, *s*, CH₃-7'), 2.21 (3H, *s*, CH₃-7), 1.86 (1H, *s*, OH-2'), 1.07 (3H, *d*, $J=7.2$, CH₃-8') y 0.87 (3H, *d*, $J=7.2$, CH₃-8) ppm.

El espectro de ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) (Fig 92) muestra también la presencia de una mezcla anomérica: δ 213.31 (C-6'), 206.26 (C-6), 103.91 (C-2), 100.09 (C-2'), 69.44 (C-5'), 66.13 (C-5), 52.78 (C-4), 52.67 (C-4'), 42.30 (C-3), 40.97 (C-3'), 32.00 (C-7'), 29.99 (C-7), 12.10 (C-8) y 9.25 (C-8') ppm.

Los datos espectroscópicos coinciden con los datos encontrados en bibliografía del (-) **botryodiplodin**²⁰⁸. Esta micotoxina fue aislada a partir de *Botryodiplodia theobromae* en 1966 por Gupta *et al.*²⁰⁹ y en 1969 Arsenault *et al.*²¹⁰ confirmaron su estructura. También ha sido identificado en otras especies fúngicas como *Penicillium roqueforti*²¹¹ y *P. stipitatum*²¹². Este hemiacetal presenta propiedades antibióticas y antileucémicas^{213,214}, pero también mutagénicas ya que induce entrecruzamientos entre proteínas y ADN²¹⁵. Se ha demostrado mediante marcaje isotópico que su ruta biosintética es la ruta de los acetatos²¹³.

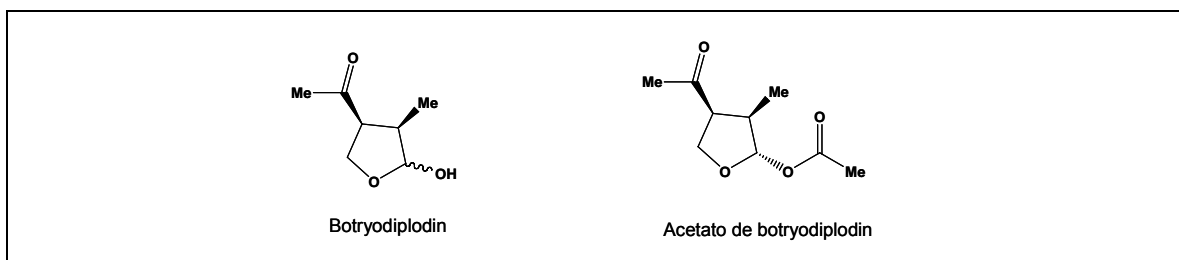


Fig 90. Estructuras del (-) botryodiplodin y del (-) acetato de botryodiplodin

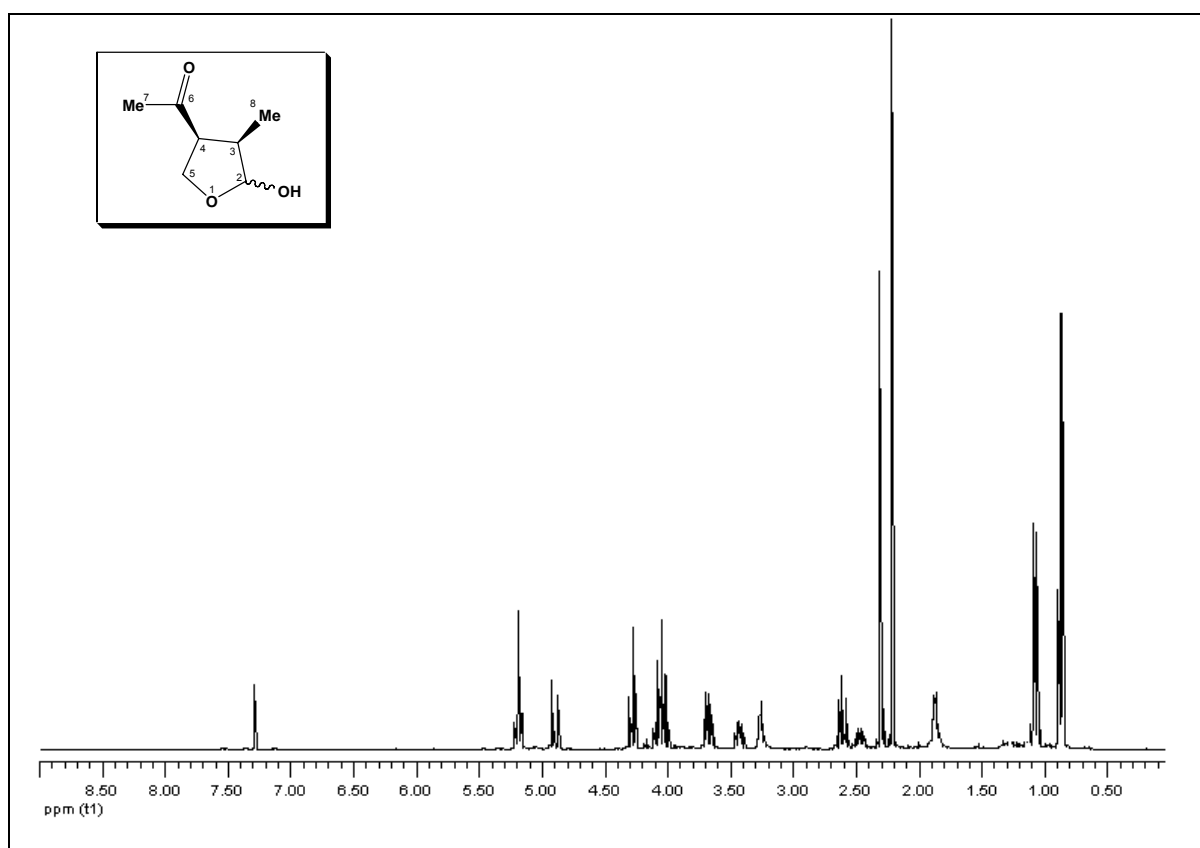
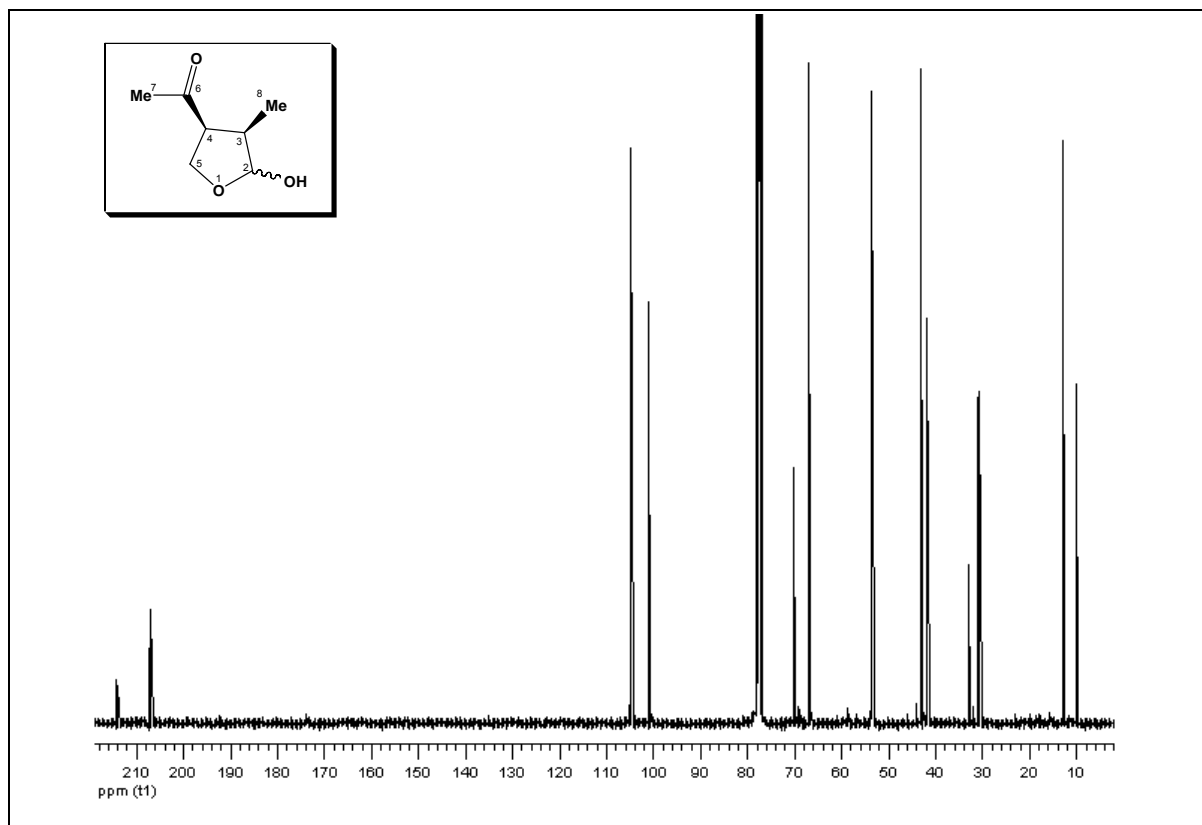
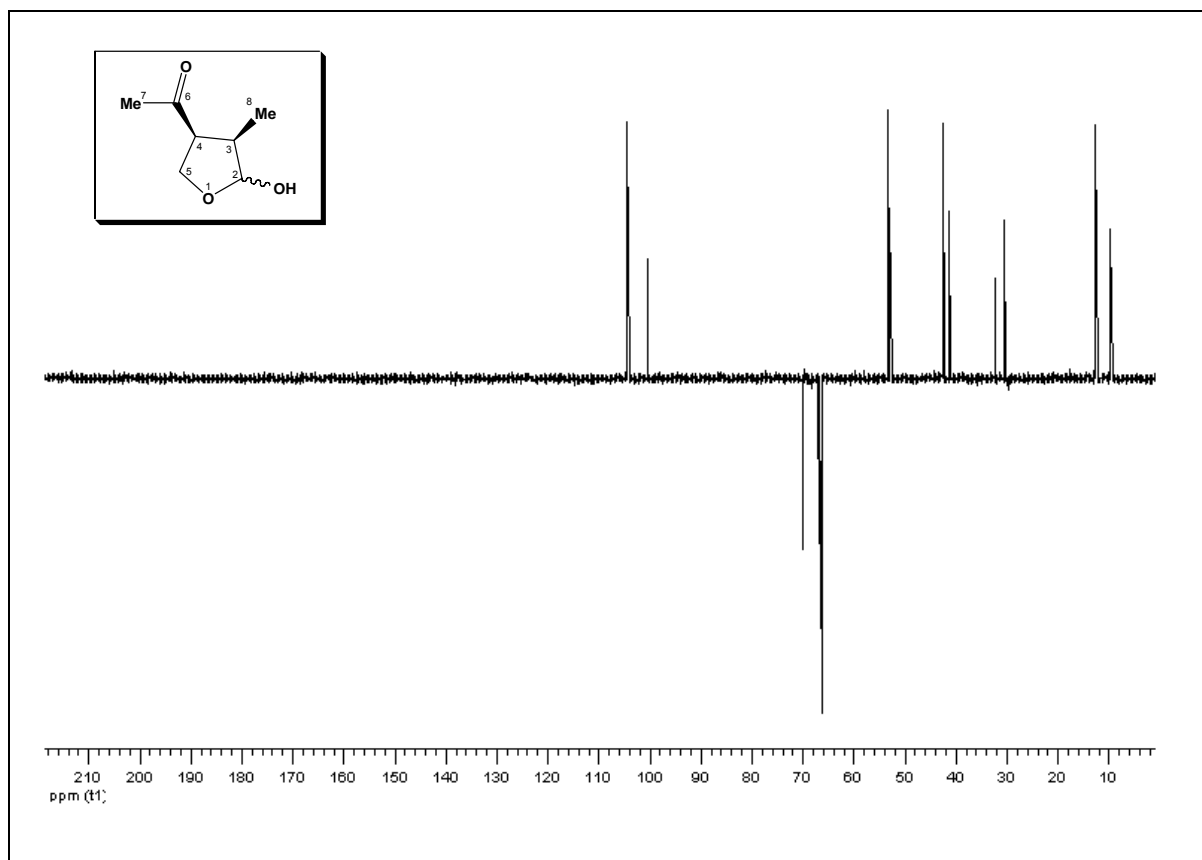


Fig 91. ¹HRMN 300 MHz de FIII-E-4 ((-) botryodiplodin) en CDCl₃

Fig 92. ^{13}C CRMN 75 MHz de FIII-E-4 (-) botryodiplodin en CDCl_3 Fig 93. DEPT 75 MHz de FIII-E-4 (-) botryodiplodin en CDCl_3

En el espectro de ^1H RMN se aprecia que el (-) botryodiplodin aparece como una mezcla anomérica. Para confirmar la estructura se procedió a la acetilación del mismo, mediante anhídrido acético y piridina, obteniéndose cuantitativamente el anómero 2,3-*trans* acetilado (95%)^{214,216}.

3.5.2. Estudio de la fracción I

Aislamiento

La fracción I (830 mg) se sometió a cromatografía líquida en columna abierta sobre sílice (1:100 p/p) usando como fase móvil Hex/AcOEt:8/2. La mezcla se fraccionó en alícuotas de 20 mL, las cuales se reunieron en 7 subfracciones de acuerdo con su similitud en CCF. Todas las subfracciones se ensayaron como insecticidas frente a *O. fasciatus* y *C. capitata* siendo la subfracción FI/D la que mostró mayor actividad (tabla 13) por lo que se procedió a su análisis por HPLC.

Subfracciones	<i>Oncopeltus fasciatus</i>		<i>Ceratitis capitata</i>		
	% Mortalidad	Seguimiento IGR	%Mortalidad	%reducción fecundidad	%reducción fertilidad
FI/A	10 ± 10	Ninfas	10 ± 5.7	5.44 ± 5.24	35.47 ± 24.44
FI/B	10 ± 0	100% MR D+27 (4 ^o -5 ^o)	3.3 ± 3.3	1.33 ± 1.33	0.78 ± 0.78
FI/C	0 ± 0	Ninfas	0 ± 0	0 ± 0	1.45 ± 0.87
FI/D	10 ± 0	100% MR D+17 (4^o-5^o)	0 ± 0	0 ± 0	94.29 ± 1.14
FI/E	5 ± 5	Ninfas	3.3 ± 3.3	10.18 ± 5.14	0 ± 0
FI/F	5 ± 5	100% MR D+60	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
FI/G	15 ± 5	100% MR D+66	0 ± 0	12.43 ± 6.69	0 ± 0

Dosis de ensayo sobre *O. fasciatus*: 20 µg/ninfa
Dosis de ensayo sobre *C. capitata*: 20 µg/mosca
MR=Mortalidad retrasada

Tabla 13. Actividades biológicas de las subfracciones FI de *P. coalescens* CECT 2764

La subfracción FI/D (18.7 mg) se fraccionó en HPLC mediante una columna semipreparativa Tracer Exel 120 ODS-B C18 de 5 µm (25.0 x 1 cm) usando como fase móvil MeCN/H₂O (70:30, v/v) a flujo 1 mL/min. Se aislaron dos compuestos con las siguientes propiedades cromatográficas: FI/D-1 [Tr= 15.2 minutos; 1.6 mg] y FI/D-2 [Tr= 19.8 minutos; 1.5 mg].

Identificación del compuesto FI/D-1

El espectro de masas mediante la técnica de ionización por electro-spray de alta resolución presenta un pico molecular m/z 277.1419 [(M+Na)⁺] que corresponde a la fórmula molecular C₁₄H₂₂O₄ (Fig 97).

El espectro de ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) (Fig 98) muestra las siguientes señales: δ 6.10 (1H, s, $\text{CH}_{2a-6'}$), 5.91 (1H, s, $\text{CH}_{2b-6'}$), 4.62 (1H, d, $J=6.0$, H-2), 4.22 (1H, t, $J=9.0$, CH_{2a-6}), 3.98 (1H, dd, $J=12.0$, 0.5, CH_{2a-4}), 3.82 (1H, dd, $J=12.0$, 3.0, CH_{2b-4}), 3.50 (1H, t, $J=9.0$, CH_{2b-6}), 3.06 (1H, m, H-4'), 2.67 (1H, m, H-5), 2.34 (3H, s, CH_3-1'), 1.46 (3H, s, CH_3-9), 1.33 (1H, m, H-4a), 1.11 (3H, d, $J=9.0$, CH_3-5') y 1.08 (3H, d, $J=6.0$, CH_3-8) ppm.

El espectro de ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3) (Fig 99) muestra las siguientes señales: δ 199.72 (C-2'), 149.40 (C-3'), 126.09 (C-6'), 105.41 (C-7a), 98.82 (C-2), 74.19 (C-6), 63.93 (C-4), 50.06 (C-4a), 38.31 (C-4'), 33.31 (C-5), 26.28 (C-1'), 20.14 (C-9), 16.80 (C-8) y 13.80 (C-5') ppm.

La gran similitud existente entre los datos espectrales de este compuesto y los que presenta el botryodiplodin, permite deducir que se trata de una molécula con un esqueleto similar aunque de menor polaridad. La estructura de FI/D-1 se determina por comparación de sus datos espectroscópicos de ^1H RMN y ^{13}C RMN con los datos del botryodiplodin y se confirma con los experimentos de dos dimensiones (COSY $^1\text{H}-^1\text{H}$ (Fig 100), HSQC (Fig 101) y HMBC (Fig 102)).

El estudio de los espectros COSY y HMBC (Tabla 14) indica la presencia de un sistema AMX así como un sistema ABX, formados cada uno de ellos por un metileno unido tanto a un átomo electronegativo como a un metino (δ 4.22 (CH_{2a-6}), 3.50 (CH_{2b-6}) y 2.67 (H-5); δ 3.98 (CH_{2a-4}), 3.82 (CH_{2b-4}) y 1.33 (H-4a)), así como dos carbonos sp^3 desapantallados por la influencia de dos átomos electronegativos (δ 105.41 (C-7a) y 98.82 (CH-2)). Este carbono terciario muestra una correlación COSY con el metino de la posición 4' (δ 4.62 (H-2) – 3.06 (H-4')), el cual forma parte de otro fragmento de botryodiplodin en distinto estado de oxidación, presentando un doble enlace y un grupo aldehído fácilmente atacable para formar un acetal. Este compuesto, por tanto, presenta una estructura constituida por un anillo de furano y otro de dioxano y derivada de dos moléculas del botryodiplodin en distintos estados de oxidación.

A la vista de la discusión realizada, se ha propuesto la siguiente estructura (Fig 94) para FI/D-1, aislada por primera vez a partir de fuentes naturales y ha sido denominada (-) **botryodioxinenona**.

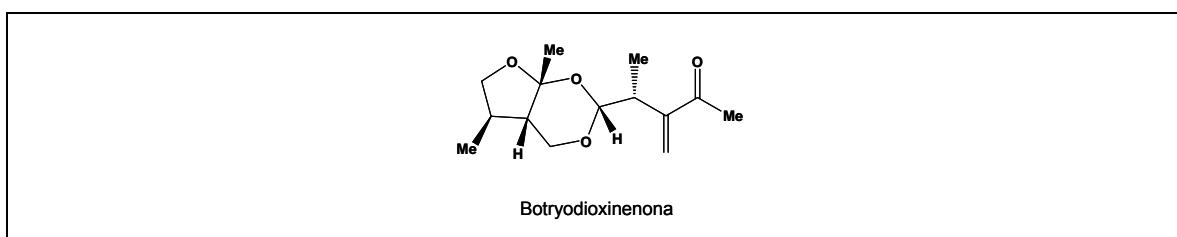


Fig 94. Estructura del (-) botryodioxinenona

La posible biogénesis de este compuesto podría ocurrir mediante la unión de dos moléculas de botryodiplodin: la apertura del anillo hemiacetalico origina una molécula capaz de reducirse o deshidratarse que reaccionan entre ellas para formar el núcleo bicíclico tetrahydrofuran-1,3-dioxano (Fig 95).

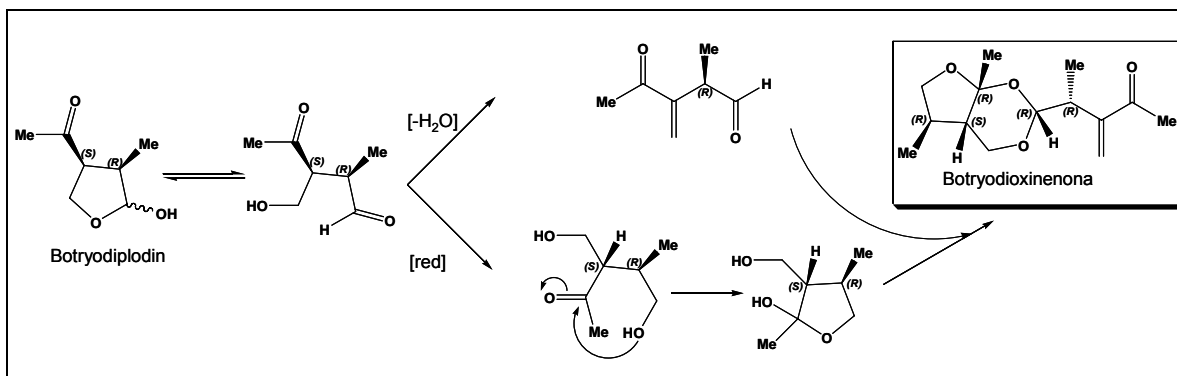


Fig 95. Posible biogénesis de la (-) botryodioxinenona

Se obtuvo un valor de poder rotatorio $[\alpha]_D^{25} = -8.72^\circ$ (c 0.92, CHCl_3) y considerando que esta posible ruta biogénica permite fijar la configuración de los carbonos C-4a, C-5 y C-4' como (R), (S) y (R) se intentó establecer la configuración de la molécula a través de las correlaciones NOESY observadas (Fig 96). Estos experimentos mostraron una correlación entre δ 4.62 (H-2) y 1.46 (CH_3 -9) indicando una relación *cis* entre ellos. Estos estudios no fueron suficientes para determinar la configuración de todos los estereocentros de la molécula por lo que se procedió a la realización de experimentos NOEDIFF. La irradiación de H-2 afectó tanto al CH_3 -9 como al H-4' y se observó un aumento de la señal de H-4a al irradiar el CH_3 -9, indicando que H-2, CH_3 -9, H-4' y H-4a se encuentran en el mismo plano. Así pues se pudo establecer la siguiente configuración para botryodioxinenona (2R, 4aS, 5R, 7aR, 4'R).

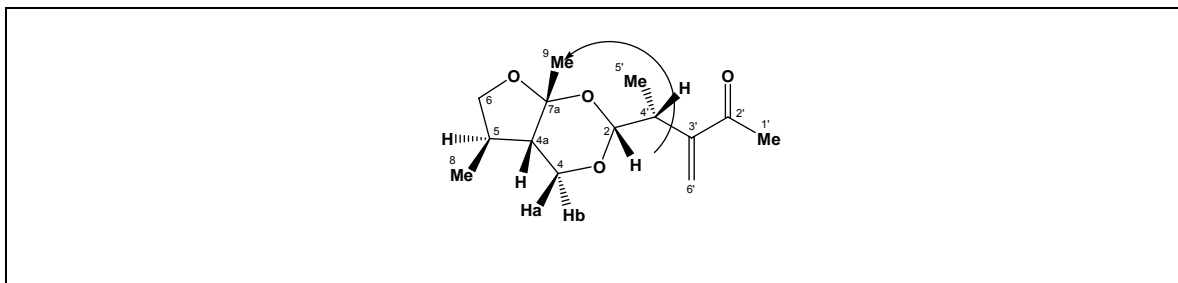


Fig 96. Correlaciones NOESY observadas para el compuesto F/D-1 ((-) botryodioxinenona)

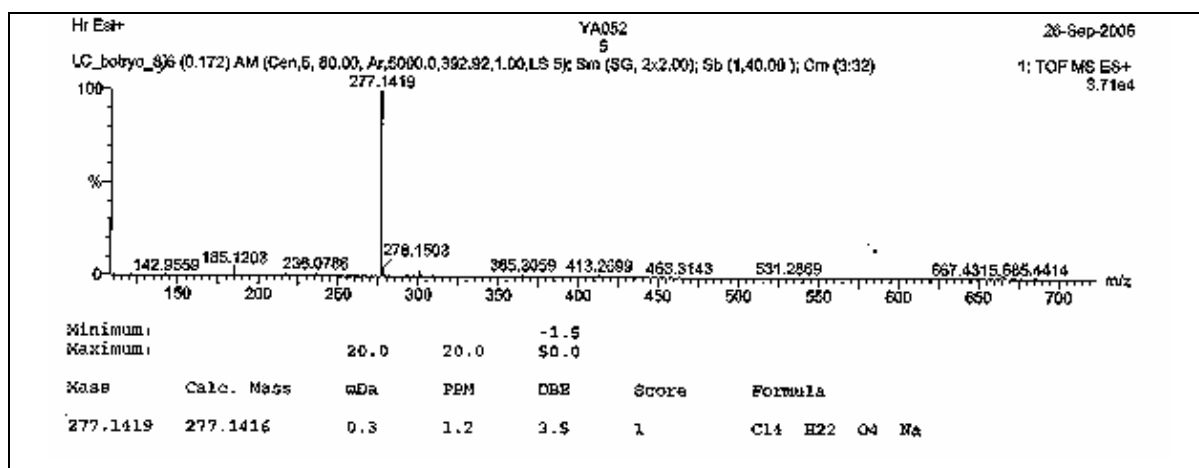
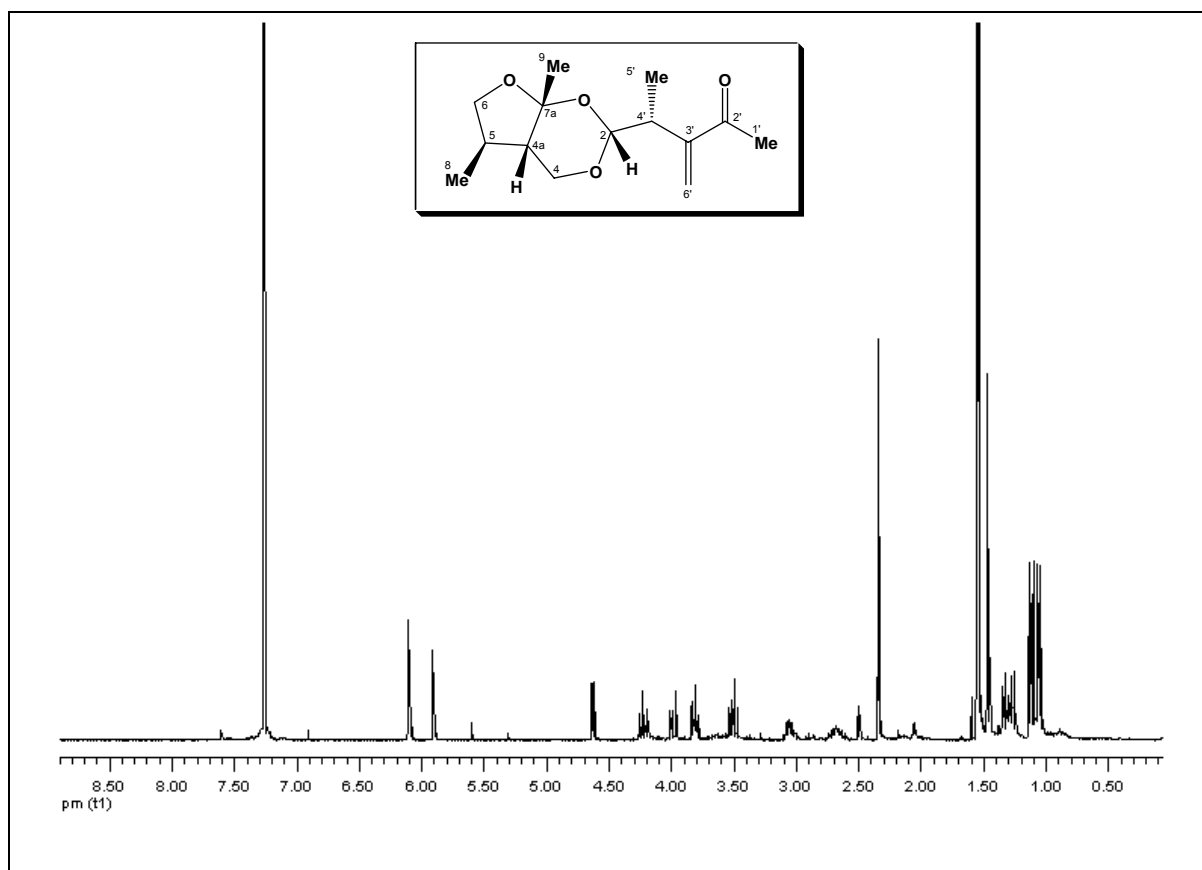
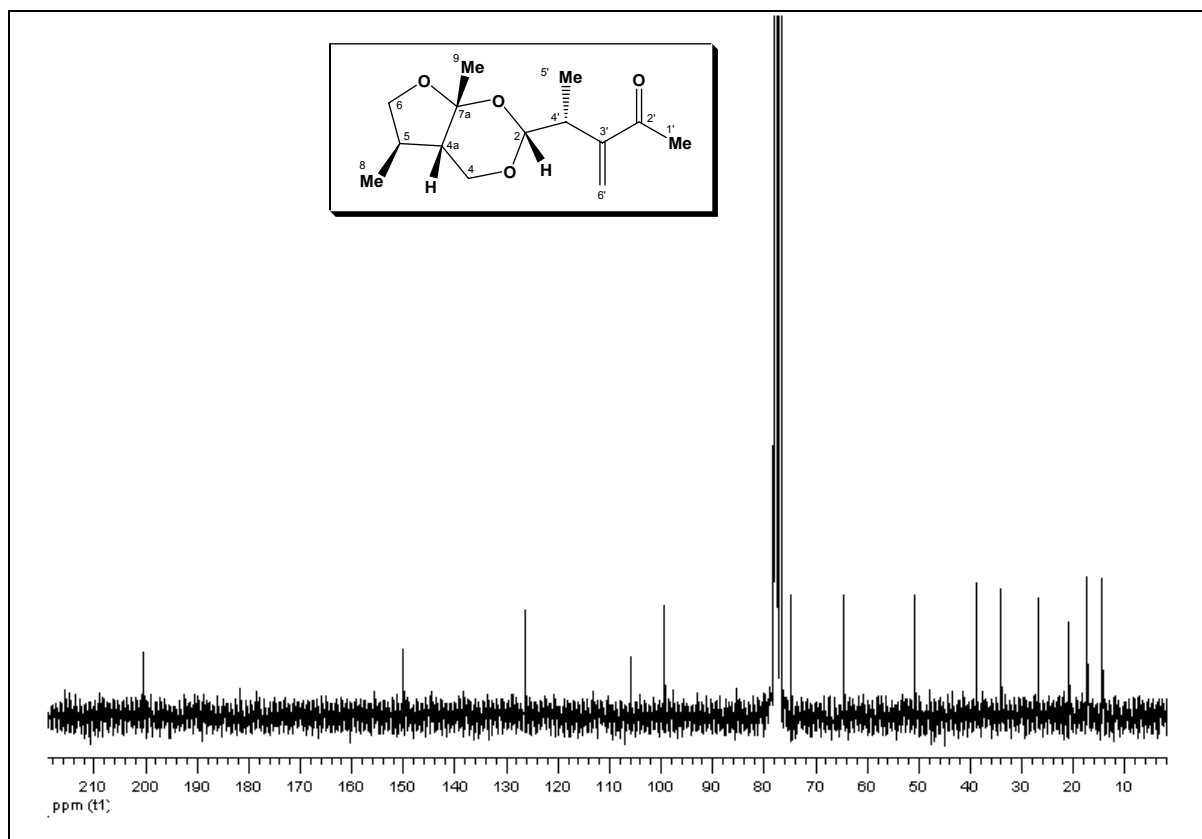
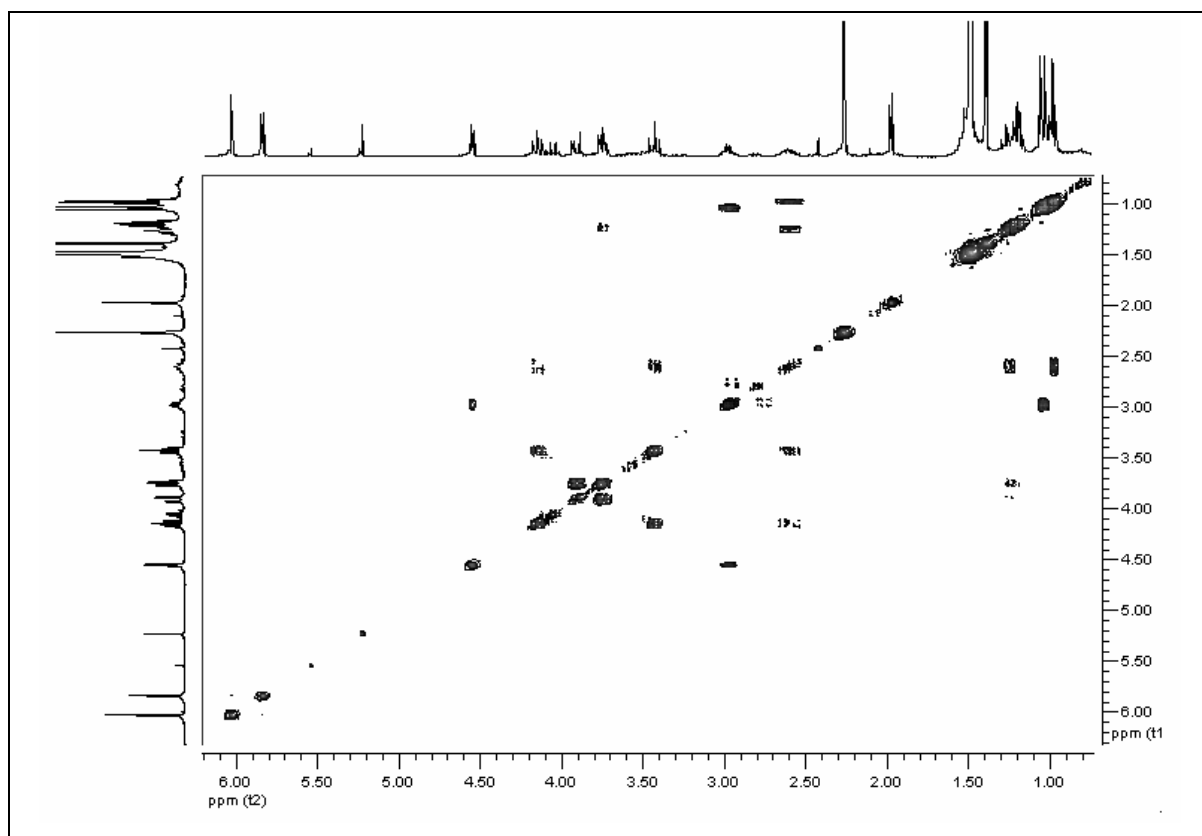
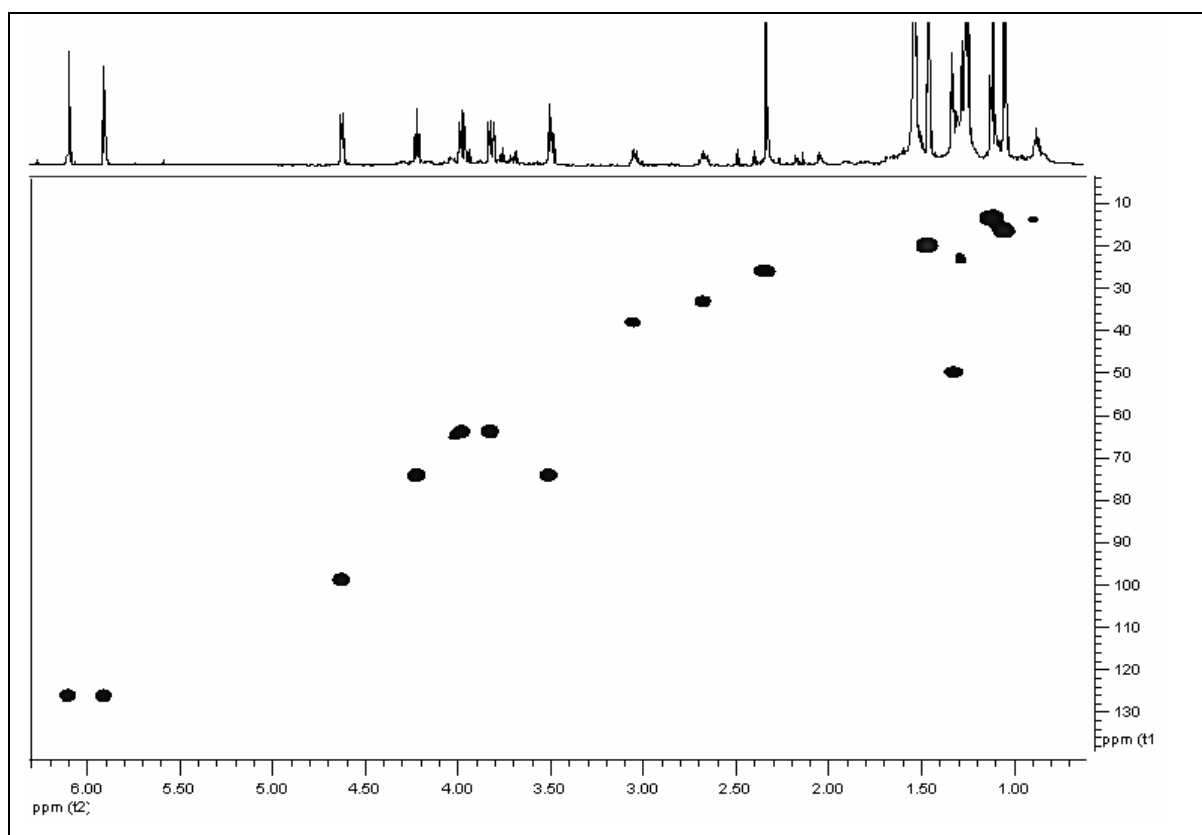


Fig 97. ESMS de F/D-1 ((-) botryodioxinenona)

	δ_H (<i>mult</i> , J en Hz)	δ_C (<i>mult</i> , DEPT)	Correlación	Correlación
			1H - 1H (COSY)	1H - ^{13}C (HMBC)
2	4.62 (<i>d</i> , 6)	98.82 (CH)	3.06 (H-4')	3.98 (CH _{2a} -4), 3.06 (H-4'), 1.11 (CH ₃ -5')
4	3.98 (<i>dd</i> , 12, 0.5)	63.93 (CH ₂)	3.82 (CH _{2b} -4)	4.62 (H-2), 2.67 (H-5)
	3.82 (<i>dd</i> , 12, 3)		3.98 (CH _{2a} -4), 1.33 (H-4a)	
4a	1.33 (<i>m</i>)	50.06 (CH)	2.67 (H-5), 3.82 (CH _{2b} -4)	4.22 (CH _{2a} -6), 3.98 (CH _{2a} -4), 2.67 (H-5), 1.46 (CH ₃ -9), 1.08 (CH ₃ -8)
5	2.67 (<i>m</i>)	33.31 (CH)	4.22 (CH _{2a} -6), 3.50 (CH _{2b} -6), 1.33 (H-4a), 1.08 (CH ₃ -8)	4.22 (CH _{2a} -6), 3.98 (CH _{2a} -4), 3.82 (CH _{2b} -4), 3.50 (CH _{2b} -6), 1.33 (H-4a), 1.08 (CH ₃ -8)
			3.50 (CH _{2b} -6), 2.67 (H-5)	2.67 (H-5), 1.08 (CH ₃ -8)
6	4.22 (<i>t</i> , 9)	74.19 (CH ₂)	4.22 (CH _{2a} -6), 2.67 (H-5)	3.98 (CH _{2a} -4), 3.50 (CH _{2b} -6), 1.46 (CH ₃ -9), 1.33 (H-4a)
	3.50 (<i>dd</i> , 12, 3)		4.22 (CH _{2a} -6), 2.67 (H-5)	
7a	-	105.41 (C)	-	3.98 (CH _{2a} -4), 3.50 (CH _{2b} -6), 1.46 (CH ₃ -9), 1.33 (H-4a)
8	1.08 (<i>d</i> , 6)	16.80 (CH ₃)	2.67 (H-5)	4.22 (CH _{2a} -6), 3.50 (CH _{2b} -6), 1.33 (H-4a)
9	1.46 (<i>s</i>)	20.14 (CH ₃)	-	-
1'	2.34 (<i>s</i>)	26.28 (CH ₃)	-	-
2'	-	199.72 (C)	-	6.10 (CH _{2a} -6'), 5.91 (CH _{2b} -6'), 2.34 (CH ₃ -1')
3'	-	149.40 (C)	-	6.10 (CH _{2a} -6'), 5.91 (CH _{2b} -6'), 3.06 (H-4'), 2.34 (CH ₃ -1'), 1.11 (CH ₃ -5')
				6.10 (CH _{2a} -6'), 5.91 (CH _{2b} -6'), 1.11 (CH ₃ -5')
4'	3.06 (<i>m</i>)	38.31 (CH)	4.62 (H-2), 1.11 (CH ₃ -5')	6.10 (CH _{2a} -6'), 5.91 (CH _{2b} -6'), 1.11 (CH ₃ -5')
5'	1.11 (<i>d</i> , 9)	13.80 (CH ₃)	3.06 (H-4')	4.62 (H-2), 3.06 (H-4')
6'	6.10 (<i>s</i>), 5.91 (<i>s</i>)	126.09 (CH ₂)	-	3.06 (H-4'), 2.34 (CH ₃ -1')

Tabla 14. 1H RMN, ^{13}C RMN y correlaciones 1H - 1H (COSY) y 1H - ^{13}C (HMBC) de FI/D-1 (-) botryodioxinenona en $CDCl_3$

Fig 98. ^1H RMN 300 MHz de F/D-1 ((-) botryodioxinenona) en CDCl_3 Fig 99. ^{13}C RMN 75 MHz de F/D-1 ((-) botryodioxinenona) en CDCl_3

Fig 100. COSY 300 MHz de F/D-1 (-) botryodioxinenona) en CDCl_3 Fig 101. HSQC 600 MHz de F/D-1 (-) botryodioxinenona) en CDCl_3

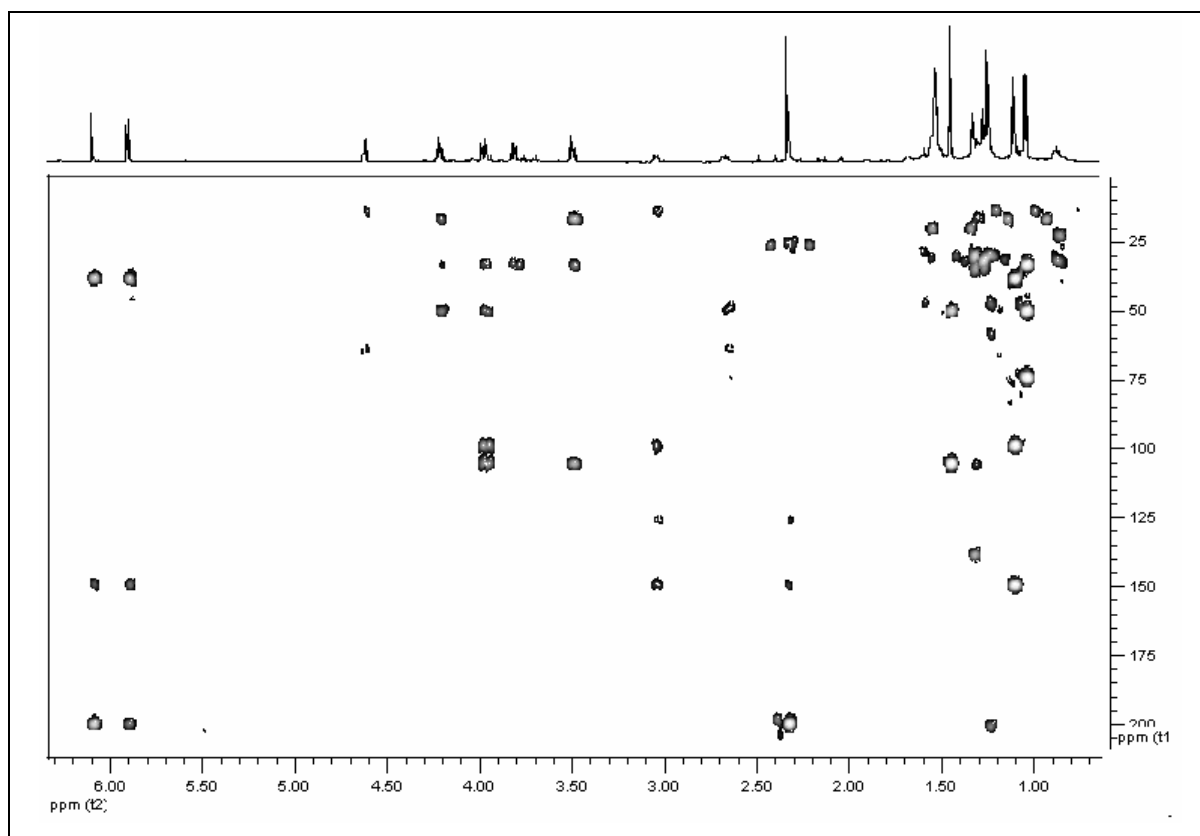


Fig 102. HMBC 600 MHz de FI/D-1 (-) botryodioxinenona) en CDCl_3

Identificación del compuesto FI/D-2

El espectro de masas mediante la técnica de ionización por electro spray de alta resolución presenta un pico molecular m/z 271.1301 $[(M+\text{Na})^+]$ que corresponde a la fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_3$ (Fig 104).

El espectro de ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) (Fig 105) muestra las siguientes señales: δ 7.24 (5H, m, H-2'-6'), 4.93 (1H, d, $J=4.8$, H-2), 4.21 (1H, dd, $J=9.6$, 6.6, CH_{2a-5}), 3.98 (1H, m, CH_{2a-9}), 3.93 (1H, m, CH_{2b-5}), 3.58 (1H, m, CH_{2b-9}), 3.09 (1H, m, H-4), 2.88 (2H, t, $J=6.6$, H-10), 2.55 (1H, m, H-3), 2.12 (3H, s, CH_3-7) y 0.95 (3H, d, $J=7.8$, CH_3-8) ppm.

El espectro de ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3) (Fig 106) muestra las siguientes señales: δ 207.82 (C-6), 139.13 (C-1'), 128.98 (C-2', C-6'), 128.24 (C-3', C-5'), 126.13 (C-4'), 104.77 (C-2), 68.51 (C-9), 67.39 (C-5), 54.03 (C-4), 41.04 (C-3), 36.28 (C-10), 29.29 (C-7) y 9.82 (C-8) ppm.

Al igual que FI/D-1, este compuesto presenta unos datos espectrales muy parecidos al botryodiplodin lo que permite deducir que se trata de una molécula con un esqueleto similar. Su estructura se determina por comparación de sus datos espectroscópicos de ^1H RMN y ^{13}C RMN con los datos de botryodiplodin y se confirma con los experimentos de dos dimensiones (COSY $^1\text{H}-^1\text{H}$ (Fig 107), HSQC (Fig 108) y HMBC (Fig 109)). En este caso, se aprecia perfectamente en el espectro de ^1H RMN la unidad de botryodiplodin unido a un etoxifenil.

El estudio de los espectros COSY y HMBC (Tabla 15) permitió identificar que la unión entre ambos fragmentos se produce mediante el OH de la posición 2, por la correlación a larga distancia entre el C-2 y el H-9 y entre el C-9 y H-2.

Se obtuvo un valor de poder rotatorio $[\alpha]_D^{25} = +13.33^\circ$ (c 0.75, CHCl_3) y la configuración relativa se asignó tanto mediante las correlaciones NOESY observadas (Fig 110); δ 3.08 (H-4)-4.21 (CH_{2a} -5) y δ 3.98 (CH_{2a} -9)-4.21 (CH_{2a} -5), como mediante el valor de la constante de acoplamiento del protón en posición 2 ($J = 4.8$ Hz) indicando una relación *cis* entre los H-2 y H-3²¹⁴.

A la vista de la discusión realizada, se ha propuesto la siguiente estructura (Fig 103) para F/D-2, aislada por primera vez a partir de fuentes naturales y ha sido denominada **(+) etoxifenil-botryodiplodin**.

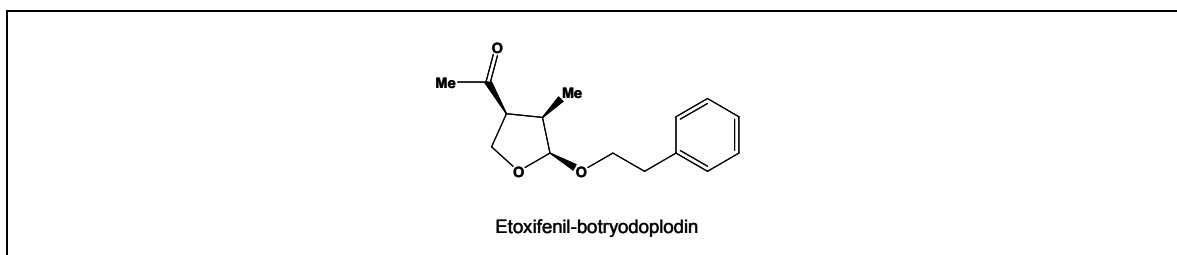


Fig 103. Estructura de (+) etoxifenil-botryodiplodin

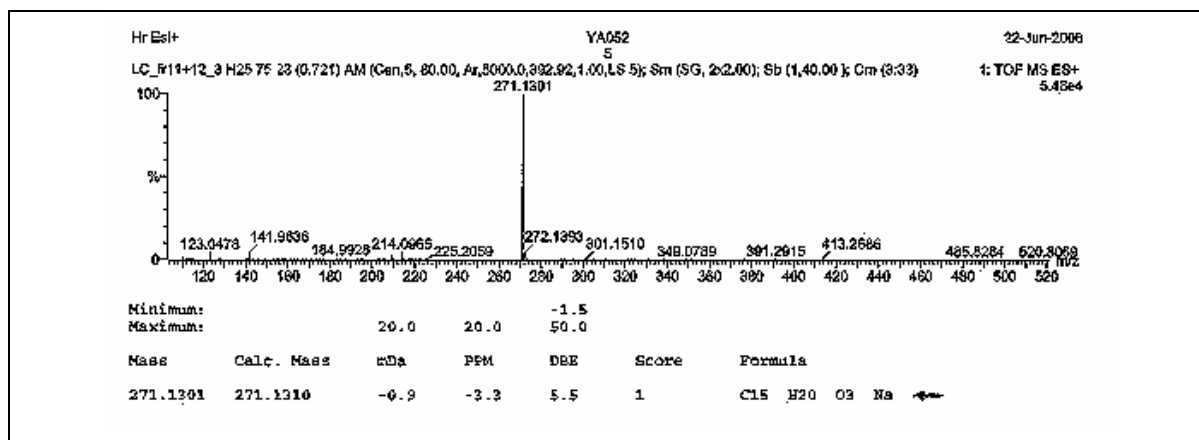
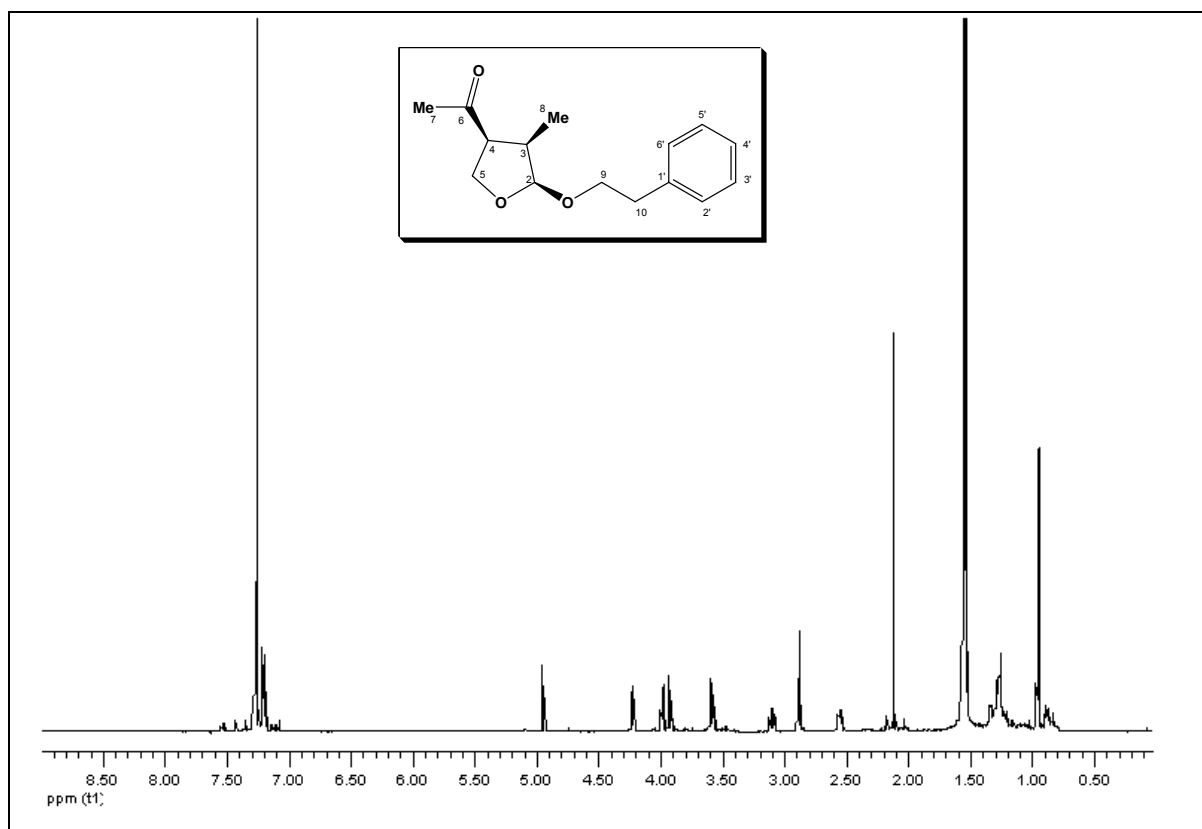
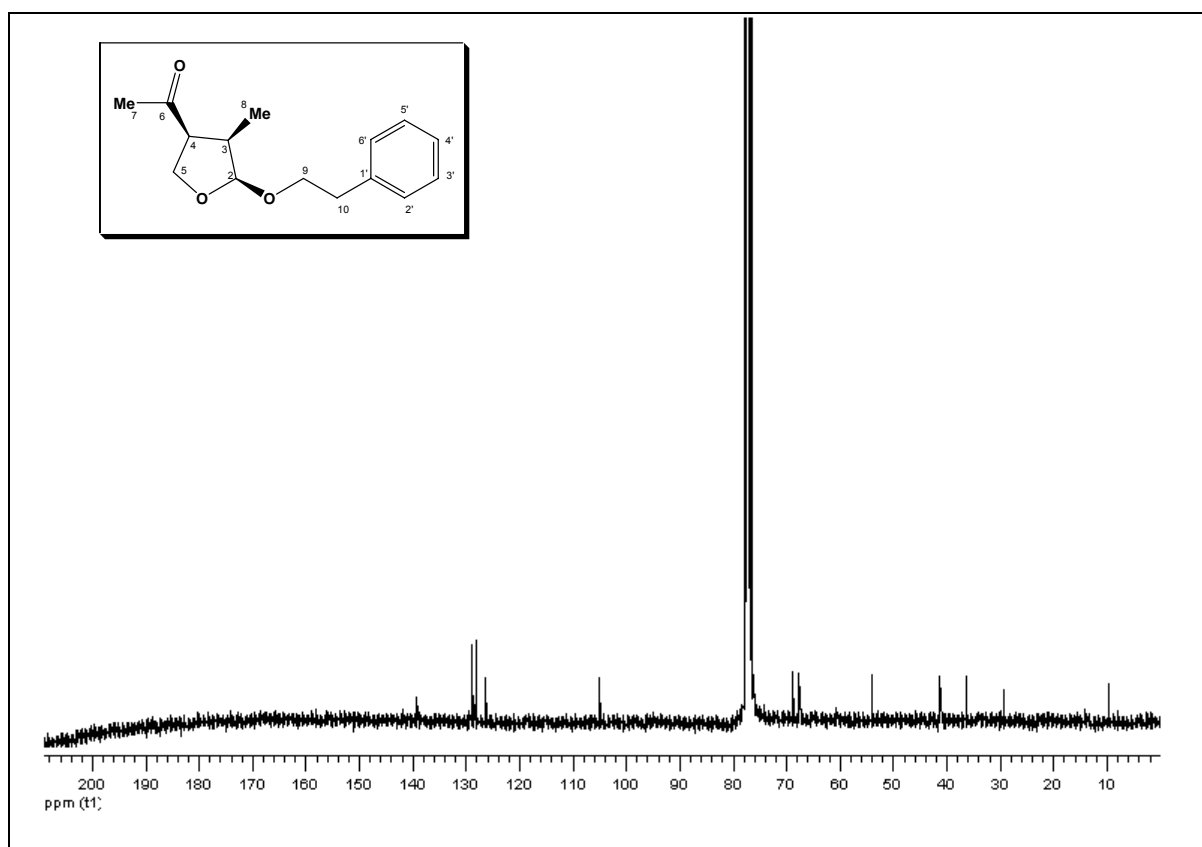
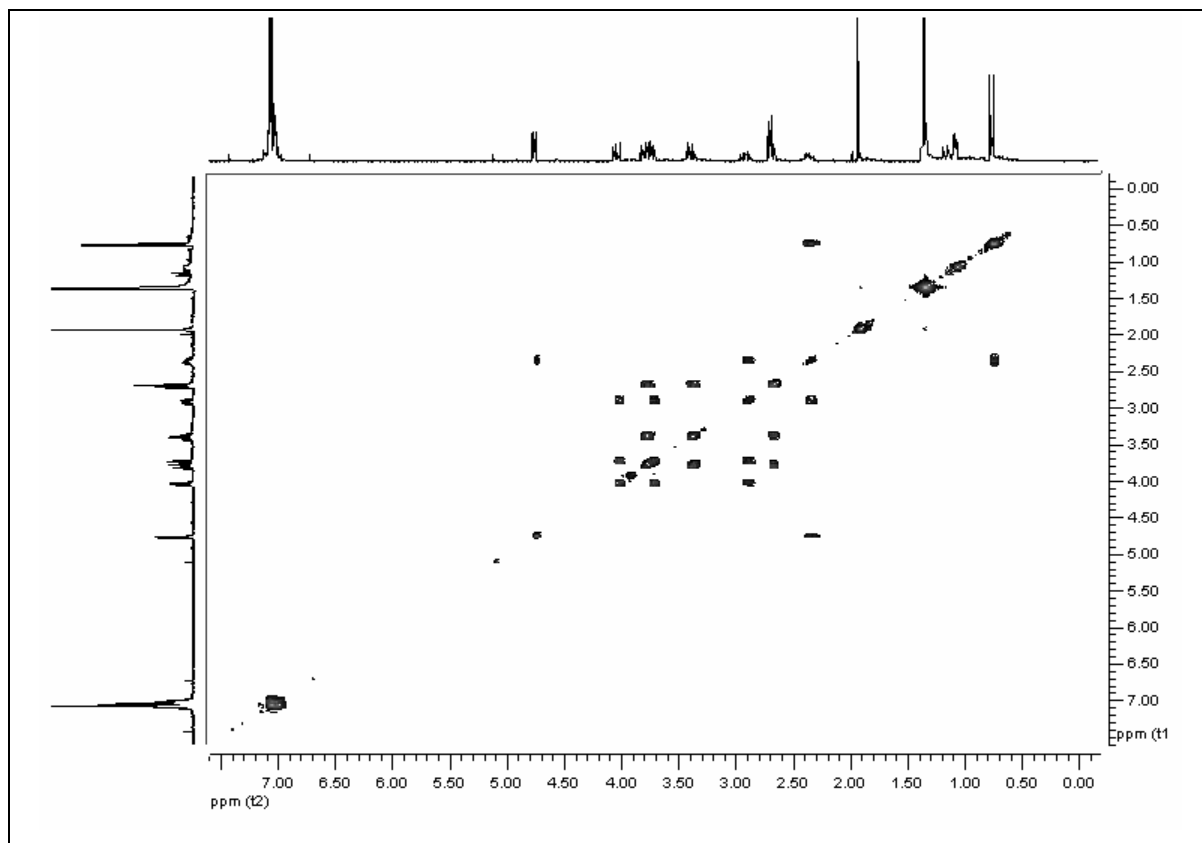
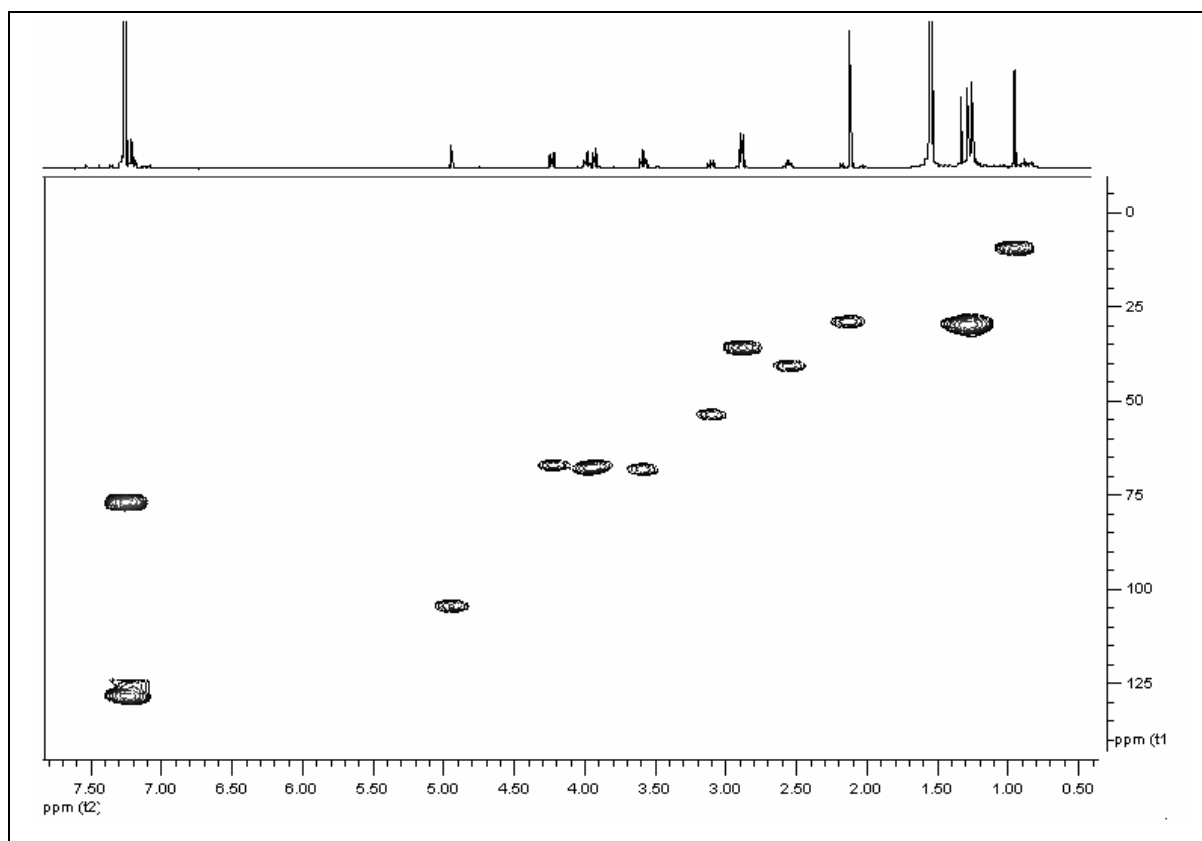


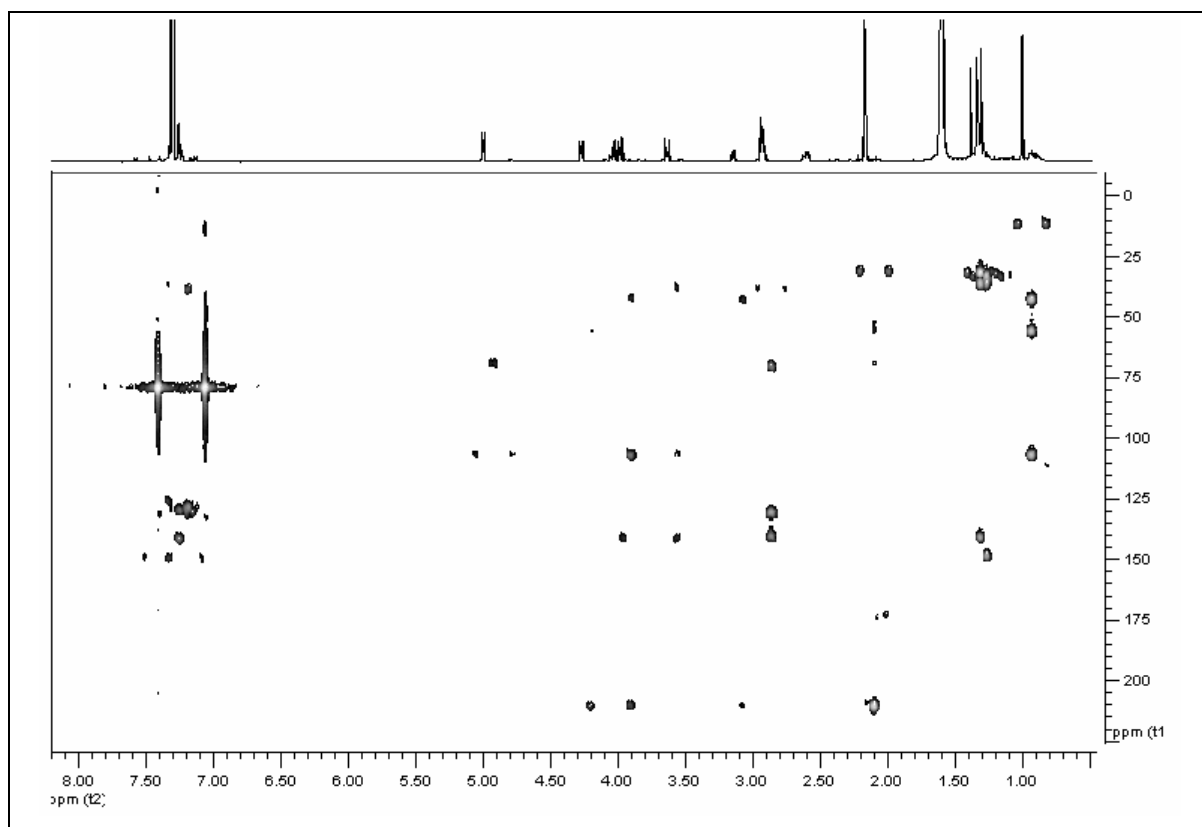
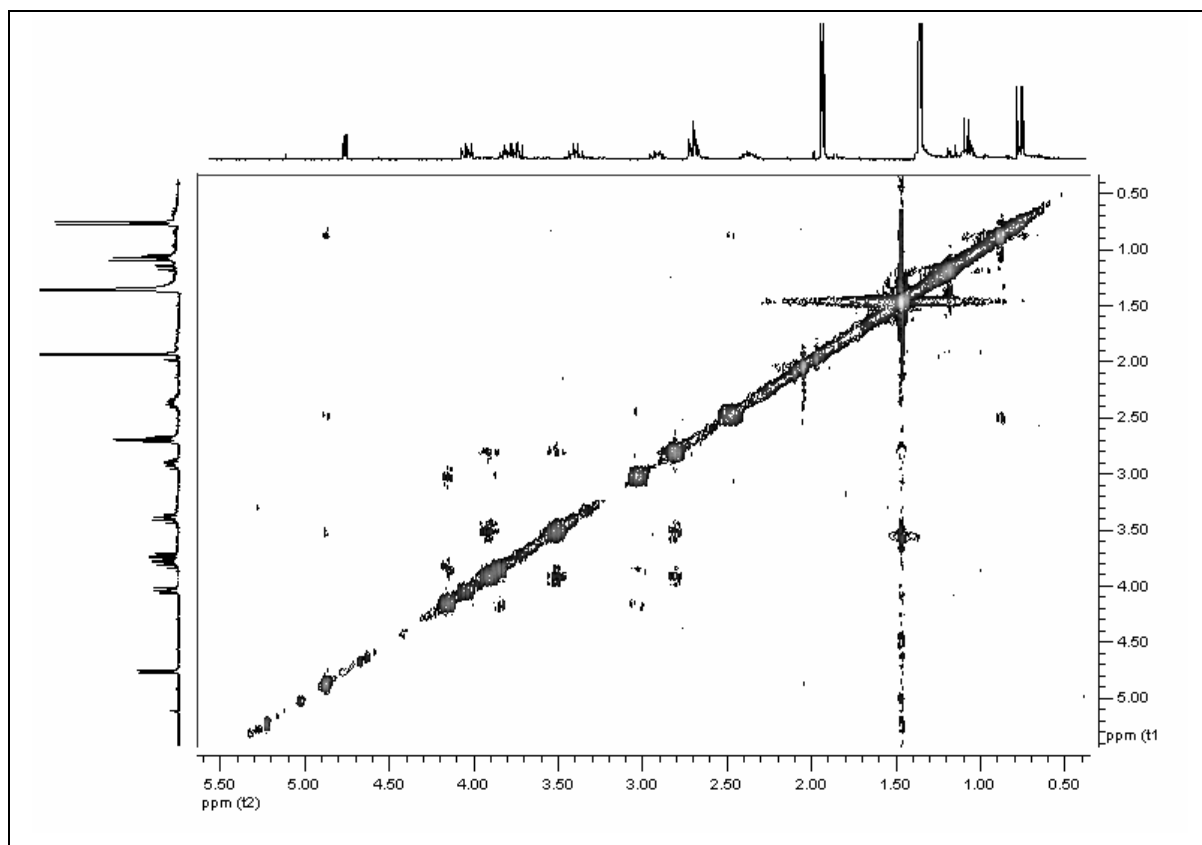
Fig 104. EIHRMS de F/D-2 ((+) etoxifenil-botryodiplodin)

	δ_H (<i>mult</i> , J en Hz)	δ_C (<i>mult</i> , DEPT)	Correlación 1H - 1H (COSY)	Correlación 1H - ^{13}C (HMBC)
2	4.93 (<i>d</i> , 4.8)	104.77 (CH)	2.55 (H-3)	3.93 (CH _{2b} -5), 3.58 (CH _{2b} -9), 0.95 (CH ₃ -8)
3	2.55 (<i>m</i>)	41.04 (CH)	4.93 (H-2), 3.09 (H-4), 0.95 (CH ₃ -8)	3.93 (CH _{2b} -5), 3.09 (H-4), 0.95 (CH ₃ -8)
4	3.09 (<i>m</i>)	54.03 (CH)	4.21 (CH _{2a} -5), 3.93 (CH _{2b} -5), 2.55 (H-3)	2.12 (H-7), 0.95 (CH ₃ -8)
5	4.21 (<i>dd</i> , 9.6, 6.6) 3.93 (<i>m</i>)	67.39 (CH ₂)	3.93 (CH _{2b} -5), 3.09 (H-4) 4.21 (CH _{2a} -5), 3.09 (H-4)	2.12 (H-7)
6	-	207.82 (C)	-	4.21 (CH _{2a} -5), 3.93 (CH _{2b} -5), 3.09 (H-4), 2.12 (H-7)
7	2.12 (<i>s</i>)	29.29 (CH ₃)	-	-
8	0.95 (<i>d</i> , 7.8)	9.82 (CH ₃)	2.55 (H-3)	-
9	3.98 (<i>m</i>) 3.58 (<i>m</i>)	68.51 (CH ₂)	3.58 (CH _{2b} -9), 2.88 (H-10) 3.98 (CH _{2a} -9), 2.88 (H-10)	4.93 (H-2), 2.88 (H-10)
10	2.88 (<i>t</i> , 6.6)	36.28 (CH ₂)	3.98 (CH _{2a} -9), 3.58 (CH _{2b} -9)	3.98 (CH _{2a} -9), 3.58 (CH _{2b} -9)
1'	-	139.13 (C)	-	3.98 (CH _{2a} -9), 3.58 (CH _{2b} -9), 2.88 (H-10)
2'	7.24 (<i>m</i>)	128.98 (CH)	7.24	2.88 (H-10)
3'	7.24 (<i>m</i>)	128.24 (CH)	7.24	-
4'	7.24 (<i>m</i>)	126.13 (CH)	7.24	-
5'	7.24 (<i>m</i>)	128.24 (CH)	7.24	-
6'	7.24 (<i>m</i>)	128.98 (CH)	7.24	2.88 (H-10)

Tabla 15. 1H RMN, ^{13}C RMN, 1H - 1H (COSY) y 1H - ^{13}C (HMBC) de F/D-2 ((+) etoxifenil-botryodiplodin) en $CDCl_3$

Fig 105. ^1H RMN 300 MHz de FI/D-2 ((+) etoxifenil-botryodiplodin) en CDCl_3 Fig 106. ^{13}C RMN 75 MHz de FI/D-2 ((+) etoxifenil-botryodiplodin) en CDCl_3

Fig 107. COSY 300 MHz de F/D-2 ((+) etoxifenil-botryodiplodin) en CDCl_3 Fig 108. HSQC 600 MHz de F/D-2 ((-) etoxifenil-botryodiplodin) en CDCl_3

Fig 109. HMBC 600 MHz de F/D-2 ((+) etoxifenil-botryodiplodin) en CDCl_3 Fig 110. NOESY 300 MHz de F/D-2 ((+) etoxifenil-botryodiplodin) en CDCl_3

3.5.3. Estudio de la fracción IV

Aislamiento

La fracción IV (112 mg) se sometió a cromatografía líquida en columna abierta sobre sílice (1:100 p/p) usando como fase móvil Hex/AcOEt:3/7. La mezcla se fraccionó en alícuotas de 5 mL, las cuales se reunieron en 8 subfracciones de acuerdo con su similitud en CCF. La subfracción FIV/3 (6.1 mg) resultó ser prácticamente un producto puro y se procedió a su aislamiento mediante una CCF preparativa de fase directa usando como fase móvil Hex/AcOEt:5/5. Se obtuvo un compuesto mayoritario, FIV/3-A, que se purificó mediante HPLC con una columna analítica Kromasil C18 de 5 μ m (25.0 x 0.46 cm) usando MeOH/H₂O: 7/3 como fase móvil a un flujo de 0.5 mL/min, siendo sus propiedades cromatográficas: FIV-3-A [Tr= 12.04 minutos; 1.2 mg].

Identificación del compuesto FIV/3-A

El espectro de masas mediante la técnica de ionización por electro-spray de alta resolución presenta un pico molecular m/z 353.4065 [(M+Na)⁺] que corresponde a la fórmula molecular C₁₈H₂₂O₄N₂.

El espectro de ¹H RMN (600 MHz, MeOD) (Fig 112) muestra las siguientes señales: δ 6.40 (1H, s, H-6), 4.35 (1H, d, J=6.6, H-4), 1.99 (1H, m, H-3), 0.99 (3H, d, J=6.6, CH₃-1) y 0.88 (3H, d, J=6.6, CH₃-2) ppm.

El espectro de ¹³C RMN (75 MHz, MeOD) (Fig 113) muestra las siguientes señales: δ 178.74 (C-9), 144.25 (C-5), 133.78 (C-8), 128.29 (C-7), 106.40 (C-6), 74.38 (C-4), 35.98 (C-3), 19.46 (C-1) y 18.92 (C-2) ppm.

Los datos espectroscópicos coinciden con los datos encontrados en bibliografía de la **(+)** **terreusinona**²¹⁷. Aunque la composición molecular C₁₈H₂₂O₄N₂ fue analizada por HRESMS, los espectros de ¹H RMN y ¹³C RMN sólo mostraban señales correspondientes a 9 protones y 9 carbonos asignados a la mitad de la molécula; estos datos sugirieron que FIV/3-A era un dímero simétrico. Esta dipirroloquinona fue aislada en 2003 a partir del hongo marino *Aspergillus terreus* y destaca como protector de rayos UV-A.

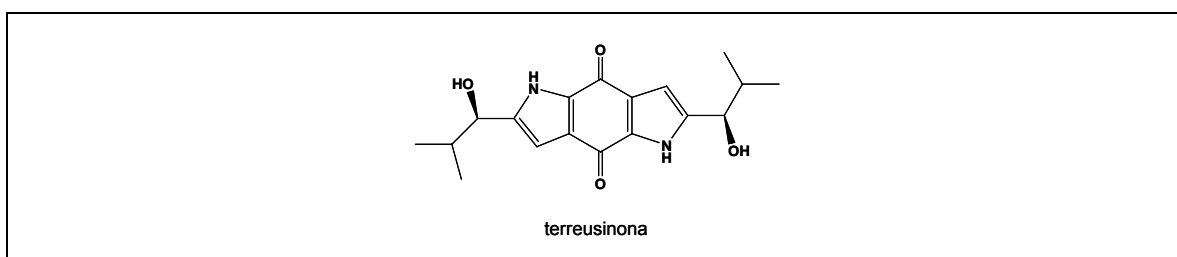
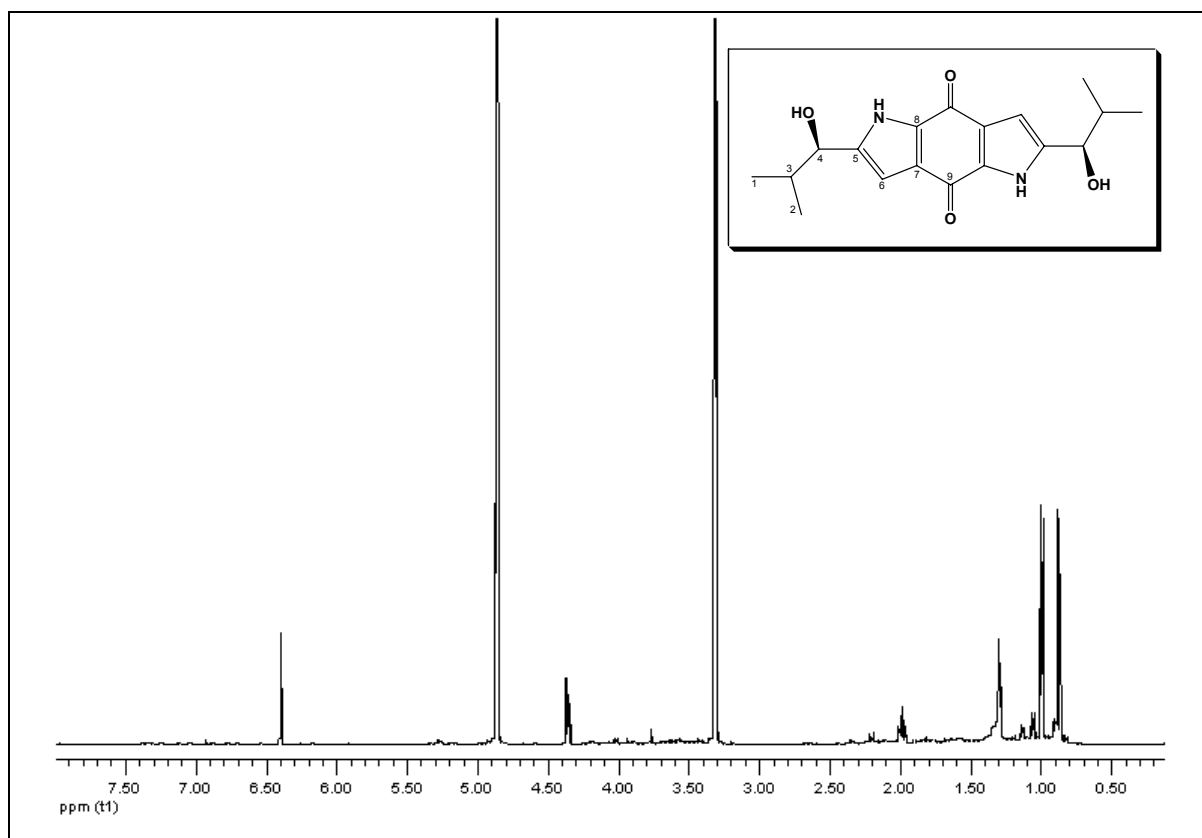
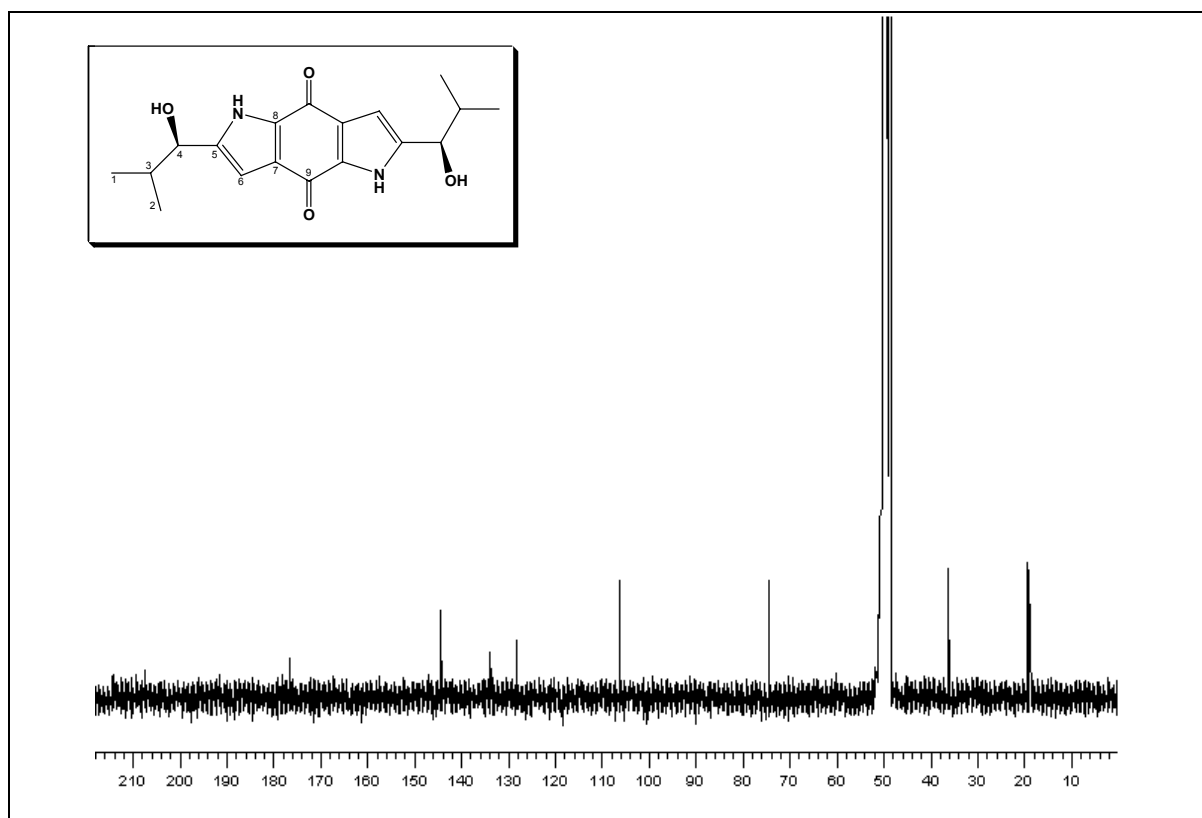


Fig 111. Estructura de FIV/3-A ((+) terreusinona)

Fig 112. ^1H RMN 600 MHz de FIV/3-A ((+) terreusinona) en MeODFig 113. ^{13}C RMN 75 MHz de FIV/3-A ((+) terreusinona) en MeOD

3.6 Actividades biológicas de los compuestos puros aislados

Debido a la similitud de estructuras halladas en las dos cepas de *P. coalescens*, las actividades biológicas del botryodiplodin y sus análogos están descritas en el apartado 4.6.

4. *Penicillium coalescens* Quintanilla (CECT 2766)

4.1 Cultivo del hongo y obtención del extracto

Con el cultivo de la cepa de *Penicillium coalescens* (CECT 2766) en 20 L de medio ATB se obtuvieron a partir del caldo 8.1 g de extracto seco y a partir del micelio 0.25 g de extracto diclorometánico y 13.5 g de extracto metanólico, según el apartado 1 de Material y métodos.

4.2 Actividad biológica del extracto

Los extractos orgánicos se sometieron a los ensayos de actividades biológicas descritos en el apartado 2 de Material y métodos, resultando el extracto del caldo significativamente activo como bactericida, fungicida e insecticida, por lo que se procedió a su estudio.

Respecto al ensayo bactericida, el extracto orgánico de caldo fúngico a una dosis de 100 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ presentó una actividad similar al control (clorhidrato de tetraciclina) a una dosis de 10 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ frente a todas las bacterias ensayadas (apartado 2.3 de Material y métodos).

En el caso de la actividad fungicida el extracto orgánico de caldo fúngico a una dosis de 2 mg/disco presentó una actividad mayor o igual al control (benomilo, que se aplica a distintas dosis según el hongo a estudiar) frente a *Fusarium culmorum* (10 $\mu\text{g}/\text{disco}$), *Fusarium oxysporum gladioli* (10 $\mu\text{g}/\text{disco}$), *Verticillium dahliae* (0.25 $\mu\text{g}/\text{disco}$), *Phytophthora citrophthora* (1.5 $\mu\text{g}/\text{disco}$) y *Aspergillus parasiticus* (1 $\mu\text{g}/\text{disco}$). También *Rosellinia neccatrix* mostró un 100% de reducción del halo de crecimiento a las 72 horas tras la inclusión del extracto orgánico del caldo en el medio de cultivo (apartado 2.2 de Material y métodos).

Los ensayos de actividad insecticida del extracto orgánico del caldo se realizaron frente a *Oncopeltus fasciatus* y *Ceratitis capitata* obteniéndose un 100% de mortalidad a una dosis de 100 $\mu\text{g}/\text{ninfa}$ y 100 $\mu\text{g}/\text{mosca}$, respectivamente (apartado 2.5 de Material y métodos).

4.3 Estudio del extracto orgánico del caldo

8.1 g del extracto orgánico del caldo se fraccionaron en columna abierta sobre un relleno de sílice (1:80 p/p), usando eluyentes de polaridad creciente, desde hexano hasta MeOH. Se obtuvieron 12 fracciones cuyos pesos y disolventes se indican en la tabla 16.

Fracción	Volumen (L)	Eluyente	Peso (mg)
FI, FII, FIII	2.0	Hex/AcOEt:7.5/2.5	362.1, 576.5, 149.2
FIV, FV, FVI, FVII, FVIII, FIX	3.0	Hex/AcOEt:5/5	141.3, 205.4, 359.6, 699.8, 632.2, 1550.2
FX, FXI	2.0	AcOEt	478.4, 256.2
FXII, FXIII	2.0	MeOH	918.9, 1810.4

Tabla 16. Fraccionamiento en columna del extracto del caldo de *Penicillium coalescens* (CECT 2766)

4.4 Actividades biológicas de las fracciones

Las fracciones cromatográficas del extracto orgánico del caldo se ensayaron como bactericidas frente a *Staphylococcus aureus* 86 y *Salmonella typhi* 481, fungicidas frente a *P. citrophthora* y *V. dahliae*, porque fueron las especies que mostraron mayor sensibilidad en los ensayos del extracto del caldo, e insecticidas frente a *O. fasciatus* y *C. capitata*, siendo la fracción IX la responsable de las tres actividades.

La fracción IX mostró actividad bactericida frente a *S. aureus* y *S. typhi* a una dosis de 50 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$, observándose un halo de inhibición de 18 y 22 mm, respectivamente, frente a los 27 y 24 mm del control (clorhidrato de tetraciclina, aplicado a 10 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$).

En el caso de la actividad fungicida al aplicarse la fracción IX a una dosis de 0.2 mg /disco frente a *V. dahliae* se dió un 100% de eficacia, es decir, produjo un halo de inhibición a las 72 horas igual que el control (benomilo, aplicado a 0.25 $\mu\text{g}/\text{disco}$).

La fracción IX también fue la que destacó por su actividad insecticida frente a *Oncopeltus fasciatus*, con una mortalidad del 100% a una dosis de 25 $\mu\text{g}/\text{ninfa}$ y frente a *Ceratitidis capitata* con un 93.3% \pm 6.6 de mortalidad a una dosis de 25 $\mu\text{g}/\text{mosca}$. Se procedió al aislamiento e identificación de los componentes causantes de dichas actividades.

4.5 Aislamiento e identificación de los compuestos de las fracciones seleccionadas

4.5.1. Estudio de la fracción IX

Al hacer los espectros de ^1H RMN y ^{13}C RMN de la fracción se pudo identificar el (-) **botryodiplodin** (1.5 g) como producto puro. Este compuesto ya fue descrito previamente en la fracción III de *P. coalescens* (CECT 2764) (Ver apartado 3.5.1.).

4.5.2. Estudio de la fracción III

Aislamiento

La fracción III (140 mg) se sometió a cromatografía líquida en columna abierta sobre sílice (1:100 p/p) usando como fase móvil un gradiente desde Hex/AcOEt:9/1 hasta Hex/AcOEt:7/3. La mezcla se fraccionó en alícuotas de 5 mL, las cuales se reunieron en 5 subfracciones de acuerdo con su similitud en CCF. La subfracción FIII/3 (18.5 mg), que se eluyó con Hex/AcOEt:8/2, resultó ser un producto puro y se inyectó en una columna analítica de HPLC Tracer excel ODSB C18 de 4 μm (25.0 x 0.46 cm) usando MeCN/H₂O:75/25 como fase móvil a un flujo de 0.5 mL/min, observándose un único pico a un tiempo de retención de 13.91 minutos.

Identificación del compuesto FIII/3

El espectro de masas mediante la técnica de ionización por electro-spray de alta resolución presenta un pico molecular m/z 277.1421 $[(M+Na)^+]$ que corresponde a la fórmula molecular $C_{14}H_{22}O_4$ (Fig 116).

El espectro de 1H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) (Fig 117) muestra las siguientes señales: δ 6.07 (1H, s, $CH_{2a-6'}$), 5.76 (1H, s, $CH_{2b-6'}$), 4.70 (1H, s, H-2), 4.25 (1H, t, $J=8.4$, CH_{2a-5}), 3.87 (1H, t, $J=8.4$, CH_{2b-5}), 3.53 (1H, dd, $J=15.9$, 8.4, H-4), 3.44 (1H, dd, $J=9.3$, 7.2, $CH_{2a-5'}$), 3.32 (1H, dd, $J=9.3$, 5.7, $CH_{2b-5'}$), 3.06 (1H, m, H-4'), 2.54 (1H, m, H-3), 2.33 (3H, s, CH_3-1'), 2.17 (3H, s, CH_3-7), 1.05 (3H, d, $J=7.2$, CH_3-7') y 0.82 (3H, d, $J=7.2$, CH_3-8) ppm.

El espectro de ^{13}C RMN (75 MHz, $CDCl_3$) (Fig 118) muestra las siguientes señales: δ 206.90 (C-6), 199.89 (C-2'), 151.80 (C-3'), 124.64 (C-6'), 109.51 (C-2), 71.66 (C-5'), 66.29 (C-5), 53.85 (C-4), 42.24 (C-3), 33.18 (C-4'), 30.53 (C-7), 26.56 (C-1'), 17.26 (C-7') y 12.93 (C-8) ppm.

La gran similitud existente entre los datos espectrales de este compuesto y los que presenta botryodiplodin, permite deducir que se trata de una molécula perteneciente a esta familia. La estructura de FIII/3 se determina por comparación de sus datos espectroscópicos de 1H RMN y ^{13}C RMN con los datos de botryodiplodin y se confirma con los experimentos de dos dimensiones (COSY $^1H-^1H$ (Fig 119), HSQC (Fig 120) y HMBC (Fig 121)). Al estudiar los espectros de 1H RMN y ^{13}C RMN se identifica la estructura de botryodiplodin unida a un fragmento olefínico proveniente de otra molécula de botryodiplodin deshidratada y reducida (Fig 115).

El estudio de los espectros COSY y HMBC (Tabla 17) permitió identificar que la unión entre ambas moléculas de botryodiplodin se produce mediante el OH hemiacetalico de la posición 2 de botryodiplodin y el alcohol terminal de la segunda molécula, por la correlación a larga distancia entre el C-2 y los H-5' y entre el C-5' y H-2 y por la correlación H-H entre H-5' y H-2.

Se obtuvo un valor de poder rotatorio $[\alpha]_D^{25} = -75.0^\circ$ (c. 1, $CHCl_3$) y la configuración absoluta se asignó teniendo en cuenta tanto la ruta biogenética, como mediante las correlaciones NOESY observadas (Fig 122); δ 4.70 (H-2)-0.81 (CH_3-8) y 3.32 ($CH_{2b-5'}$); δ 3.32 ($CH_{2b-5'}$)-1.04 (CH_3-7'), indicando que H-2, CH_3-8 y CH_3-7' están en el mismo plano, mientras que el valor de la constante de acoplamiento del protón en posición 2 ($J=0$ Hz) indicaba una relación *trans* entre los H-2 y H-3.²¹⁴ Así pues, la configuración absoluta de este compuesto se propuso como (2*R*, 3*R*, 4*S*, 4'*R*).

A la vista de la discusión realizada, se ha propuesto la siguiente estructura (Fig 114) para FIII/3, aislada por primera vez a partir de fuentes naturales y ha sido denominada (-) **botryodiplodinenona**.

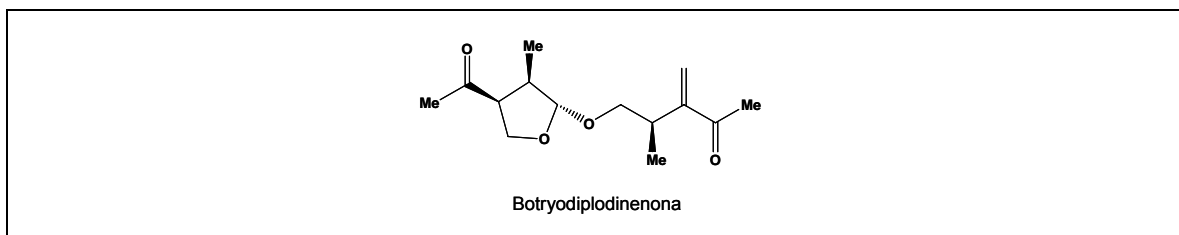


Fig 114. Estructura de FIII/3 (-) botryodiplodinona)

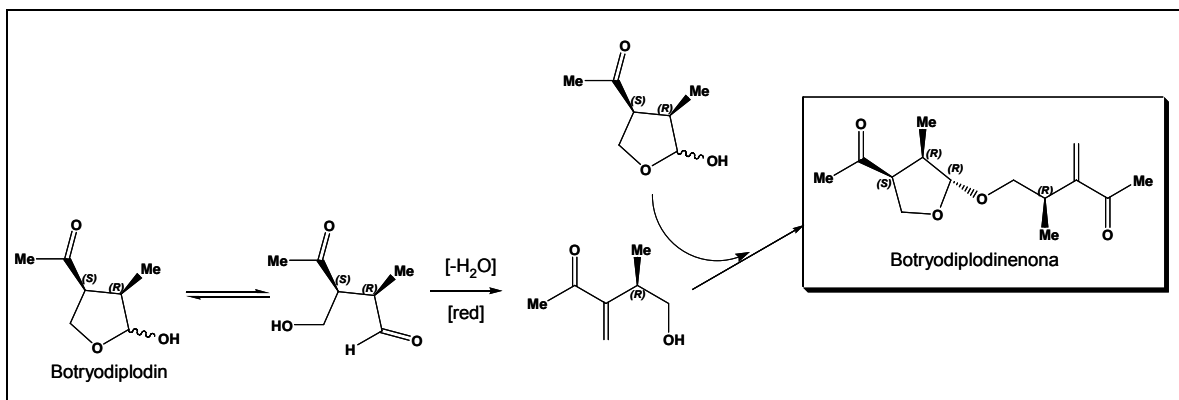


Fig 115. Posible biogénesis de (-) botryodiplodinona

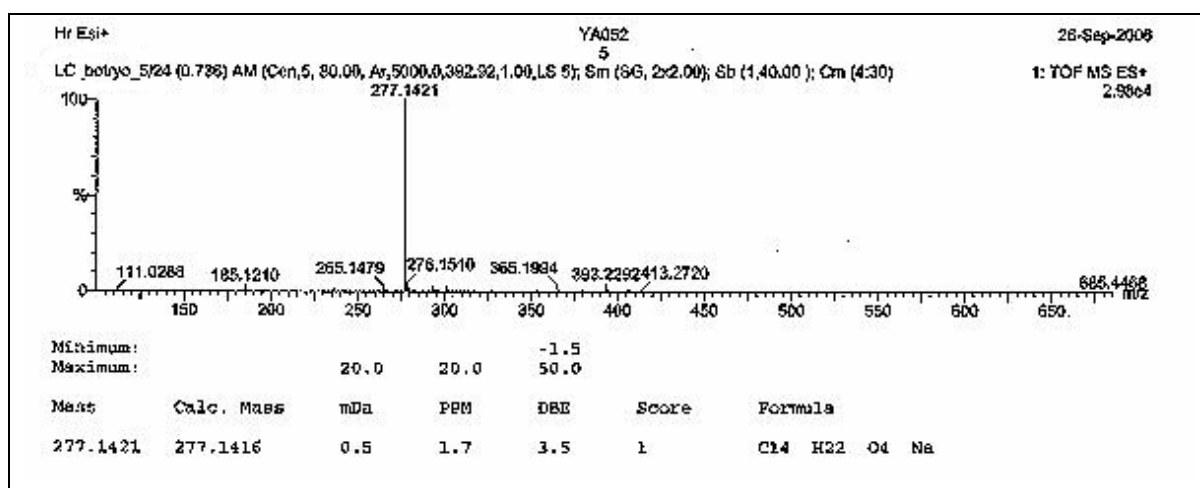
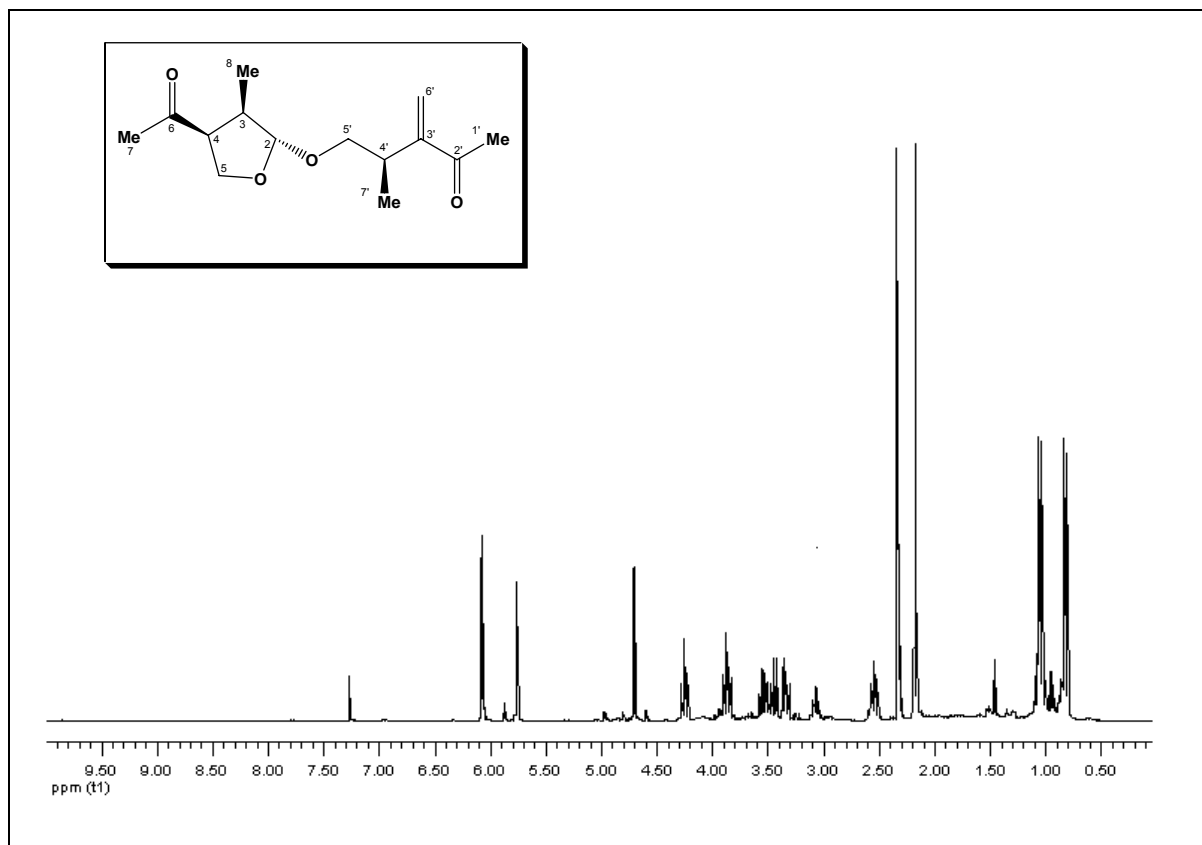
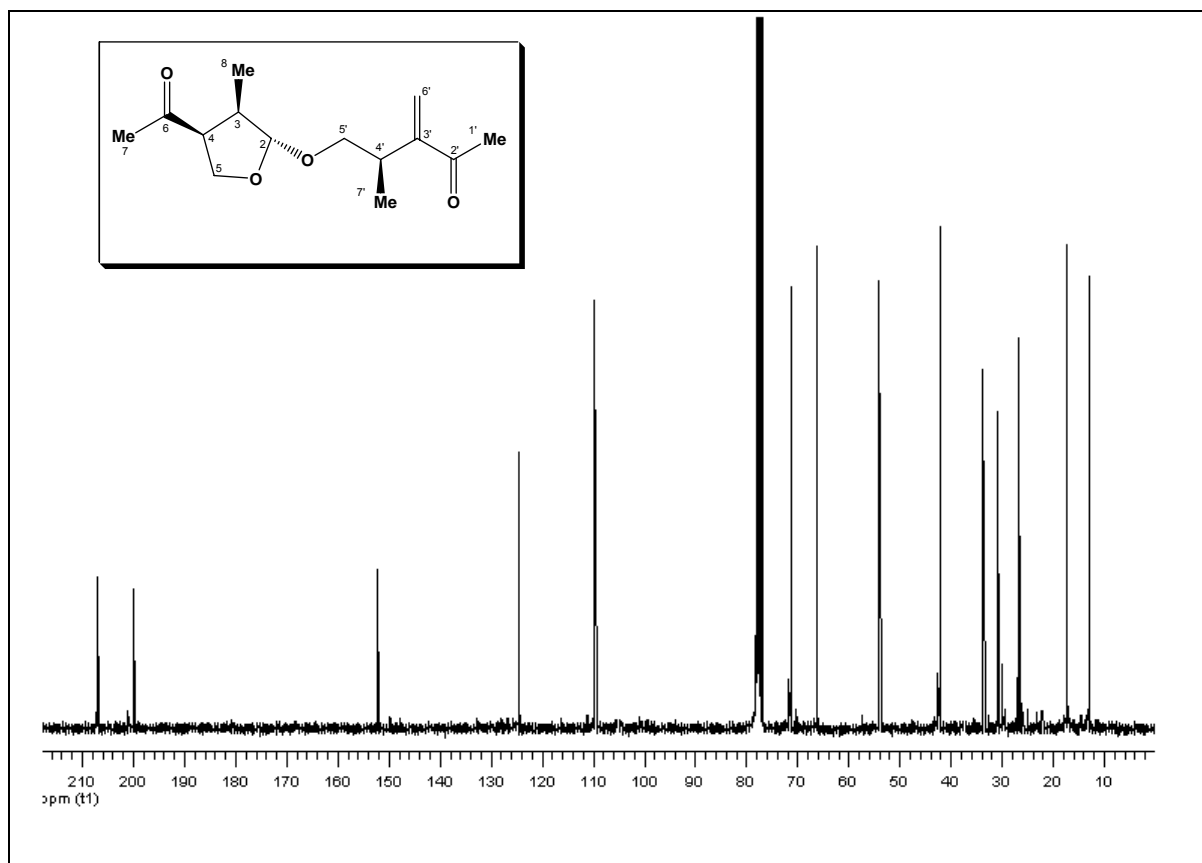
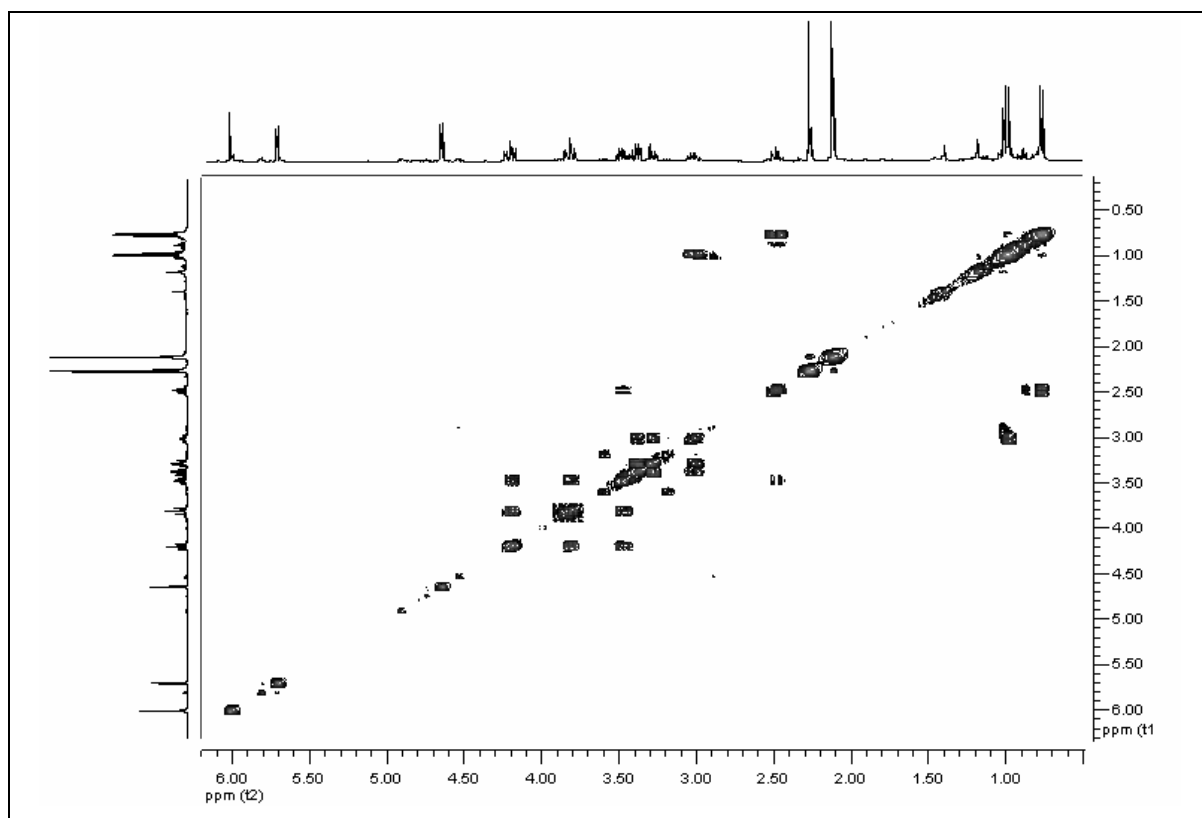
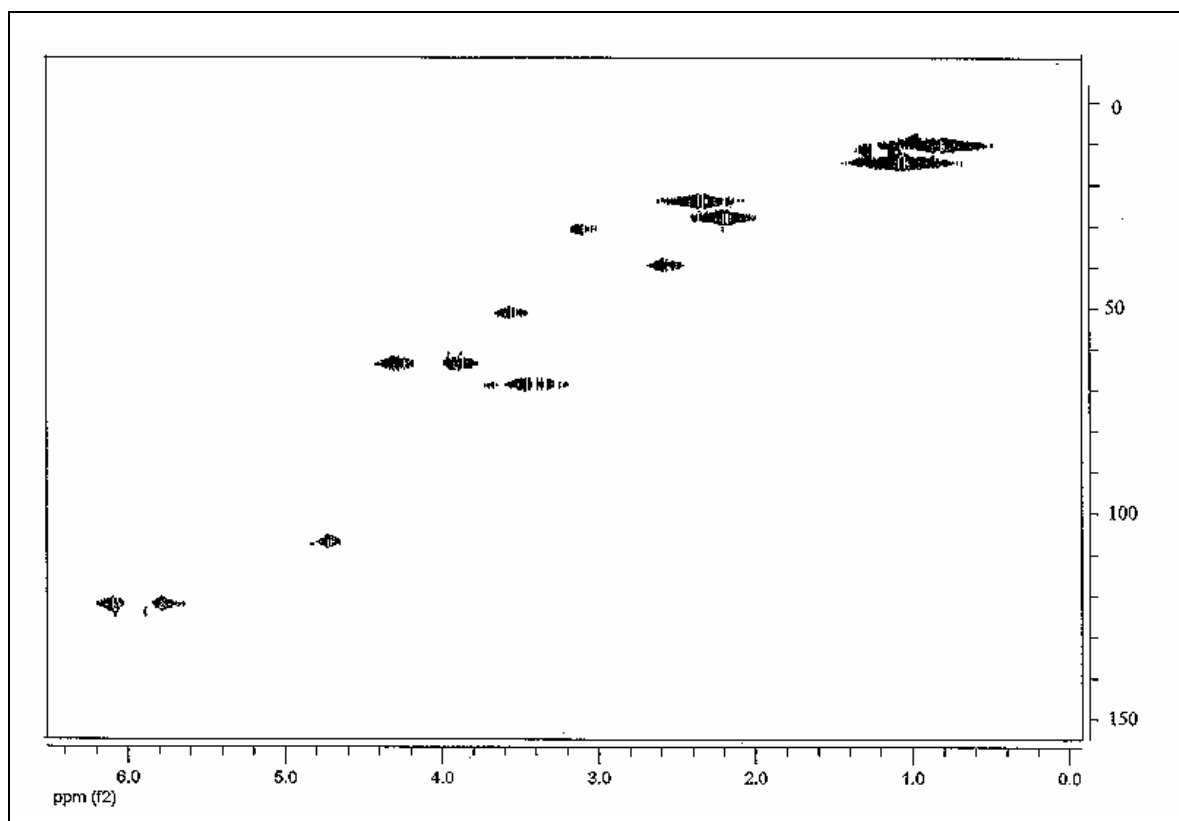


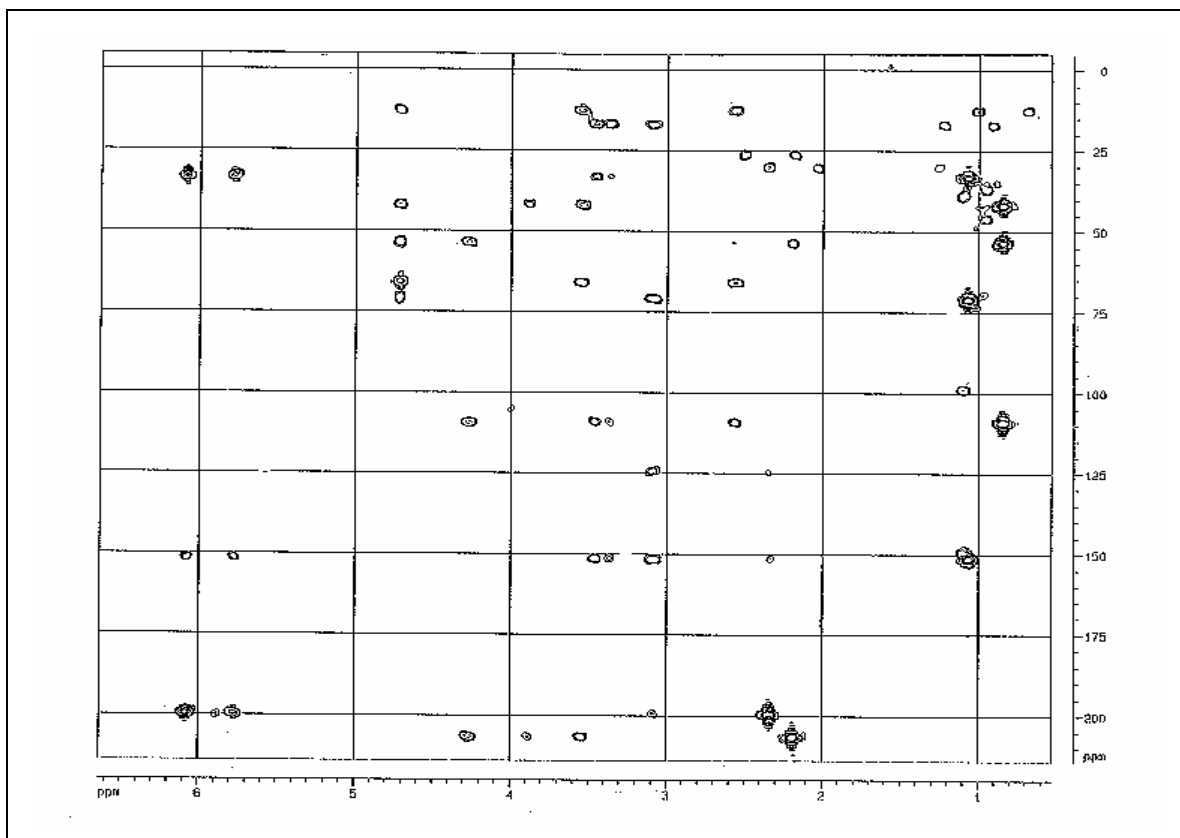
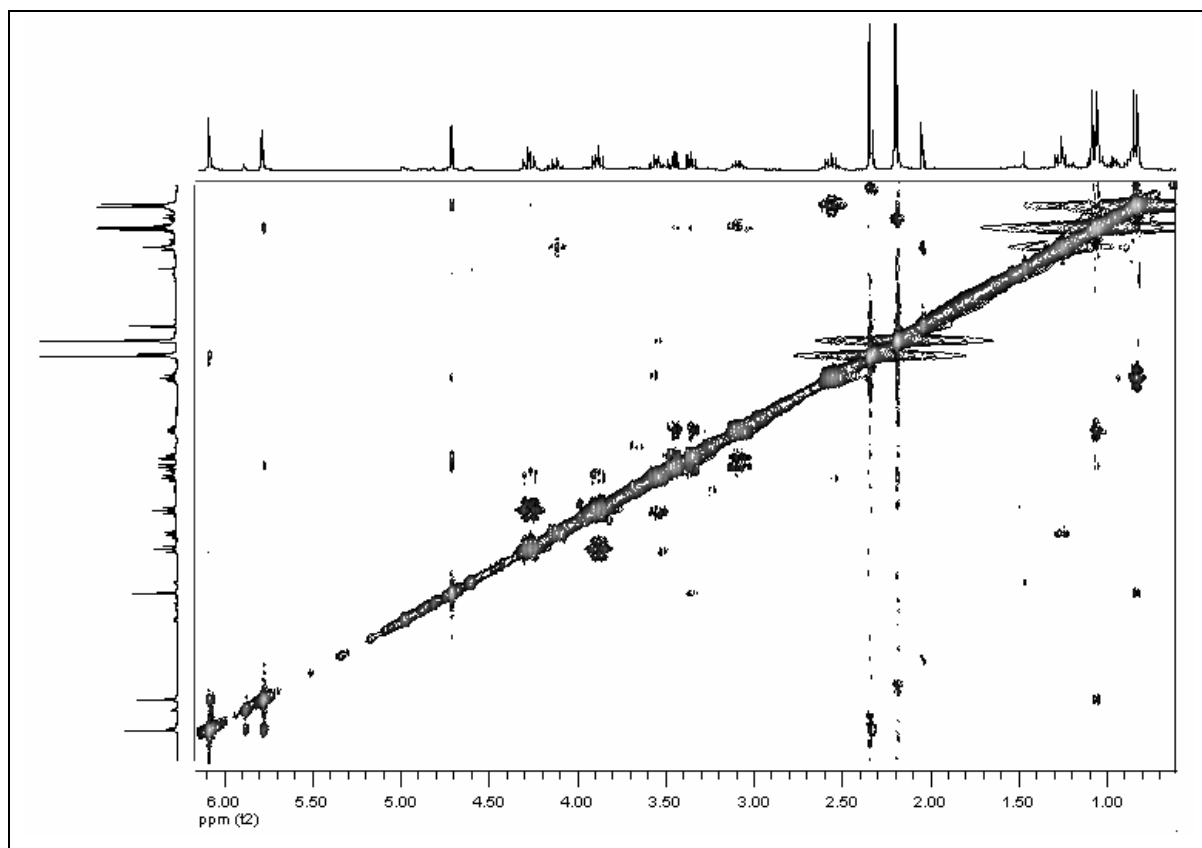
Fig 116. ESMS de FIII/3 (-) botryodiplodinona)

	δ_H (<i>mult</i> , J en Hz)	δ_C (<i>mult</i> , DEPT)	Correlación 1H - 1H (COSY)	Correlación 1H - ^{13}C (HMBC)
2	4.70 (<i>s</i>)	109.51 (CH)	-	4.25 (CH _{2a} -5), 3.44 (CH _{2a} -5'), 3.32 (CH _{2b} -5'), 2.54 (H-3), 0.81(CH ₃ -8)
3	2.54 (<i>m</i>)	42.24 (CH)	3.53 (H-4), 0.81 (CH ₃ -8)	4.70 (H-2), 3.87 (CH _{2b} -5), 3.53 (H-4), 0.81 (CH ₃ -8)
4	3.53 (<i>dd</i> , 15.9, 8.4)	53.85 (CH)	4.25 (CH _{2a} -5), 3.87 (CH _{2b} -5), 2.54 (H-3)	4.70 (H-2), 4.25 (CH _{2a} -5), 2.54 (H-3), 2.17 (CH ₃ -7), 0.81 (CH ₃ -8)
5	4.25 (<i>t</i> , 8.4) 3.87 (<i>t</i> , 8.4)	66.29 (CH ₂)	3.87 (CH _{2b} -5), 3.53 (H-4) 4.25 (CH _{2a} -5), 3.53 (H-4)	4.70 (H-2), 3.53 (H-4), 2.54 (H-3)
6	-	206.90 (C)	-	4.25 (CH _{2a} -5), 3.87 (CH _{2b} -5), 3.53 (H-4), 2.17 (CH ₃ -7)
7	2.17 (<i>s</i>)	30.53 (CH ₃)	-	-
8	0.81 (<i>d</i> , 7.2)	12.93 (CH ₃)	2.54 (H-3)	4.70 (H-2), 3.53 (H-4), 2.54 (H-3)
1'	2.33 (<i>s</i>)	26.56 (CH ₃)	-	-
2'	-	199.89 (C)	-	6.07 (CH _{2a} -6'), 5.76 (CH _{2b} -6'), 3.06 (H-4'), 2.33 (CH ₃ -1')
3'	-	151.80 (C)	-	6.07 (CH _{2a} -6'), 5.76 (CH _{2b} -6'), 3.44 (CH _{2a} -5'), 3.32 (CH _{2b} -5'), 3.06 (H-4'), 2.33 (CH ₃ -1'), 1.04 (CH ₃ -7')
4'	3.06 (<i>m</i>)	33.18 (CH)	3.44 (CH _{2a} -5'), 3.32 (CH _{2b} -5'), 1.04 (CH ₃ -7')	6.07 (CH _{2a} -6'), 5.76 (CH _{2b} -6'), 3.44 (CH _{2a} -5'), 3.32 (CH _{2b} -5'), 1.04 (CH ₃ -7')
5'	3.44 (<i>dd</i> , 9.3, 7.2) 3.32 (<i>t</i> , 9.3, 5.7)	71.66 (CH ₂)	3.32 (CH _{2b} -5'), 3.06 (H-4') 3.44 (CH _{2a} -5'), 3.06 (H-4')	4.70 (H-2), 3.06 (H-4'), 1.04 (CH ₃ -7')
6'	6.07 (<i>s</i>), 5.76 (<i>s</i>)	124.64 (CH ₂)	-	3.06 (H-4'), 2.33 (CH ₃ -1')
7'	1.04 (<i>d</i> , 7.2)	17.26 (CH ₃)	3.06 (H-4')	3.44 (CH _{2a} -5'), 3.32 (CH _{2b} -5'), 3.06 (H-4')

Tabla 17. 1H RMN, ^{13}C RMN, 1H - 1H (COSY) y 1H - ^{13}C (HMBC) de FIII/3 (-) botryodiplodinenona) en CDCl₃

Fig 117. ¹H RMN 300 MHz de FIII/3 ((-)-botryodiplodinenona) en CDCl₃Fig 118. ¹³C RMN 75 MHz de FIII/3 ((-)-botryodiplodinenona) en CDCl₃

Fig 119. COSY 300 MHz de FIII/3 (-) botryodiplodinona en CDCl_3 Fig 120. HSQC 400 MHz de FIII/3 (-) botryodiplodinona en CDCl_3

Fig 121. HMBC 400 MHz de FIII/3 ((-)-botryodiplodinenona) en CDCl₃Fig 122. NOESY 300 MHz de FIII/3 ((-)-botryodiplodinenona) en CDCl₃

4.5.3. Estudio de la fracción IV

Aislamiento

La fracción IV (140 mg) se sometió a cromatografía líquida de media presión usando como fase móvil un gradiente desde hexano hasta AcOEt. La mezcla se fraccionó en alícuotas de 5 mL, las cuales se reunieron en 10 subfracciones de acuerdo con su similitud en CCF. La subfracción FIV/8 (39.6 mg) resultó ser el producto mayoritario y se procedió a su purificación mediante columna abierta de sílice (1:100 p/p) usando como fase móvil Hex/AcOEt:8.5/1.5. Así se obtuvo el compuesto FIV/8-5 (8.6 mg) que se inyectó en una columna analítica de HPLC Tracer excel ODSB C18 de 4 μ m (25.0 x 0.46 cm) usando MeCN/H₂O: 6/4 como fase móvil a un flujo de 0.5 mL/min, observándose un único pico a un tiempo de retención de 22.11 minutos.

Identificación del compuesto FIV/8-5

El espectro de masas mediante la técnica de ionización por electro-spray de alta resolución presenta un pico molecular m/z 403.2103 [(M+Na)⁺] que corresponde a la fórmula molecular C₂₁H₃₂O₆ (Fig 125).

El espectro de ¹H RMN (600 MHz, CDCl₃) (Fig 126) muestra las siguientes señales: δ 6.13 (1H, s, CH_{2a}-6'), 6.06 (1H, s, CH_{2a}-6''), 6.01 (1H, s, CH_{2b}-6'), 5.84 (1H, s, CH_{2b}-6''), 4.78 (1H, d, $J=6.0$, H-6), 4.60 (1H, d, $J=3.6$, H-2), 3.88 (1H, dd, $J=12.0$, 0.5, CH_{2a}-4), 3.78 (1H, dd, $J=12.0$, 3.0, CH_{2b}-4), 3.64 (1H, dd, $J=9.0$, 7.2, CH_{2a}-5''), 3.44 (1H, dd, $J=9.0$, 6.0, CH_{2b}-5''), 3.09 (2H, m, H-2', H-4''), 2.54 (1H, m, H-5), 2.34 (6H, s, CH₃-5', CH₃-1''), 1.44 (3H, s, CH₃-9), 1.37 (1H, m, H-4a), 1.11 (3H, d, $J=6.9$, CH₃-7'') 1.10 (3H, d, $J=6.9$, CH₃-1') y 1.06 (3H, d, $J=6.9$, CH₃-8) ppm.

El espectro de ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) (Fig 127) muestra las siguientes señales: δ 199.78 (C-2''), 199.70 (C-4'), 151.47 (C-3''), 149.15 (C-3'), 126.61 (C-6'), 124.43 (C-6''), 111.43 (C-6), 104.19 (C-7a), 98.85 (C-2), 72.67 (C-5''), 63.49 (C-4), 49.22 (C-4a), 39.04 (C-5), 37.53 (C-2'), 33.44 (C-4''), 26.24 (C-1'', C-5'), 20.53 (C-9), 16.93 (C-7''), 14.83 (C-8) y 13.52 (C-1') ppm.

La gran similitud existente entre los datos espectrales de este compuesto y los que presenta el botryodiplodin, permite deducir que se trata de una molécula perteneciente a esta familia. La estructura de FIV/8-5 se determina por comparación de sus datos espectroscópicos de ¹H RMN y ¹³C RMN con los datos de botryodiplodin y botryodioxinenona y se confirma con los experimentos de dos dimensiones (COSY ¹H-¹H (Fig 128), HSQC (Fig 129) y HMBC (Fig 130)). Al estudiar los espectros de ¹H RMN y ¹³C RMN se identifica la estructura de la botryodioxinenona unida a un fragmento olefínico proveniente de otra molécula del botryodiplodin deshidratada y reducida (Fig 124).

El estudio de los espectros COSY y HMBC (Tabla 18) permitió identificar que la unión entre ambas moléculas se produce mediante el CH de la posición 6 de la botryodioxinenona y el

alcohol terminal de la segunda molécula del botryodiplodin, por la correlación a larga distancia entre el C-6 y el H-5'' y entre el C-5'' y H-6 y por la correlación $^1\text{H}-^1\text{H}$ entre H-6 y H-5''.

Se obtuvo un valor de poder rotatorio $[\alpha]_D^{25} = -0.39^\circ$ (c 10.33, CHCl_3) y la configuración de C-5, C-4a, C-2' y C-4'' se propuso según la ruta biogénica como (5*R*, 4a*S*, 2'*R*, 4''*R*). Teniendo en cuenta a su precursor botryodioxinenona, se consideró una relación *cis* entre H-2, CH_3 -9 y H-4a y el valor de la constante de acoplamiento del protón en posición 6 ($J = 6.0$ Hz) indicó también una relación *cis* entre los protones H-6 - H-5''²¹⁴.

A la vista de la discusión realizada, se ha propuesto la siguiente estructura (Fig 123) para FIV/8-5, aislada por primera vez a partir de fuentes naturales y ha sido denominada (-) botryodioxindinenona.

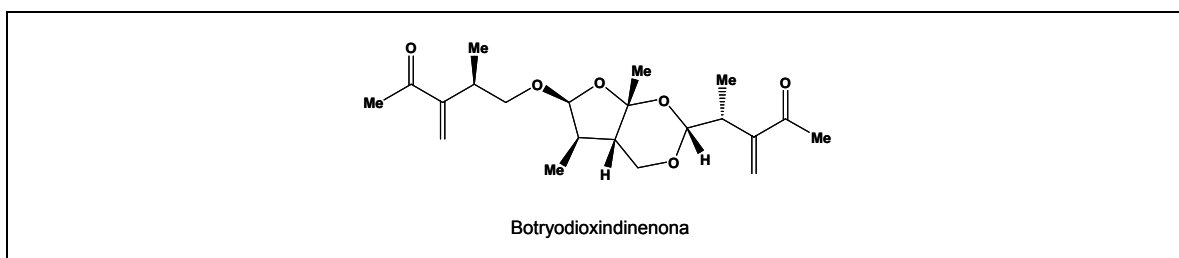


Fig 123. Estructura de FIV/8-5 ((-) botryodioxindinenona)

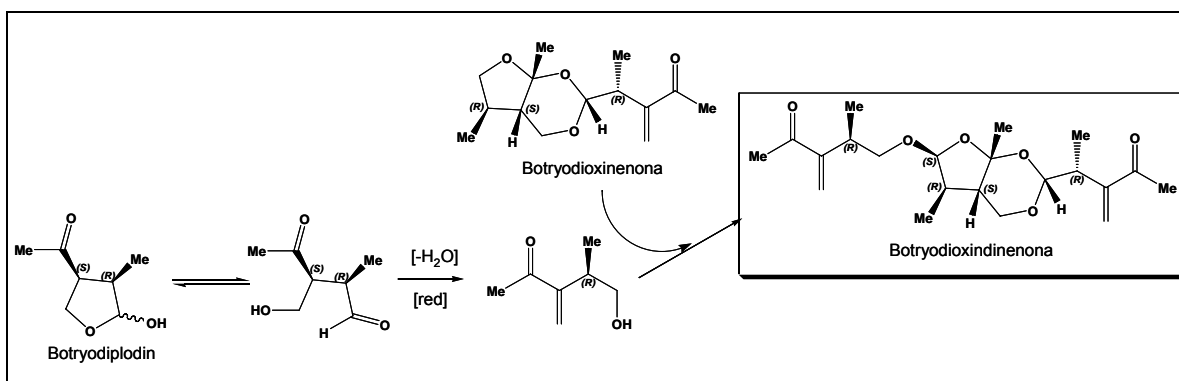


Fig 124. Posible biogénesis de (-) botryodioxindinenona

	δ_H (<i>mult</i> , J en Hz)	δ_C (<i>mult</i> , DEPT)	Correlación 1H - 1H (COSY)	Correlación 1H - ^{13}C (HMBC)
2	4.60 (<i>d</i> , 3.6)	98.85 (CH)	3.09 (H-2')	6.13 (CH _{2a} -6'), 6.01 (CH _{2b} -6'), 3.88 (CH _{2a} -4), 3.78 (CH _{2b} -4), 3.09 (H-2'), 1.10 (CH ₃ -1')
4	3.88 (<i>dd</i> , 12, 0.5) 3.78 (<i>dd</i> , 12, 3)	63.49 (CH ₂)	3.78 (CH _{2b} -4), 1.37 (H-4a) 3.88 (CH _{2a} -4), 1.37 (H-4a)	4.60 (H-2), 2.54 (H-5)
4a	1.37 (<i>m</i>)	49.22 (CH)	3.88 (CH _{2a} -4), 3.78 (CH _{2b} -4), 2.54 (H-5)	3.88 (CH _{2a} -4), 2.54 (H-5), 1.44 (CH ₃ -9), 1.06 (CH ₃ -8)
5	2.54 (<i>m</i>)	39.04 (CH)	4.78 (H-6), 1.37 (H-4a), 1.06 (CH ₃ -8)	4.78 (H-6), 3.88 (CH _{2a} -4), 3.78 (CH _{2b} -4), 1.37 (H-4a), 1.06 (CH ₃ -8)
6	4.78 (<i>d</i> , 6)	111.43 (CH)	2.54 (H-5)	3.64 (CH _{2a} -5''), 3.44 (CH _{2b} -5''), 2.54 (H-5), 1.06 (CH ₃ -8)
7a	-	104.19 (C)	-	4.78 (H-6), 4.60 (H-2), 3.88 (CH _{2a} -4), 3.78 (CH _{2b} -4), 1.44 (CH ₃ -9), 1.37 (H-4a)
8	1.06 (<i>d</i> , 6.9)	14.83 (CH ₃)	2.54 (H-5)	4.78 (H-6), 2.54 (H-5), 1.37 (H-4a)
9	1.44 (<i>s</i>)	20.53 (CH ₃)	-	-
1'	1.10 (<i>d</i> , 6.9)	13.52 (CH ₃)	3.09 (H-2')	6.01 (CH _{2b} -6'), 4.60 (H-2), 3.09 (H-2')
2'	3.09 (<i>m</i>)	37.53 (CH)	4.60 (H-2), 1.10 (CH ₃ -1')	6.13 (CH _{2a} -6'), 6.01 (CH _{2b} -6'), 1.10 (CH ₃ -1')
3'	-	149.15 (C)	-	6.13 (CH _{2a} -6'), 6.01 (CH _{2b} -6'), 4.60 (H-2), 3.09 (H-2'), 2.34 (CH ₃ -5'), 1.10 (CH ₃ -1')
4'	-	199.70 (C)	-	6.13 (CH _{2a} -6'), 6.01 (CH _{2b} -6'), 3.09 (H-2'), 2.34 (CH ₃ -5')
5'	2.34 (<i>s</i>)	26.28 (CH ₃)	-	-
6'	6.13 (<i>s</i>), 6.01 (<i>s</i>)	126.61 (CH ₂)	-	3.09 (H-2'), 2.34 (CH ₃ -5')
1''	2.34 (<i>s</i>)	26.24 (CH ₃)	-	-
2''	-	199.78 (C)	-	6.06 (CH _{2a} -6''), 5.84 (CH _{2b} -6''), 3.09 (H-4''), 2.34 (CH ₃ -1'')
3''	-	151.47 (C)	-	6.06 (CH _{2a} -6''), 5.84 (CH _{2b} -6''), 3.64 (CH _{2a} -5''), 3.44 (CH _{2b} -5''), 3.09 (H-4''), 2.34 (CH ₃ -1''), 1.11 (CH ₃ -7'')
4''	3.09 (<i>m</i>)	33.44 (CH)	3.64 (CH _{2a} -5''), 3.44 (CH _{2b} -5''), 1.11 (CH ₃ -7'')	6.06 (CH _{2a} -6''), 5.84 (CH _{2b} -6''), 3.64 (CH _{2a} - 5''), 3.44 (CH _{2b} -5''), 1.11 (CH ₃ -7'')
5''	3.64 (<i>dd</i> , 9, 7.2) 3.44 (<i>dd</i> , 9, 6)	72.67 (CH ₂)	3.44 (CH _{2b} -5''), 3.09 (H-4'') 3.64 (CH _{2a} -5''), 3.09 (H-4'')	6.06 (CH _{2a} -6''), 5.84 (CH _{2b} -6''), 4.78 (H-6), 3.09 (H-4''), 1.11 (CH ₃ -7'')
6''	6.06 (<i>s</i>), 5.84 (<i>s</i>)	124.43 (CH ₂)	-	3.09 (H-4''), 2.34 (CH ₃ -1'')
7''	1.11 (<i>d</i> , 6.9)	16.93 (CH ₃)	3.09 (H-4'')	6.06 (CH _{2a} -6''), 5.84 (CH _{2b} -6''), 3.64 (CH _{2a} - 5''), 3.44 (CH _{2b} -5''), 3.09 (H-4'')

Tabla 18. 1H RMN, ^{13}C RMN, 1H - 1H (COSY) y 1H - ^{13}C (HMBC) de FIV/8-5 (-) botryodioxindinenona) en CDCl₃

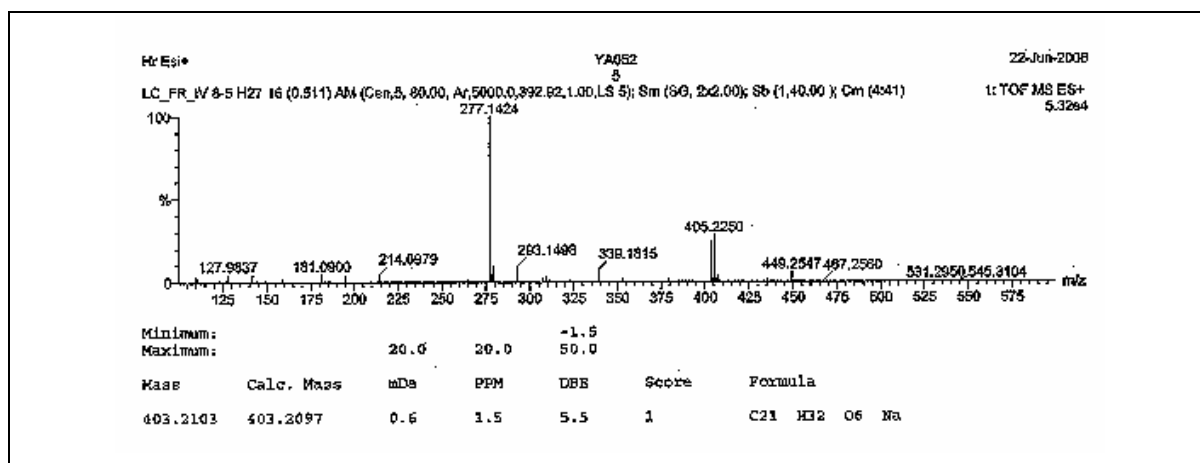
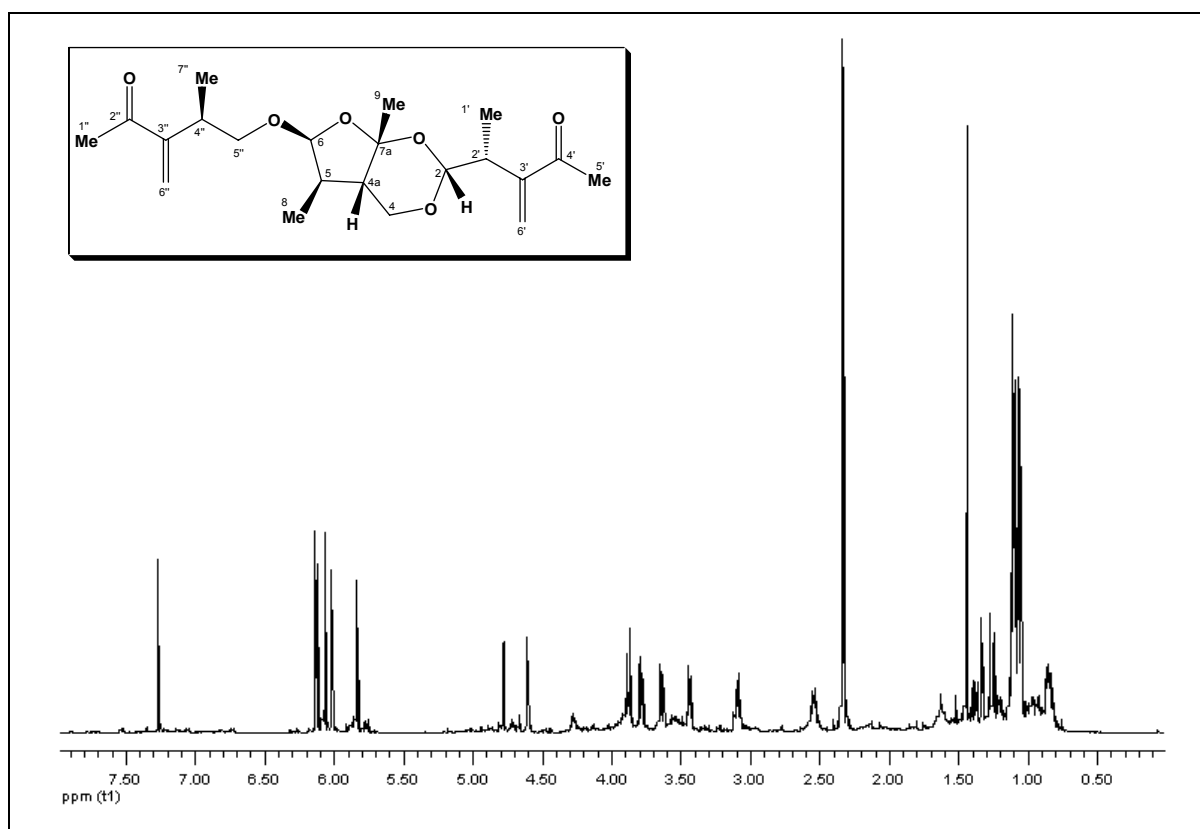
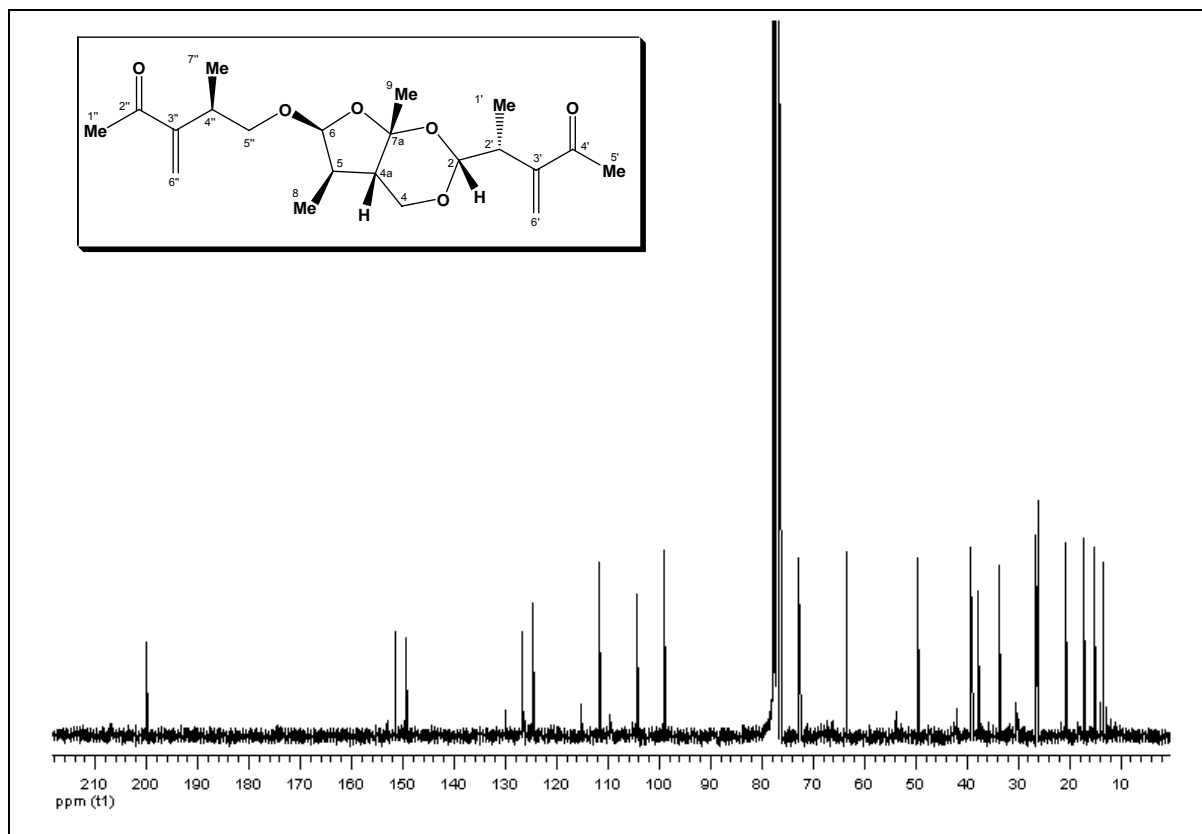
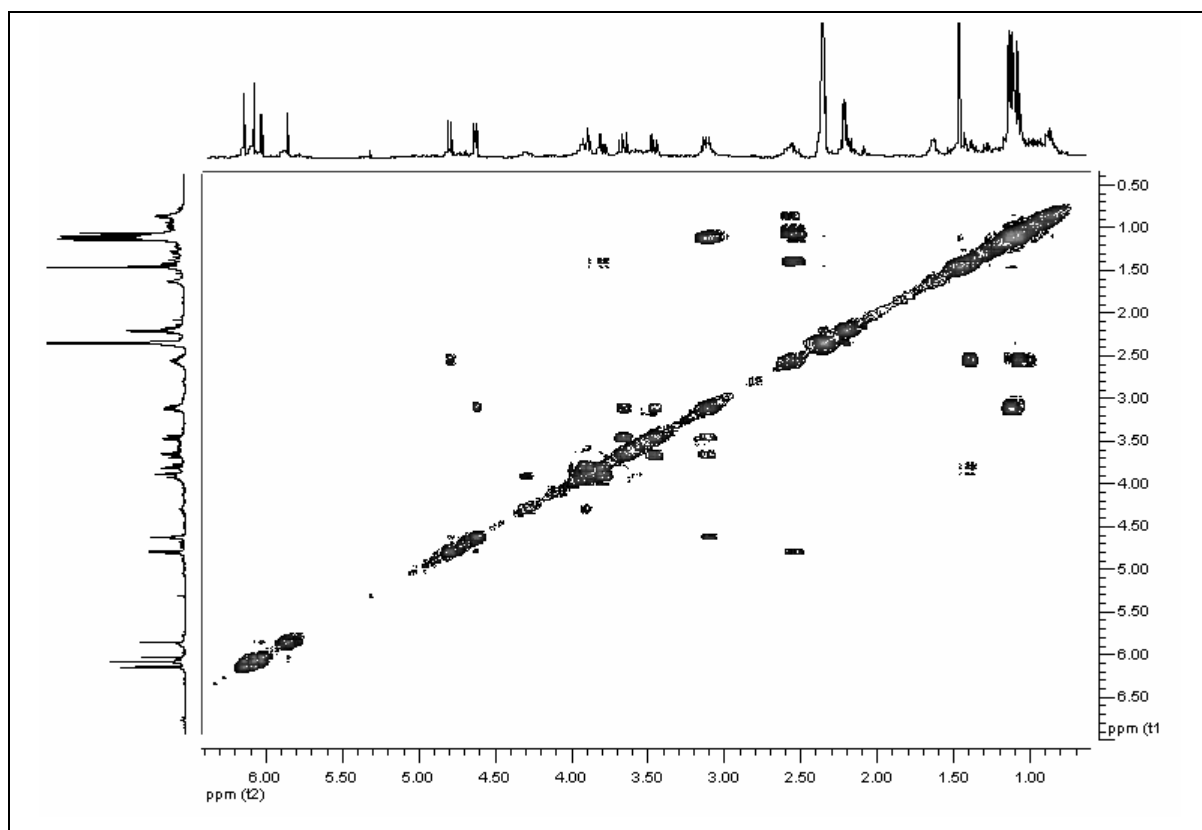
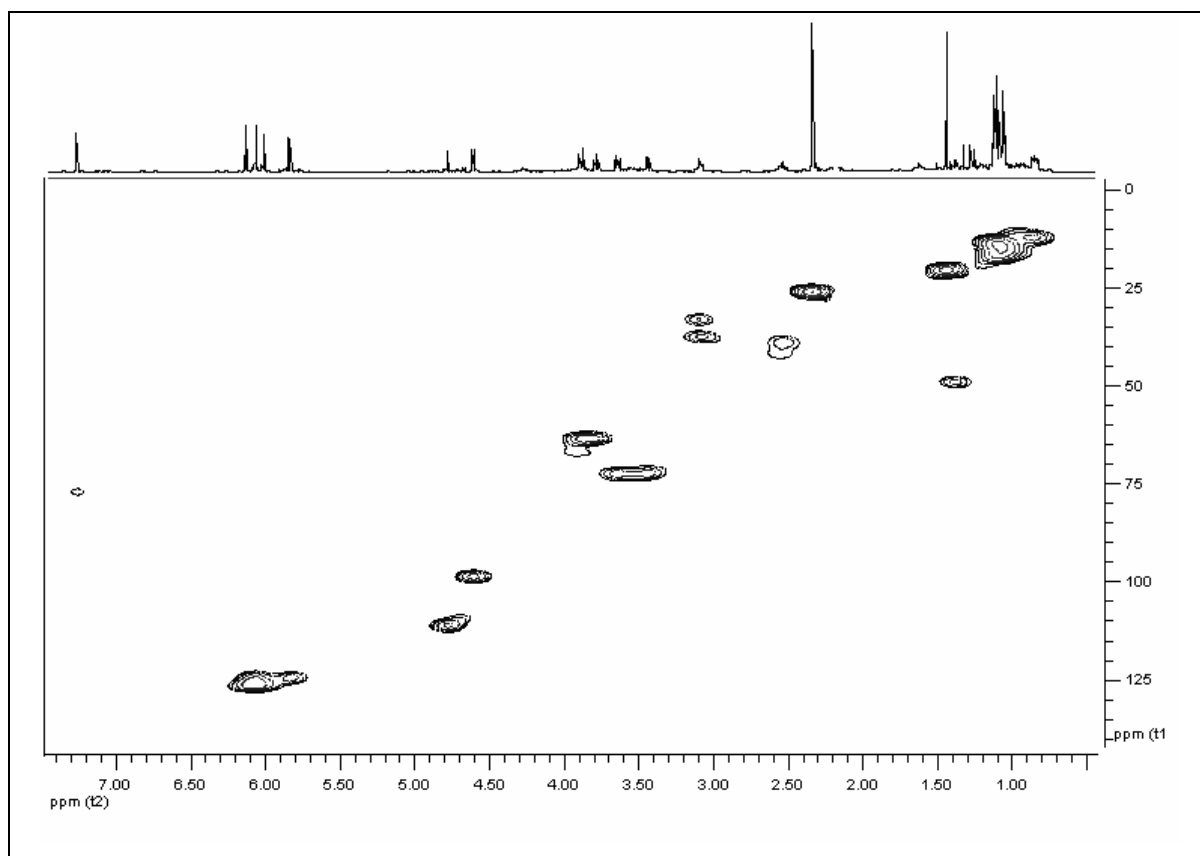
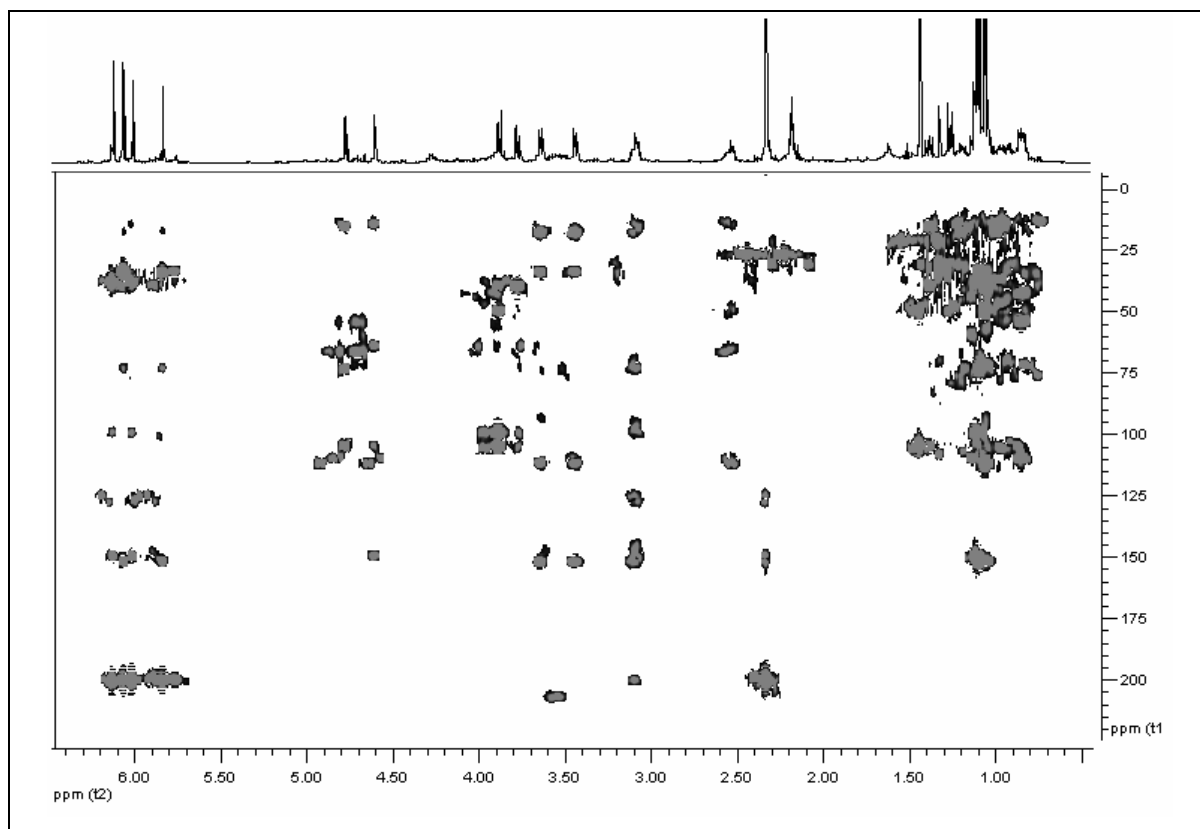


Fig 125. ESHRMS de FIV/8-5 ((-) botryodioxindinenona)

Fig 126. ^1H RMN 600 MHz de FIV/8-5 ((-) botryodioxindinenona) en CDCl_3

Fig 127. ^{13}C RMN 75 MHz de FIV/8-5 ((-) botryodioxindinenona) en CDCl_3 Fig 128. COSY 300 MHz de FIV/8-5 ((-) botryodioxindinenona) en CDCl_3

Fig 129. HSQC 600 MHz de FIV/8-5 ((-) botryodioxindinenona) en CDCl_3 Fig 130. HMBC 600 MHz de FIV/8-5 ((-) botryodioxindinenona) en CDCl_3

4.5.4. Estudio de la fracción VI

Aislamiento

La fracción VI (350 mg) se sometió a cromatografía líquida en columna abierta sobre sílice (1:100 p/p) usando como fase móvil un gradiente desde Hex/AcOEt:6.6/3.4 hasta AcOEt. La mezcla se fraccionó en alícuotas de 8 mL, las cuales se reunieron en 9 subfracciones de acuerdo con su similitud en CCF.

La subfracción FVI/7 (235 mg) que se eluyó con Hex/AcOEt:6.6/3.4 resultó ser un compuesto mayoritario y se purificó mediante otra columna abierta de sílice (1:80 p/p) usando como fase móvil Hex/AcOEt:8/2, obteniéndose un producto puro FVI/7-5 (1.7 mg).

La subfracción FVI/8 (34 mg) que se eluyó con AcOEt resultó ser prácticamente un producto puro. Esta subfracción se purificó mediante otra columna abierta de sílice (1:80 p/p) usando como fase móvil Hex/AcOEt:8/2, obteniéndose un producto puro FVI/8-5 (19.2 mg).

Identificación del compuesto FVI/7-5

El espectro de masas mediante la técnica de ionización por electro-spray de alta resolución presenta un pico molecular m/z 277.1415 $[(M+Na)^+]$ que corresponde a la fórmula molecular $C_{14}H_{22}O_4$ (Fig 132).

El espectro de 1H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) (Fig 133) muestra las siguientes señales: δ 6.09 (1H, s, $CH_{2a-6'}$), 5.81 (1H, s, $CH_{2b-6'}$), 4.91 (1H, d, $J=5.1$, H-2), 4.25 (1H, dd, $J=9.0$, 6.3, CH_{2a-5}), 3.92 (1H, dd, $J=9.0$, 7.8, CH_{2b-5}), 3.69 (1H, dd, $J=9.3$, 6.0, $CH_{2a-5'}$), 3.30 (1H, dd, $J=9.3$, 6.0, $CH_{2b-5'}$), 3.11 (2H, m, H-4, H-4'), 2.57 (1H, m, H-3), 2.34 (3H, s, CH_3-1'), 2.20 (3H, s, CH_3-7), 1.07 (3H, d, $J=6.9$, CH_3-7') y 0.93 (3H, d, $J=7.2$, CH_3-8) ppm.

El espectro de ^{13}C RMN (75 MHz, $CDCl_3$) (Fig 134) muestra las siguientes señales: δ 208.57 (C-6), 199.92 (C-2'), 151.74 (C-3'), 125.06 (C-6'), 105.01 (C-2), 71.88 (C-5'), 67.73 (C-5), 54.26 (C-4), 41.41 (C-3), 33.20 (C-4'), 30.04 (C-7), 26.53 (C-1'), 17.28 (C-7') y 10.25 (C-8) ppm.

La gran similitud existente entre los datos espectrales de este compuesto y los que la presenta la botryodiplodinenona, permite deducir que se trata de una molécula muy similar. La estructura de FVI/7-5 se determina por comparación de sus datos espectroscópicos de 1H RMN y ^{13}C RMN con los datos de la botryodiplodinenona y se confirma con los experimentos de dos dimensiones (COSY $^1H-^1H$, HSQC y HMBC) (Tabla 19). Al estudiar el espectro de 1H RMN y ^{13}C RMN, las diferencias más significativas se encuentran en el protón en posición 4 y el carbono en posición 2 que se han apantallado 0.42 ppm y 4.5 ppm, respectivamente, en relación a la botryodiplodinenona. Además el protón en posición 2 aparece como un doblete con una $J=5.1$ Hz, indicando una configuración *cis* entre H-2 y H-3, en lugar de un singulete que aparecía en el caso de la botryodiplodinenona. Ambas moléculas poseen el mismo peso molecular, por lo que se puede concluir que se trata del epímero en posición 2 de la botryodiplodinenona.

Se obtuvo un valor de poder rotatorio $[\alpha]_D^{25} = +9.0^\circ$ (c 0.67, CHCl_3) y la configuración absoluta se asignó mediante el valor de la constante de acoplamiento del protón en posición 2 ($J = 5.1$ Hz), indicando una relación *cis* entre los H-2 y H-3²¹⁴ y mediante las correlaciones NOESY observadas (Fig 135); δ 3.11 (H-4, H-4') y 2.57 (H-3) que confirman que estos protones están en el mismo plano. Así pues la configuración absoluta de esta molécula se puede establecer como (2S, 3R, 4S, 4'R).

A la vista de la discusión realizada, se ha propuesto la siguiente estructura (Fig 131) para FVI/7-5, aislada por primera vez a partir de fuentes naturales y ha sido denominada **(+) 2-epi-botryodiplodinenona**.

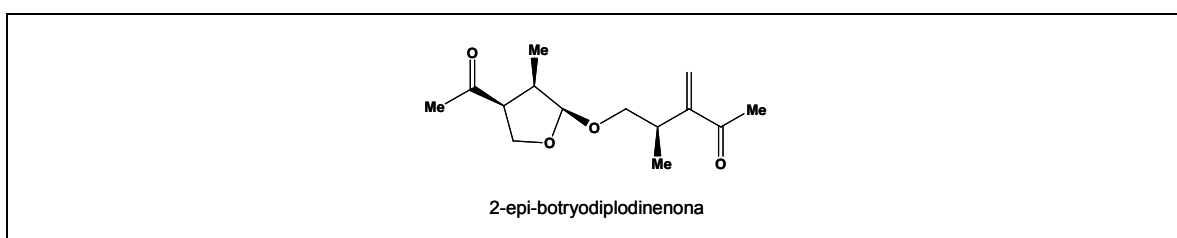


Fig 131. Estructura de FVI/7-5 ((+) 2-epi-botryodiplodinenona)

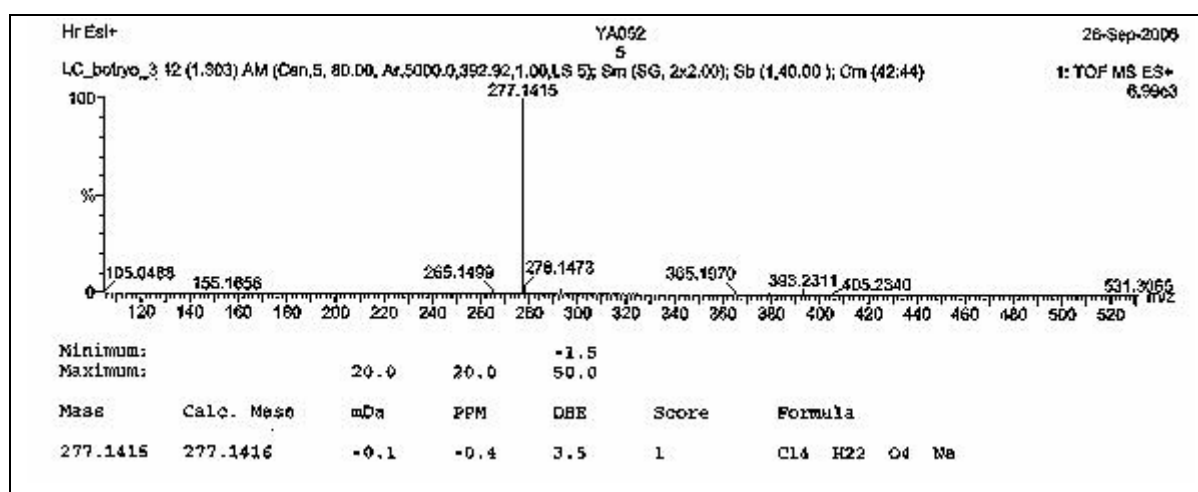
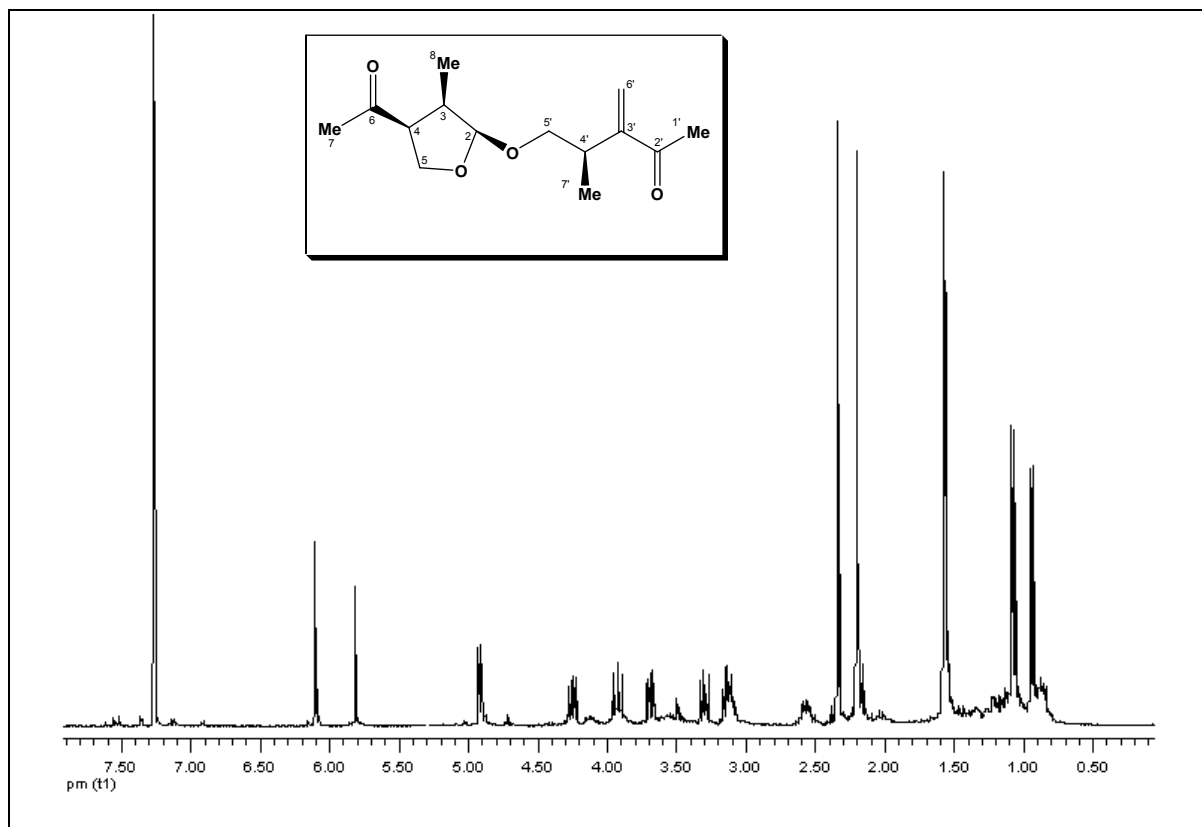
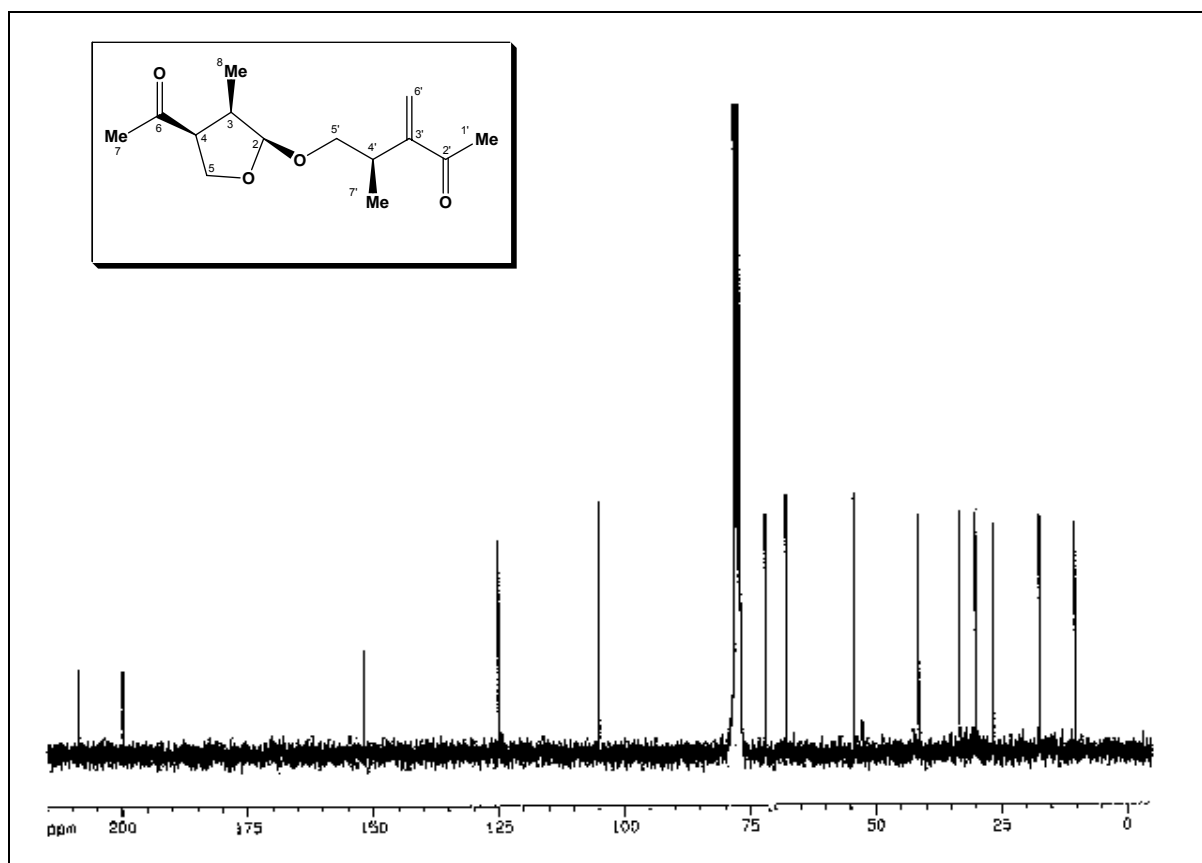


Fig 132. ESMS de FVI/7-5 ((+) 2-epi-botryodiplodinenona)

	δ_H (<i>mult</i> , J en Hz)	δ_C (<i>mult</i> , DEPT)	Correlación 1H - 1H (COSY)	Correlación 1H - ^{13}C (HMBC)
2	4.91 (<i>d</i> , 5.1)	105.01 (CH)	2.57 (H-3)	4.25 (CH _{2a} -5), 3.92 (CH _{2b} -5), 3.69 (CH _{2a} -5'), 3.30 (CH _{2b} -5'), 3.11 (H-4), 0.93(CH ₃ -8)
3	2.57 (<i>m</i>)	41.41 (CH)	4.91 (H-2), 3.11 (H-4), 0.93 (CH ₃ -8)	4.91 (H-2), 4.25 (CH _{2a} -5), 3.92 (CH _{2b} -5), 3.11 (H-4), 0.93 (CH ₃ -8)
4	3.11 (<i>m</i>)	54.26 (CH)	4.25 (CH _{2a} -5), 3.92 (CH _{2b} -5), 2.57 (H-3)	4.91 (H-2), 4.25 (CH _{2a} -5), 3.92 (CH _{2b} -5), 2.57 (H-3), 2.20 (CH ₃ -7), 0.93 (CH ₃ -8)
5	4.25 (<i>dd</i> , 9.0, 6.3) 3.92 (<i>dd</i> , 9.0, 7.8)	67.73 (CH ₂)	3.92 (CH _{2b} -5), 3.11 (H-4) 4.25 (CH _{2a} -5), 3.11 (H-4)	4.91 (H-2), 3.11 (H-4)
6	-	208.57 (C)	-	4.25 (CH _{2a} -5), 3.92 (CH _{2b} -5), 3.11 (H-4), 2.20 (CH ₃ -7)
7	2.20 (<i>s</i>)	30.05 (CH ₃)	-	-
8	0.93 (<i>d</i> , 7.2)	10.25 (CH ₃)	2.57 (H-3)	3.11 (H-4), 2.57 (H-3)
1'	2.34 (<i>s</i>)	26.53 (CH ₃)	-	-
2'	-	199.92 (C)	-	6.09 (CH _{2a} -6'), 5.81 (CH _{2b} -6'), 3.11 (H-4'), 2.34 (CH ₃ -1')
3'	-	151.74 (C)	-	6.09 (CH _{2a} -6'), 5.81 (CH _{2b} -6'), 3.69 (CH _{2a} -5'), 3.30 (CH _{2b} -5'), 3.11 (H-4'), 2.34 (CH ₃ -1), 1.07 (CH ₃ -7')
4'	3.11 (<i>m</i>)	33.20 (CH)	3.69 (CH _{2a} -5'), 3.30 (CH _{2b} -5'), 1.07 (CH ₃ -7')	6.09 (CH _{2a} -6'), 5.81 (CH _{2b} -6), 3.69 (CH _{2a} -5'), 3.30 (CH _{2b} -5'), 1.07 (CH ₃ -7')
5'	3.69 (<i>dd</i> , 9.3, 6.0) 3.30 (<i>dd</i> , 9.3, 6.0)	71.88 (CH ₂)	3.30 (CH _{2b} -5'), 3.11 (H-4') 3.69 (CH _{2a} -5'), 3.11 (H-4')	6.09 (CH _{2a} -6'), 5.81 (CH _{2b} -6), 4.91 (H-2), 3.11 (H-4'), 1.07 (CH ₃ -7')
6'	6.09 (<i>s</i>), 5.81 (<i>s</i>)	125.06 (CH ₂)	-	3.11 (H-4'), 2.34 (CH ₃ -1')
7'	1.07 (<i>d</i> , 6.9)	17.28 (CH ₃)	3.11 (H-4')	3.69 (CH _{2a} -5'), 3.30 (CH _{2b} -5'), 3.11 (H-4')

Tabla 19. 1H RMN, ^{13}C RMN, 1H - 1H (COSY) y 1H - ^{13}C (HMBC) de FVI/7-5 ((+) 2-epi-botryodiplodinenona) en $CDCl_3$

Fig 133. ¹H RMN 300 MHz de FVI/7-5 ((+)-2-epi-botryodiplodinona) en CDCl₃Fig 134. ¹³C RMN 75 MHz de FVI/7-5 ((+)-2-epi-botryodiplodinona) en CDCl₃

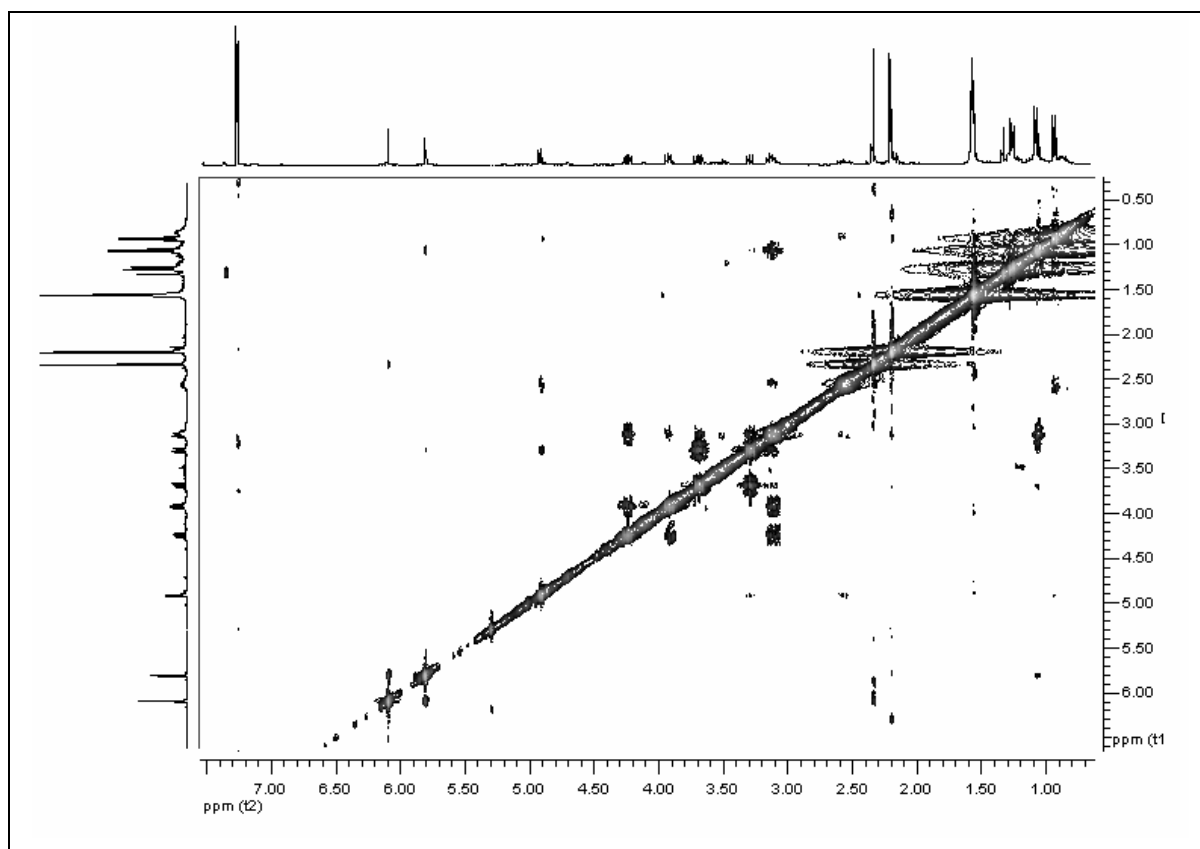


Fig 135. NOESY 300 MHz de FVI/7-5 ((+)-2-epi-botryodiplodinona) en CDCl_3

Identificación del compuesto FVI/8-5

El espectro de masas mediante la técnica de ionización por electro-spray de alta resolución presenta un pico molecular m/z 293.1360 $[(M+\text{Na})^+]$ que corresponde a la fórmula molecular $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}_5$ (Fig 137).

El espectro de ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) (Fig 138) muestra las siguientes señales: δ 5.03 (1H, *brs*, H-2), 4.28 (1H, *t*, $J=8.7$, H-5a), 3.93 (1H, *t*, $J=8.7$, H-5b), 3.54 (1H, *m*, H-4), 2.55 (1H, *m*, H-3), 2.19 (3H, *s*, CH_3 -7) y 0.86 (3H, *d*, $J=7.2$, CH_3 -8) ppm.

El espectro de ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3) (Fig 139) muestra las siguientes señales: δ 206.19 (C-6), 105.42 (C-2), 67.09 (C-5), 53.39 (C-4), 41.93 (C-3), 30.23 (C-7) y 12.42 (C-8) ppm.

Se obtuvo un valor de poder rotatorio $[\alpha]_D^{25} = -99.10^\circ$ (c 3.35, CHCl_3) y la configuración relativa se asignó tanto mediante las correlaciones NOESY observadas (Fig 140); δ 3.54 (H-4) y 2.55 (H-3); δ 5.03 (H-2) y 0.86 (CH_3 -8), como mediante el valor de la constante de acoplamiento del protón en posición 2 ($J = 0$ Hz) indicando una relación *trans* entre los H-2 y H-3²¹⁴.

Los datos espectroscópicos indican que el compuesto FVI/8-5 es el (-) **dímero de botryodiplodin**, compuesto aislado por primera vez a partir de fuentes naturales (Fig 136). Su estructura se confirmó con los experimentos de dos dimensiones (COSY ^1H - ^1H , HSQC y HMBC).

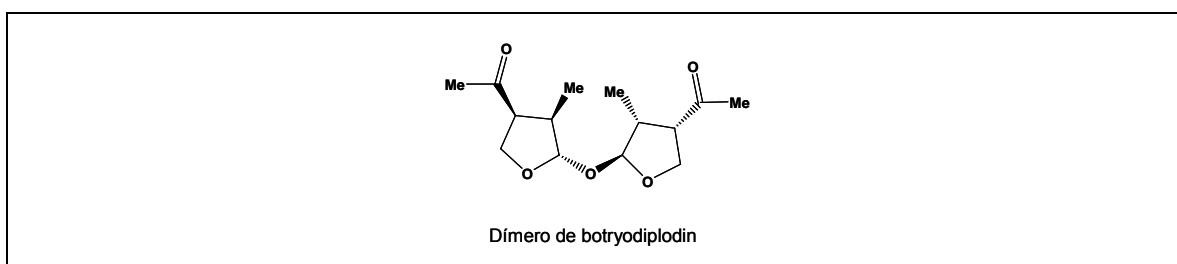


Fig 136. Estructura de FVI/8-5 ((-) dímero de botryodiplodin)

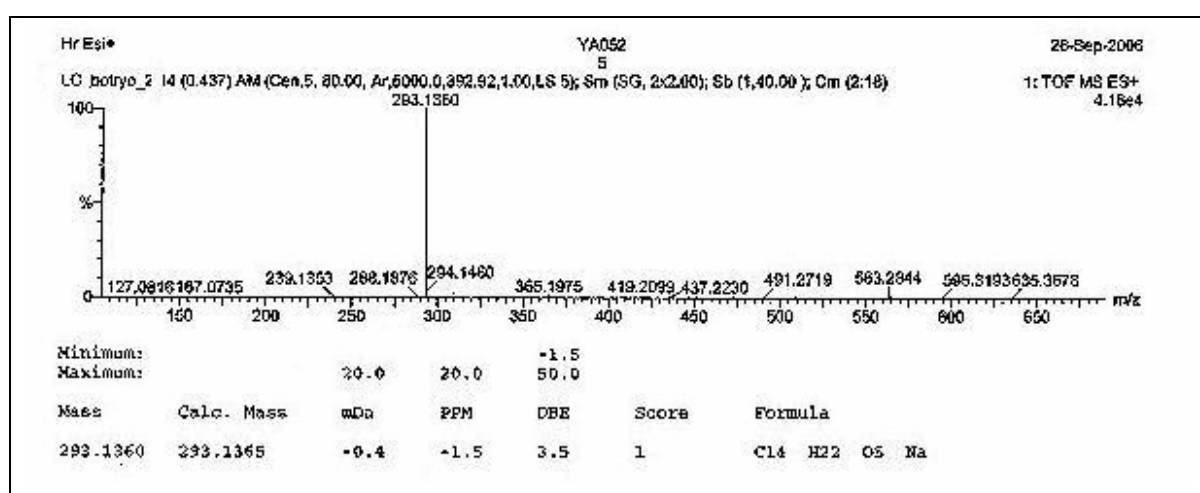
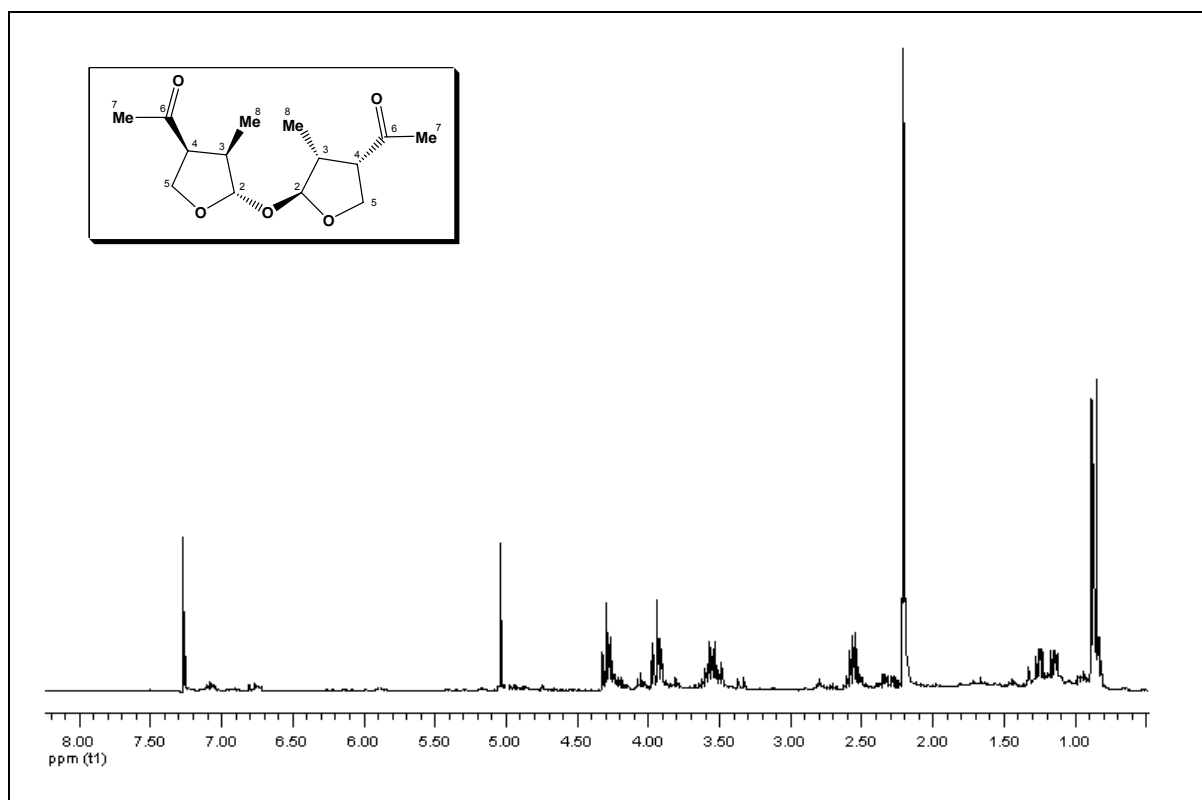
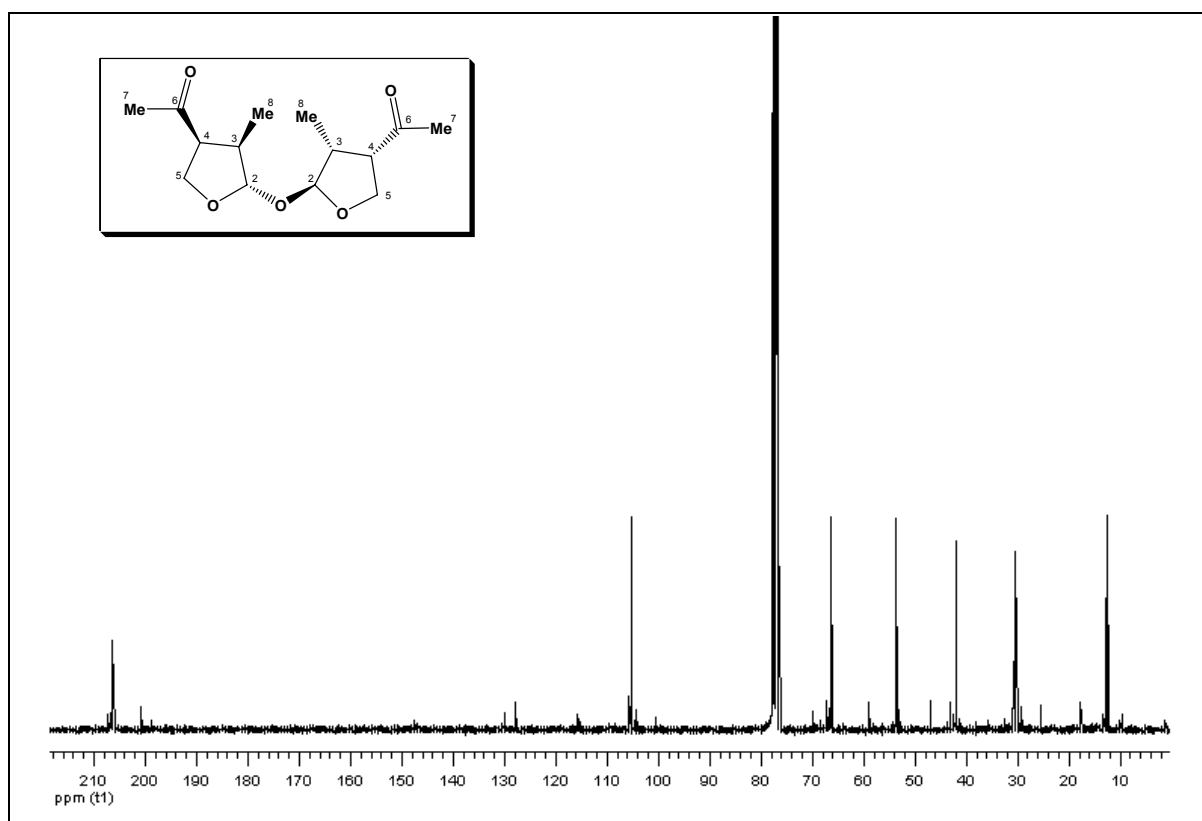


Fig 137. ESHRMS de FVI/8-5 ((-) dímero de botryodiplodin)

Fig 138. ¹H RMN 300 MHz de FVI/8-5 ((-) dímero de botryodiplodin) en CDCl₃Fig 139. ¹³C RMN 75 MHz de FVI/8-5 ((-) dímero de botryodiplodin) en CDCl₃

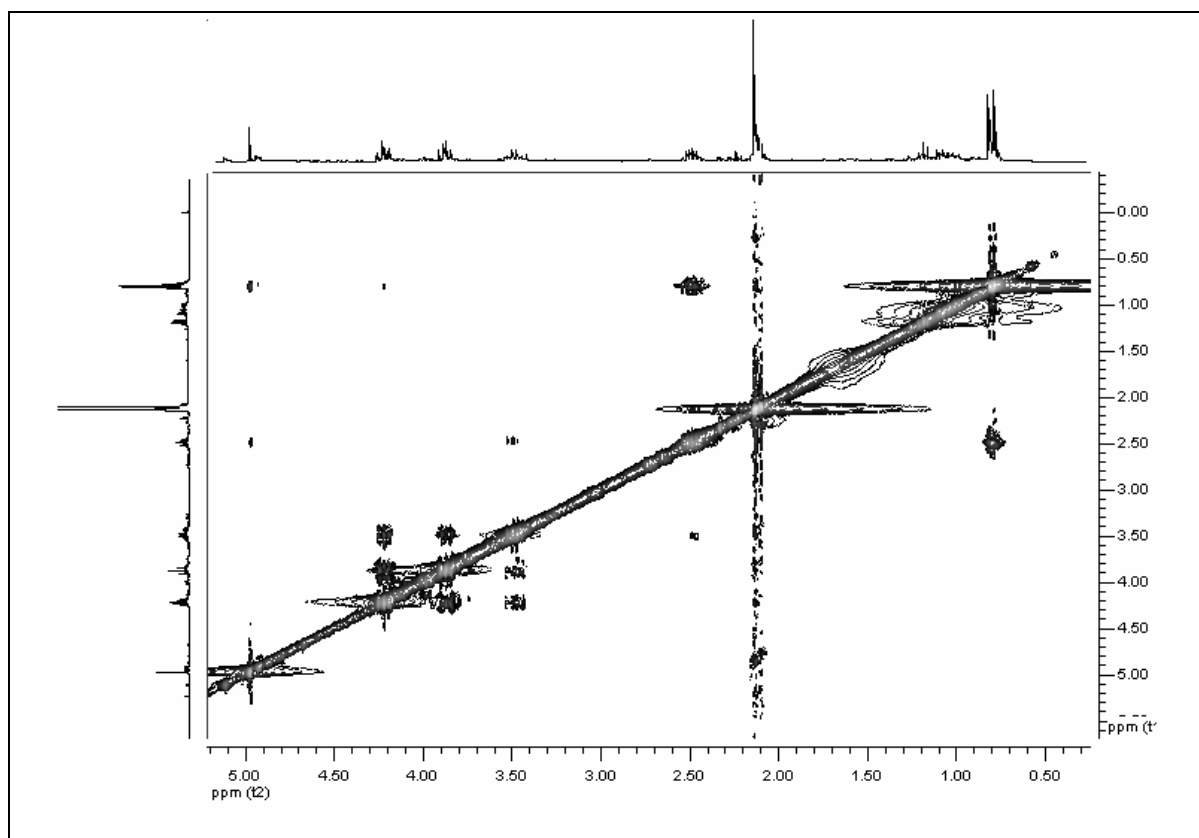


Fig 140. NOESY 300 MHz de FVI/8-5 ((-) dímero de botryodiplodin) en CDCl_3

4.6 Actividades biológicas de los compuestos puros aislados

4.6.1. Actividad insecticida frente a *Oncopeltus fasciatus*

A partir de la fracción III de *P. coalescens* (CECT 2764) y la fracción IX de *P. coalescens* (CECT 2766), que mostraron actividad insecticida frente a *Oncopeltus fasciatus*, se aisló el compuesto botryodiplodin y se procedió a la realización de los ensayos de actividad entomotóxica según el apartado 2.5 de Material y métodos. El botryodiplodin mostró una DL_{50} 5.497 $\mu\text{g}/\text{ninfa}$ (5.127, 5.867) frente a *O. fasciatus*. En la tabla 20 se muestran los resultados obtenidos para algunos análogos del botryodiplodin aislados a partir de *P. coalescens* en los ensayos insecticidas por aplicación t pica frente a *O. fasciatus*. El compuesto botryodiplodin acetilado, se obtuvo mediante la acetilación del botryodiplodin de origen natural y el resto de análogos no fueron ensayados porque las fracciones de las que provenían no mostraron mortalidad aguda frente al hemíptero.

Compuestos	DL_{50} (95%LC) ^a
Botryodiplodin	5.497 (5.127, 5.867)
Botryodiplodin acetilado	12.667 (11.891, 13.443)
Botryodiplodin dímero	> 15.000
Botryodiplodinenone	> 15.000

^a Valores en $\mu\text{g}/\text{ninfa}$

Tabla 20. Actividad insecticida de análogos de botryodiplodin aislados en *P. coalescens*

De los compuestos estudiados, el más activo es el botryodiplodin, seguido por el botryodiplodin acetilado que necesita aproximadamente el doble de concentración para matar al 50% de la población. Sin embargo, tanto el botryodiplodin dímero como la botryodiplodinenona muestran una DL_{50} superior a 15 $\mu\text{g}/\text{ninfa}$.

Hasta el momento no se había descrito esta actividad insecticida en la conocida micotoxina por lo que su mecanismo de acción es todavía desconocido, aunque parece esencial para su actividad el OH libre que posee el botryodiplodin, ya que al acetilarlo pierde la mitad de su potencia.

4.6.2. Actividad insecticida frente a *Ceratitis capitata*

A partir de la fracción III de *P. coalescens* (CECT 2764) y la fracción IX de *P. coalescens* (CECT 2766), que mostraron actividad insecticida frente a *Ceratitis capitata*, se aisló el compuesto botryodiplodin y se procedió a la realización de los ensayos de actividad entomotóxica según el apartado 2.5 de Material y métodos. Botryodiplodin mostró una DL_{50} de 12.907 $\mu\text{g}/\text{mosca}$ (12.312, 13.502) frente a la mosca de la fruta *C. capitata* a igualdad de sexos, pero se observa un 100% de mortalidad en machos, es decir el 50% de la población muerta observada se trata de machos. Se desconocía hasta el momento que este compuesto poseía esta importante actividad.

A partir de la fracción FI/D de *P. coalescens* (CECT 2764) que mostró un $94.29\% \pm 1.14$ de reducción de la fertilidad en *C. capitata*, se aislaron los compuestos botryodioxinenone y etoxifenil-botryodiplodin. Ambos compuestos junto con el resto de las subfracciones están bajo estudio a la espera de resultados.

4.6.3. Actividad fungicida

A partir de la fracción IX de *P. coalescens* (CECT 2766), que mostró actividad fungicida, se aisló el compuesto botryodiplodin y se realizó el ensayo fungicida frente a *Verticillium dahliae*, mediante la inclusión de las esporas en el medio de cultivo (PDA) y la aplicación de la muestra mediante discos, según el apartado 2.2 de Material y métodos. A una dosis de 0.25 $\mu\text{g}/\text{disco}$ botryodiplodin no mostró actividad fungicida frente al hongo ensayado, mientras que el benomilo que se utilizó como control positivo a la misma dosis, mostró un halo de inhibición de 17 mm de diámetro. Sin embargo, ensayándolo a una dosis de 0.2 mg /disco frente a *V. dahliae* presentó un 100% de eficacia, por tanto botryodiplodin es el responsable de la actividad fungicida inicial del extracto aunque su potencia frente a *V. dahliae* no es comparable con la del benomilo.

4.6.4. Actividad bactericida

A partir de la fracción IX de *P. coalescens* (CECT 2766), que mostró actividad bactericida, se aisló el compuesto botryodiplodin. Se sometió a los ensayos bactericidas frente a *S. aureus* y *S. typhii*, según el apartado 2.3 de Material y métodos y se demostró que este compuesto era el responsable de la actividad bactericida del extracto fúngico inicial, tal y como se describe en

bibliografía²⁰⁹. En este caso, botryodiplodin mostró una actividad bactericida del 50 % frente a *S. aureus* y del 67% frente a *S. typhii* respecto al clorhidrato de tetraciclina que se utilizó como control positivo.

CONCLUSIONES

[05]

Estudio del extracto orgánico del caldo de *Aspergillus ochraceus* Wilhelm

1. A partir del extracto del caldo de *A. ochraceus*, que mostró actividad citostática, se han aislado cuatro compuestos: stephacidin A, circumdatin E, circumdatin H y flavacol, siendo el primero de ellos el responsable de dicha actividad. Todas estas moléculas habían sido aisladas previamente en esta misma especie, con excepción de circumdatin H que es la primera vez que se describe en la naturaleza.

2. Estos cuatro compuestos son inhibidores de la cadena respiratoria mitocondrial en células de mamíferos a nivel micromolar. El más activo de ellos es circumdatin H con una CI_{50} de $1.5 \pm 0.1 \mu M$.

Estudio del extracto orgánico del caldo de *Penicillium cluniae* Quintanilla

3. A partir del extracto del caldo de *P. cluniae*, que mostró actividad citostática e insecticida frente a *Oncopeltus fasciatus* Dallas, se han aislado trece compuestos. Uno de ellos es brefeldin A, cinco pertenecen al grupo de las diketopiperazinas: *ciclo*-(L-Pro-L-Tyr), *ciclo*-(L-Pro-L-Val), *ciclo*-(L-Pro-L-Ileu), *ciclo*-(L-Pro-L-Leu) y *ciclo*-(L-Pro-L-Phe) y los siete restantes pertenecen a la familia de las paraherquamidas: VM55596, PHQ-I, PHQ-H, PHQ-A, PHQ-B, PHQ-E y VM55597. Ninguna de estas moléculas habían sido aisladas en *P. cluniae* anteriormente, aunque sí en otras especies, exceptuando PHQ-H y PHQ-I que son descritas por primera vez en la literatura.

4. Brefeldin A es el causante de la actividad citostática con una CI_{50} de $0.5 \mu g/mL$, mientras que las paraherquamidas lo son de la actividad insecticida, destacando la PHQ-E con una DL_{50} de $0.089 \mu g/ninfa$ ($0.086, 0.092$).

Estudio del extracto orgánico del caldo de *Penicillium coalescens* Quintanilla

5. Se han estudiado dos cepas distintas de *P. coalescens*, CECT-2764 y CECT-2766, que destacaron en los ensayos preliminares por su actividad insecticida, siendo el botryodiplodin el compuesto que ocasiona esta actividad. En la cepa CECT-2764 botryodiplodin se encontraba en un 0.49 % respecto al extracto del caldo seco, mientras que en la cepa CECT-2766 el rendimiento fue del 18.52%, por lo que la segunda cepa, además de mostrar actividad insecticida, también destacó por su actividad fungicida y bactericida propia del botryodiplodin. Además de esta micotoxina se han aislado seis nuevos análogos estructurales no descritos en literatura hasta el momento: botryodioxinenona, etoxifenil-botryodiplodin, botryodiplodinenona, botryodioxindinenona, 2-epi-botryodiplodinenona y el dímero de botryodiplodin, así como una dipirroloquinona, conocida como terreusinona, no descrita en esta especie.

6. Botryodiplodin muestra actividad insecticida frente a *O. fasciatus* con una DL_{50} de $5.497 \mu g/ninfa$ ($5.127, 5.867$), mientras que frente a *C. capitata* la DL_{50} es de $12.907 \mu g/ninfa$ ($12.312,$

13.502) a igualdad de sexos, pero se observa un 100% de mortalidad en machos. Posee un 100% de eficacia como antifúngico frente a *Verticillium dahliae* a una dosis de 0.2 mg /disco respecto al benomilo que se utilizó como control positivo (0.25 µg/disco) y un 50% de eficacia como antibacteriano a una dosis de 0.2 mg /disco frente a *Staphilococcus aureus* y un 67% frente a *Salmonella typhi* usando el clorhidrato de tetraciclina como control positivo a la misma dosis.

BIBLIOGRAFÍA**[06]**

1. Gil Ruiz, P. *Productos naturales.*, 1ª ed. Universidad Politécnica de Navarra; **2002**.
2. Pandey, R. C. Prospecting for potentially new pharmaceuticals from natural sources. *Medicinal Research Reviews* **1998**, 18 (5), 333-346.
3. Villar del Fresno, A. *Farmacognosia General*, 1ª ed. Editorial Síntesis; Madrid, **1999**.
4. Bentley, R. Secondary metabolite biosynthesis: The first century. *Critical Reviews in Biotechnology* **1999**, 19 (1), 1-40.
5. Clark, A. M. Natural products as a resource for new drugs. *Pharmaceutical Research* **1996**, 13 (8), 1133-1141.
6. Bindseil, K. U.; Jakupovic, J.; Wolf, D.; Lavayre, J.; Leboul, J.; and van der Pyl, D. Pure compound libraries; a new perspective for natural product based drug discovery. *Drug Discovery Today* **2001**, 6 (16), 840-847.
7. Clardy, J. and Walsh, C. Lessons from natural molecules. *Nature* **2004**, 432 (7019), 829-837.
8. Bruneton J. *Farmacognosia: Fitoquímica y Plantas Medicinales*, 2ª ed. Acribia; Zaragoza, **2001**.
9. Butler, M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. *Journal of Natural Products* **2004**, 67 (12), 2141-2153.
10. Shu, Y. Z. Recent natural products based drug development: A pharmaceutical industry perspective. *Journal of Natural Products* **1998**, 61 (8), 1053-1071.
11. Peng, J. N.; Shen, X. Y.; El Sayed, K. A.; Dunbar, D. C.; Perry, T. L.; Wilkins, S. P.; and Hamann, M. T. Marine natural products as prototype agrochemical agents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2003**, 51 (8), 2246-2252.
12. Regnault-Roger C.; Philogène B.; and Vincent C. *Biopesticidas de origen vegetal*, 1ª ed. Ediciones Mundi-Prensa; Madrid, **2003**.
13. Crombie, L. and Whiting, D. A. Biosynthesis in the rotenoid group of natural products: Applications of isotope methodology. *Phytochemistry* **1998**, 49 (6), 1479-1507.
14. Pimo-Yúfera, E. and Carrasco, J. M. *Química agrícola II: Plaguicidas y fitorreguladores*, 1ª ed. Alhambra Longman S.A.,M.; **1990**.
15. Crouse, G. D. Pesticide leads from nature. *Chemtech* **1998**, 28 (11), 36-45.
16. Dhadialla, T. S.; Carlson, G. R.; and Le, D. P. New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity. *Annual Review of Entomology* **1998**, 43, 545-569.
17. Thompson, H. M.; Wilkins, S.; Battersby, A. H.; Waite, R. J.; and Wilkinson, D. The effects of four insect growth-regulating (IGR) insecticides on honeybee (*Apis mellifera* L.) colony development, queen rearing and drone sperm production. *Ecotoxicology* **2005**, 14 (7), 757-769.
18. Tatarazako, N.; Oda, S.; Watanabe, H.; Morita, M.; and Iguchi, T. Juvenile hormone agonists affect the occurrence of male Daphnia. *Chemosphere* **2003**, 53 (8), 827-833.
19. Grenier, S. and Grenier, A. M. Fenoxycarb, A Fairly New Insect Growth-Regulator - A Review of Its Effects on Insects. *Annals of Applied Biology* **1993**, 122 (2), 369-403.

20. Ishiguro, H.; Fujita, N.; Kim, I. H.; Shiotsuki, T.; and Kuwano, E. Ethyl 4-[2-(6-methyl-3-pyridyloxy)butyloxy]benzoate, a novel anti-juvenile hormone agent. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **2003**, *67* (9), 2045-2047.
21. Bowers, W. S.; Ohta, T.; Cleere, J. S.; and Marsella, P. A. Discovery of Insect Anti-Juvenile Hormones in Plants. *Science* **1976**, *193* (4253), 542-547.
22. Szczepanik, M.; Obara, R.; Szumny, A.; Gabrys, B.; Halarewicz-Pacan, A.; Nawrot, J.; and Wawrzenczyk, C. Synthesis and insect antifeedant activity of precocene derivatives with lactone moiety. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, *53* (15), 5905-5910.
23. Moya, P.; Castillo, M.; Primo Yufera, E.; Couillaud, F.; Martinez Mañez, R.; Garcera, M. D.; Miranda, M. A.; Primo, J.; and Martinez Pardo, R. Brevioxime: A new juvenile hormone biosynthesis inhibitor isolated from *Penicillium brevicompactum*. *Journal of Organic Chemistry* **1997**, *62* (24), 8544-8545.
24. Dinan, L. Phytoecdysteroids: biological aspects. *Phytochemistry* **2001**, *57* (3), 325-339.
25. Tomlin, C. *The pesticide manual*, 10 ed. British Crop Protection Council and The Royal Society of Chemistry; Clive Tomlin; United Kingdom, **1994**.
26. Smagghe, G.; Auda, M.; VanLaecke, K.; and Degheele, D. Significance of penetration and metabolism on topical toxicity of diflubenzuron in *Spodoptera littoralis* and *Spodoptera exigua*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **1997**, *82* (3), 255-260.
27. Navarro-Llopis, V.; Sanchis-Cabanes, J.; Ayala, I.; Casaña-Giner, V.; and Primo-Yufera, E. Efficacy of lufenuron as chemosterilant against *Ceratitis capitata* in field trials. *Pest Management Science* **2004**, *60* (9), 914-920.
28. Kubo, I.; Uchida, M.; and Klocke, J. A. An Insect Ecdysis Inhibitor from the African Medicinal Plant, *Plumbago capensis* (*Plumbaginaceae*) - A Naturally-Occurring Chitin Synthetase Inhibitor. *Agricultural and Biological Chemistry* **1983**, *47* (4), 911-913.
29. Guerrero A. and Bellés X. *Feromonas sexuales de insectos/ insecticidas biorracionales*, 1ª ed. CSIC, Madrid, **1988**. pp 271-296.
30. Howse, P.E. Insect semiochemicals and communication. In *Insect pheromones and their use in pest management*. 1ª ed Howse, P. E., Stevens, I., and Jones, O. Eds. United Kingdom, **1998**. pp 1-130.
31. Adel, M. M.; Sehnal, F.; and Jurzysta, M. Effects of alfalfa saponins on the moth *Spodoptera littoralis*. *Journal of Chemical Ecology* **2000**, *26* (4), 1065-1078.
32. Poplawski, J.; Lozowicka, B.; Dubis, A.; Lachowska, B.; Winiecki, Z.; and Nawrot, J. Feeding-deterrent activity of alpha-asarone isomers against some stored Coleoptera. *Pest Management Science* **2000**, *56* (6), 560-564.
33. Morimoto, M.; Fujii, Y.; and Komai, K. Antifeedants in *Cyperaceae*: coumaran and quinones from *Cyperus* spp. *Phytochemistry* **1999**, *51* (5), 605-608.
34. Singh, S. and Singh, R. P. Neem (*Azadirachta indica*) seed kernel extracts and azadirachtin as oviposition deterrents against the melon fly (*Bactrocera cucurbitae*) and the oriental fruit fly (*Bactrocera dorsalis*). *Phytoparasitica* **1998**, *26* (3), 191-197.
35. Coracini, M.; Bengtsson, M.; Liblikas, I.; and Witzgall, P. Attraction of codling moth males to apple volatiles. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **2004**, *110* (1), 1-10.
36. Omolo, M. O.; Okinyo, D.; Ndiege, I. O.; Lwande, W.; and Hassanali, A. Repellency of essential oils of some Kenyan plants against *Anopheles gambiae*. *Phytochemistry* **2004**, *65* (20), 2797-2802.

37. Naumann, K. Research into fluorinated pyrethroid alcohols - an episode in the history of pyrethroid discovery. *Pesticide Science* **1998**, *52* (1), 3-20.
38. Yang, R. Z. and Tang, C. S. Plants Used for Pest-Control in China - A Literature-Review. *Economic Botany* **1988**, *42* (3), 376-406.
39. Bohnenstengel, F. I.; Wray, V.; Witte, L.; Srivastava, R. P.; and Proksch, P. Insecticidal meliacarpins (C-seco limonoids) from *Melia azedarach*. *Phytochemistry* **1999**, *50* (6), 977-982.
40. Simmonds, M. S. J.; Blaney, W. M.; Ley, S. V.; Anderson, J. C.; Banteli, R.; Denholm, A. A.; Green, P. C. W.; Grossman, R. B.; Gutteridge, C.; Jennens, L.; Smith, S. C.; Toogood, P. L.; and Wood, A. Behavioral and Neurophysiological Responses of *Spodoptera littoralis* to Azadirachtin and A Range of Synthetic Analogs. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **1995**, *77* (1), 69-80.
41. Nathan, S. S.; Kalaivani, K.; and Murugan, K. Effects of neem limonoids on the malaria vector *Anopheles stephensi* Liston (Diptera : *Culicidae*). *Acta Tropica* **2005**, *96* (1), 47-55.
42. Nugroho, B. W.; Gussregen, B.; Wray, V.; Witte, L.; Bringmann, G.; and Proksch, P. Insecticidal rocaglamide derivatives from *Aglaia elliptica* and *A. harmsiana*. *Phytochemistry* **1997**, *45* (8), 1579-1585.
43. Pavela, R. Insecticidal activity of some essential oils against larvae of *Spodoptera littoralis*. *Fitoterapia* **2005**, *76* (7-8), 691-696.
44. Pascual-Villalobos, M. J. and Ballesta-Acosta, M. C. Chemical variation in an *Ocimum basilicum* germplasm collection and activity of the essential oils on *Callosobruchus maculatus*. *Biochemical Systematics and Ecology* **2003**, *31* (7), 673-679.
45. Douglas, M. H.; van Klink, J. W.; Smallfield, B. M.; Perry, N. B.; Anderson, R. E.; Johnstone, P.; and Weavers, R. T. Essential oils from New Zealand manuka: triketone and other chemotypes of *Leptospermum scoparium*. *Phytochemistry* **2004**, *65* (9), 1255-1264.
46. Dayan, F. E.; Romagni, J. G.; and Duke, S. O. Investigating the mode of action of natural phytotoxins. *Journal of Chemical Ecology* **2000**, *26* (9), 2079-2094.
47. Crombie, L. Natural product chemistry and its part in the defence against insects and fungi in agriculture. *Pesticide Science* **1999**, *55* (8), 761-774.
48. Bell E.A.; Fellows, L.E.; and Simmonds, M.S.J. Natural Products from plants for the control of insects pests. In *Safer insecticides, developments and use*. 1^a ed. Hodgson, E. and Kuhr, R. J. Eds. New York, **1990**. pp 337-350.
49. Primo-Yúfera, E. *Ecología Química. Nuevos métodos de lucha contra insectos.*, 1^a ed. Banco de Crédito y Ahorro de Valencia and Multiprensa; Valencia, **1991**.
50. Warrior, P. Living systems as natural crop-protection agents. *Pest Management Science* **2000**, *56* (8), 681-687.
51. Boulter, D. Insect Pest-Control by Copying Nature Using Genetically-Engineered Crops. *Phytochemistry* **1993**, *34* (6), 1453-1466.
52. Albersschonberg, G.; Arison, B. H.; Chabala, J. C.; Douglas, A. W.; Eskola, P.; Fisher, M. H.; Lusi, A.; Mrozik, H.; Smith, J. L.; and Tolman, R. L. Avermectins - Structure Determination. *Journal of the American Chemical Society* **1981**, *103* (14), 4216-4221.
53. Fisher, M. H.; Chabala, J. C.; Mrozik, H.; Egerton, J. R.; Blair, L. S.; and Campbell, W. C. Ivermectin, A New Broad-Spectrum Antiparasitic Agent. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* **1981**, *182* (AUG), 24-SORT.

54. Ishaaya, I.; Kontsedalov, S.; and Horowitz, A. R. Emamectin, a novel insecticide for controlling field crop pests. *Pest Management Science* **2002**, *58* (11), 1091-1095.
55. Sparks, T. C.; Crouse, G. D.; and Durst, G. Natural products as insecticides: the biology, biochemistry, and quantitative structure-activity relationships of spinosyns and spinosoids. *Pest Management Science* **2001**, *57* (10), 896-905.
56. Florent, J. Los mohos. In *Microbiología industrial. Los microorganismos de interés industrial*. Leveau, J. Y. and Bouix, M. 1^a ed. Acribia, Zaragoza, **2000**. pp 109-157.
57. Nielsen, K. F. and Smedsgaard, J. Fungal metabolite screening: database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardised liquid chromatography-UV-mass spectrometry methodology. *Journal of Chromatography A* **2003**, *1002* (1-2), 111-136.
58. Baker, D. D. and Alvi, K. A. Small-molecule natural products: new structures, new activities. *Current Opinion in Biotechnology* **2004**, *15* (6), 576-583.
59. Hawksworth, D. L. The Fungal Dimension of Biodiversity - Magnitude, Significance, and Conservation. *Mycological Research* **1991**, *95*, 641-655.
60. Wainwright, M. Introducción. In *Introducción a la biotecnología de los hongos*. 1^a ed. Acribia, Zaragoza, **1995**. pp 1-29.
61. Torres, M.; Balcells, M.; Sala, N.; Sanchis, V.; and Canela, R. Bactericidal and fungicidal activity of *Aspergillus ochraceus* metabolites and some derivatives. *Pesticide Science* **1998**, *53* (1), 9-14.
62. Samson, R. A. and Frisvad, J. C. *Penicillium* subgenus *Penicillium*: new taxonomic schemes, mycotoxins and other extrolites. *Studies in Mycology* **2005**, *49*.
63. Kodaira, Y. Studies on New Toxic Substances to Insects, Destruxin A and B, Produced by *Oospora destructor* .1. Isolation and Purification of Destruxin A and B. *Agricultural and Biological Chemistry* **1962**, *26* (1), 36-&.
64. Soledade, M.; Pedras, C.; Zaharia, L. I.; and Ward, D. E. The destruxins: synthesis, biosynthesis, biotransformation, and biological activity. *Phytochemistry* **2002**, *59* (6), 579-596.
65. Gupta, S.; Montllor, C.; and Hwang, Y. S. Isolation of Novel Beauvericin Analogs from the Fungus *Beauveria bassiana*. *Journal of Natural Products* **1995**, *58* (5), 733-738.
66. Elsworth, J. F. and Grove, J. F. Cyclodepsipeptides from *Beauveria bassiana* .2. Beauverolides-A to Beauverolides-F and Their Relationship to Isarolide. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1* **1980**, (8), 1795-1799.
67. Suzuki, A.; Kanaoka, M.; Isogai, A.; Murakoshi, S.; Ichinoe, M.; and Tamura, S. Bassianolide - New Insecticidal Cyclodepsipeptide from *Beauveria bassiana* and *Verticillium lecanii*. *Tetrahedron Letters* **1977**, (17), 2167-2170.
68. Herrmann, M.; Zocher, R.; and Haese, A. Enniatin production by *Fusarium* strains and its effect on potato tuber tissue. *Applied and Environmental Microbiology* **1996**, *62* (2), 393-398.
69. Gupta, S.; Krasnoff, S. B.; Roberts, D. W.; Renwick, J. A. A.; Brinen, L. S.; and Clardy, J. Structures of the Efraeptins - Potent Inhibitors of Mitochondrial ATPase from the Fungus *Tolypocladium niveum*. *Journal of the American Chemical Society* **1991**, *113* (2), 707-709.
70. Belofsky, G. N.; Gloer, J. B.; Wicklow, D. T.; and Dowd, P. F. Shearamide A: A new cyclic peptide from the ascostromata of *Eupenicillium shearii*. *Tetrahedron Letters* **1998**, *39* (31), 5497-5500.

71. Belofsky, G. N.; Gloer, J. B.; Wicklow, D. T.; and Dowd, P. F. Antiinsectan Alkaloids - Shearinines-A-C and A New Paxilline Derivative from the Ascostromata of *Eupenicillium shearii*. *Tetrahedron* **1995**, *51* (14), 3959-3968.
72. Oh, H.; Swenson, D. C.; Gloer, J. B.; Wicklow, D. T.; and Dowd, P. F. Chaetochalasin A: A new bioactive metabolite from *Chaetomium brasiliense*. *Tetrahedron Letters* **1998**, *39* (42), 7633-7636.
73. Claydon, N. and Grove, J. F. Insecticidal Secondary Metabolic Products from the Entomogenous Fungus *Verticillium lecanii*. *Journal of Invertebrate Pathology* **1982**, *40* (3), 413-418.
74. Soman, A. G.; Gloer, J. B.; Angawi, R. F.; Wicklow, D. T.; and Dowd, P. F. Vertilecanins: New phenopicolinic acid analogues from *Verticillium lecanii*. *Journal of Natural Products* **2001**, *64* (2), 189-192.
75. Chen, G. Y.; Lin, Y. C.; Wen, L.; Vrijmoed, L. L. P.; and Jones, E. B. G. Two new metabolites of a marine endophytic fungus (No. 1893) from an estuarine mangrove on the South China Sea coast. *Tetrahedron* **2003**, *59* (26), 4907-4909.
76. Gloer, J. B.; Tepaske, M. R.; Sima, J. S.; Wicklow, D. T.; and Dowd, P. F. Antiinsectan Aflavinine Derivatives from the Sclerotia of *Aspergillus flavus*. *Journal of Organic Chemistry* **1988**, *53* (23), 5457-5460.
77. Tepaske, M. R.; Gloer, J. B.; Wicklow, D. T.; and Dowd, P. F. Aflavazole - A New Antiinsectan Carbazole Metabolite from the Sclerotia of *Aspergillus flavus*. *Journal of Organic Chemistry* **1990**, *55* (18), 5299-5301.
78. Tepaske, M. R.; Gloer, J. B.; Wicklow, D. T.; and Dowd, P. F. Aflavarin and Beta-Aflatrem - New Anti-Insectan Metabolites from the Sclerotia of *Aspergillus flavus*. *Journal of Natural Products* **1992**, *55* (8), 1080-1086.
79. Laakso, J. A.; Gloer, J. B.; Wicklow, D. T.; and Dowd, P. F. Radarin-A, Radarin-B, Radarin-C, and Radarin-D - New Antiinsectan and Cytotoxic Indole Diterpenoids from the Sclerotia of *Aspergillus sulphureus*. *Journal of Organic Chemistry* **1992**, *57* (1), 138-141.
80. Laakso, J. A.; Gloer, J. B.; Wicklow, D. T.; and Dowd, P. F. Sulpinine-A, Sulpinine-B, Sulpinine-C and Secopenitrem-B - New Antiinsectan Metabolites from the Sclerotia of *Aspergillus sulphureus*. *Journal of Organic Chemistry* **1992**, *57* (7), 2066-2071.
81. Staub, G. M.; Gloer, K. B.; Gloer, J. B.; Wicklow, D. T.; and Dowd, P. F. New Paspalinine Derivatives with Antiinsectan Activity from the Sclerotia of *Aspergillus nomius*. *Tetrahedron Letters* **1993**, *34* (16), 2569-2572.
82. Gloer, J. B.; Rinderknecht, B. L.; Wicklow, D. T.; and Dowd, P. F. Nominine - A New Insecticidal Indole Diterpene from the Sclerotia of *Aspergillus nomius*. *Journal of Organic Chemistry* **1989**, *54* (11), 2530-2532.
83. Staub, G. M.; Gloer, J. B.; Wicklow, D. T.; and Dowd, P. F. Aspernomine - A Cytotoxic Antiinsectan Metabolite with A Novel Ring-System from the Sclerotia of *Aspergillus nomius*. *Journal of the American Chemical Society* **1992**, *114* (3), 1015-1017.
84. Oh, H.; Gloer, J. B.; Wicklow, D. T.; and Dowd, P. F. Arenarins A-C: New cytotoxic fungal metabolites from the sclerotia of *Aspergillus arenarius*. *Journal of Natural Products* **1998**, *61* (5), 702-705.
85. Kuriyama, T.; Kakemoto, E.; Takahashi, N.; Imamura, K. I.; Oyama, K.; Suzuki, E.; Harimaya, K.; Yaguchi, T.; and Ozoe, Y. Receptor assay-guided isolation of anti-GABAergic insecticidal alkaloids from a fungal culture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2004**, *52* (12), 3884-3887.

86. Ondeyka, J. G.; Dombrowski, A. W.; Polishook, J. P.; Felcetto, T.; Shoop, W. L.; Guan, Z.; and Singh, S. B. Isolation and insecticidal activity of melleamide from *Aspergillus melleus*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **2003**, *30* (4), 220-224.
87. Hayashi, H.; Nishimoto, Y.; Akiyama, K.; and Nozaki, H. New paralytic alkaloids, asperparalines A, B and C, from *Aspergillus japonicus* JV-23. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **2000**, *64* (1), 111-115.
88. Capon, R. J.; Skene, C.; Stewart, M.; Ford, J.; O'Hair, R. A. J.; Williams, L.; Lacey, E.; Gill, J. H.; Heiland, K.; and Friedel, T. Aspergillicins A-E: five novel depsipeptides from the marine-derived fungus *Aspergillus carneus*. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2003**, *1* (11), 1856-1862.
89. Banks, R. M.; Blanchflower, S. E.; Everett, J. R.; Manger, B. R.; and Reading, C. Novel anthelmintic metabolites from an *Aspergillus* species; the aspergillimides. *Journal of Antibiotics* **1997**, *50* (10), 840-846.
90. Gloer, J. B. Antiinsectan Natural-Products from Fungal Sclerotia. *Accounts of Chemical Research* **1995**, *28* (8), 343-350.
91. Castillo, M. A.; Moya, P.; Cantin, A.; Miranda, M. A.; Primo, J.; Hernandez, E.; and Primo-Yufera, E. Insecticidal, anti-juvenile hormone, and fungicidal activities of organic extracts from different *Penicillium* species and their isolated active components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1999**, *47* (5), 2120-2124.
92. Belofsky, G. N.; Gloer, K. B.; Gloer, J. B.; Wicklow, D. T.; and Dowd, P. F. New p-terphenyl and polyketide metabolites from the sclerotia of *Penicillium raistrickii*. *Journal of Natural Products* **1998**, *61* (9), 1115-1119.
93. Joshi, B. K.; Gloer, J. B.; Wicklow, D. T.; and Dowd, P. F. Sclerotigenin: A new antiinsectan benzodiazepine from the sclerotia of *Penicillium sclerotigenum*. *Journal of Natural Products* **1999**, *62* (4), 650-652.
94. Li, C.; Gloer, J. B.; Wicklow, D. T.; and Dowd, P. F. Thiersinines A and B: Novel antiinsectan indole diterpenoids from a new fungicolous *Penicillium* species (NRRL 28147). *Organic Letters* **2002**, *4* (18), 3095-3098.
95. Dejesus, A. E.; Steyn, P. S.; Vanheerden, F. R.; Vleggaar, R.; Wessels, P. L.; and Hull, W. E. Tremorgenic Myco-Toxins from *Penicillium crustosum* - Isolation of Penitrems A-F and the Structure Elucidation and Absolute-Configuration of Penitrem-A. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1* **1983**, (8), 1847-1856.
96. Gonzalez, M. C.; Lull, C.; Moya, P.; Ayala, I.; Primo, J.; and Yufera, E. P. Insecticidal activity of penitrems, including penitrem G, a new member of the family isolated from *Penicillium crustosum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2003**, *51* (8), 2156-2160.
97. Zhang, Y. C.; Li, C.; Swenson, D. C.; Gloer, J. B.; Wicklow, D. T.; and Dowd, P. F. Novel antiinsectan oxalicine alkaloids from two undescribed fungicolous *Penicillium* spp. *Organic Letters* **2003**, *5* (5), 773-776.
98. Hayashi, H.; Matsumoto, H.; and Akiyama, K. New insecticidal compounds, communesins C, D and E, from *Penicillium expansum* link MK-57. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **2004**, *68* (3), 753-756.
99. Li, C.; Gloer, J. B.; Wicklow, D. T.; and Dowd, P. F. Antiinsectan decaturin and oxalicine analogues from *Penicillium thiersii*. *Journal of Natural Products* **2005**, *68* (3), 319-322.
100. Fayos, J.; Lokensga, D.; and Clardy, J. Structure of Verruculogen, A Tremor Producing Peroxide from *Penicillium verruculosum*. *Journal of the American Chemical Society* **1974**, *96* (21), 6785-6787.

101. Hayashi, H.; Murao, S., and Arai, M. Verruculogen, as a convulsive factor against silkworm, from *Penicillium simplicissimum*. *Chemistry Express* **1991**, 6 (12), 989-992.
102. Polonsky, J.; Merrien, M. A.; Prange, T.; Pascard, C.; and Moreau, S. Isolation and Structure (X-Ray-Analysis) of Marcfortine A, A New Alkaloid from *Penicillium roqueforti*. *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications* **1980**, (13), 601-602.
103. Lee, B. H.; Clothier, M. F.; Dutton, F. E.; Nelson, S. J.; Johnson, S. S.; Thompson, D. P.; Geary, T. G.; Whaley, H. D.; Haber, C. L.; Marshall, V. P.; Kornis, G. I.; McNally, P. L.; Ciadella, J. I.; Martin, D. G.; Bowman, J. W.; Baker, C. A.; Coscarelli, E. M.; Alexander-Bowman; Susan J.; Davis, J. P.; Zinser, E. W.; Wiley, V.; Lipton, M. F.; and Mauragis, M. A. Marcfortine and paraherquamide class of anthelmintics: Discovery of PNU-141962. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2002**, 2 (7), 779-793.
104. Shiono, Y.; Akiyama, K.; and Hayashi, H. New okaramine congeners, okamines J, K, L, M and related compounds, from *Penicillium simplicissimum* ATCC 90288. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **1999**, 63 (11), 1910-1920.
105. Abe, M.; Imai, T.; Ishii, N.; Usui, M.; Okuda, T.; and Oki, T. Quinolactamide, a new quinolone insecticide from *Penicillium citrinum* Thom F 1539. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **2005**, 69 (6), 1202-1205.
106. Yamazaki, M.; Okuyama, E.; Kobayashi, M.; and Inoue, H. The Structure of Paraherquamide, A Toxic Metabolite from *Penicillium paraherquei*. *Tetrahedron Letters* **1981**, 22 (2), 135-136.
107. Ondeyka, J. G.; Goegelman, R. T.; Schaeffer, J. M.; Kelemen, L.; and Zitano, L. Novel Antinematodal and Antiparasitic Agents from *Penicillium charlesii* .1. Fermentation, Isolation and Biological-Activity. *Journal of Antibiotics* **1990**, 43 (11), 1375-1379.
108. Brown, A. G.; Smale, T. C.; King, T. J.; Hasenkamp, R.; and Thompson, R. H. Crystal and Molecular-Structure of Compactin, A New Antifungal Metabolite from *Penicillium brevicompactum*. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1* **1976**, (11), 1165-1173.
109. Birch, A. J. and Wright, J. J. Brevianamides - A New Class of Fungal Alkaloid. *Journal of the Chemical Society D-Chemical Communications* **1969**, (12), 644-&.
110. Belles, X.; Camps, F.; Casas, J.; Lloria, J.; Messeguer, A.; Piulachs, M. D.; and Sanchez, F. J. In vivo and In vitro Effects of Compactin in Liposome Carriers on Juvenile-Hormone Biosynthesis in Adult Females of *Blattella germanica*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **1988**, 32 (1), 1-10.
111. Paterson, R. R. M.; Simmonds, M. J. S.; Kimmelmeier, C.; and Blaney, W. M. Effects of Brevianamide-A, Its Photolysis Product Brevianamide-D, and Ochratoxin-A from 2 *Penicillium* Strains on the Insect Pests *Spodoptera frugiperda* and *Heliothis virescens*. *Mycological Research* **1990**, 94, 538-542.
112. Vyvyan, J. R. Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals. *Tetrahedron* **2002**, 58 (9), 1631-1646.
113. Macias, F. A.; Varela, R. M.; Simonet, A. M.; Cutler, H. G.; Cutler, S. J.; Ross, S. A.; Dunbar, D. C.; Dugan, F. M.; and Hill, R. A. Allelochemicals from New Zealand fungi - (+)-Brevione A. The first member of a novel family of bioactive spiroditerpenoids isolated from *Penicillium brevicompactum* Dierckx. *Tetrahedron Letters* **2000**, 41 (15), 2683-2686.
114. Fields, S. C.; MirelesLo, L.; and Gerwick, B. C. Hydroxycornexistin: A new phytotoxin from *Paecilomyces variotii*. *Journal of Natural Products* **1996**, 59 (7), 698-700.

115. Cutler, H. G.; Crumley, F. G.; Cox, R. H.; Davis, E. E.; Harper, J. L.; Cole, R. J.; and Sumner, D. R. Pre-Helminthosporol and Pre-Helminthosporol Acetate - Plant-Growth Regulating Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1982**, 30 (4), 658-662.
116. Saxena, S. and Pandey, A. K. Microbial metabolites as eco-friendly agrochemicals for the next millennium. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2001**, 55 (4), 395-403.
117. Knight, S. C.; Anthony, V. M.; Brady, A. M.; Greenland, A. J.; Heaney, S. P.; Murray, D. C.; Powell, K. A.; Schulz, M. A.; Spinks, C. A.; Worthington, P. A.; and Youle, D. Rationale and perspectives on the development of fungicides. *Annual Review of Phytopathology* **1997**, (35), 349-372.
118. Singh, S. B.; Zink, D. L.; Doss, G. A.; Polishook, J. D.; Ruby, C.; Register, E.; Kelly, T. M.; Bonfiglio, C.; Williamson, J. M.; and Kelly, R. Citrafungins A and B, two new fungal metabolite inhibitors of GGTase I with antifungal activity. *Organic Letters* **2004**, 6 (3), 337-340.
119. Angawi, R. F.; Swenson, D. C.; Gloer, J. B.; and Wicklow, D. T. Malettinins B-D: New polyketide metabolites from an unidentified fungal colonist of *Hypoxylon stromata* (NRRL 29110). *Journal of Natural Products* **2005**, 68 (2), 212-216.
120. Wang, Y.; Gloer, J. B.; Scott, J. A.; and Malloch, D. Appenolide-A, Appenolide-B, Appenolide-C - 3 New Antifungal Furanones from the Coprophilous Fungus *Podospora appendiculata*. *Journal of Natural Products* **1993**, 56 (3), 341-344.
121. Chrysayi-Tokousbalides, M. and Kastanias, M. A. Cynodontin: A fungal metabolite with antifungal properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2003**, 51 (17), 4920-4923.
122. Lang, G.; Blunt, J. W.; Cummings, N. J.; Cole, A. L. J.; and Munro, M. H. G. Paecilosetin, a new bioactive fungal metabolite from a New Zealand isolate of *Paecilomyces farinosus*. *Journal of Natural Products* **2005**, 68 (5), 810-811.
123. Wang, Y.; Gloer, J. B.; Scott, J. A.; and Malloch, D. Terezines A-D - New Amino Acid-Derived Bioactive Metabolites from the Coprophilous Fungus *Sporormiella teretispora*. *Journal of Natural Products-Lloydia* **1995**, 58 (1), 93-99.
124. Che, Y. S.; Gloer, J. B.; and Wicklow, D. T. Phomadecalins A-D and phomapentenone A: New bioactive metabolites from *Phoma* sp NRRL 25697, a fungal colonist of *Hypoxylon stromata*. *Journal of Natural Products* **2002**, 65 (3), 399-402.
125. Hein, S. M.; Gloer, J. B.; Koster, B.; and Malloch, D. Arugosin F: A new antifungal metabolite from the coprophilous fungus *Ascodesmis sphaerospora*. *Journal of Natural Products* **1998**, 61 (12), 1566-1567.
126. Shigemori, H.; Komatsu, K.; Mikami, Y.; and Kobayashi, J. Seragakinone A, a new pentacyclic metabolite from a marine-derived fungus. *Tetrahedron* **1999**, 55 (52), 14925-14930.
127. Thines, E.; Arendholz, W. R.; Anke, H.; and Sterner, O. Benesudon, a new antibiotic fungal metabolite from cultures of *Mollisia benesuada* (Tul) Phill. *Journal of Antibiotics* **1997**, 50 (1), 13-17.
128. Qiancutrone, J. F.; Gao, Q.; Huang, S.; Klohr, S. E.; Veitch, J. A.; and Shu, Y. Z. Arthrinone, A Novel Fungal Metabolite from *Arthrinium* sp Fa-1744. *Journal of Natural Products-Lloydia* **1994**, 57 (12), 1656-1660.
129. Parente, E.; Moles, M.; and Ricciardi, A. Leucocin F10, a bacteriocin from *Leuconostoc carnosum*. *International Journal of Food Microbiology* **1996**, 33 (2-3), 231-243.
130. Iida, A.; Okuda, M.; Uesato, S.; Takaishi, Y.; Shingu, T.; Morita, M.; and Fujita, T. Fungal Metabolites .3. Structural Elucidation of Antibiotic Peptides, Trichosporin-B-liib, Trichosporin-

- liic, Trichosporin-lvb, lvc, Trichosporin-lvd, Trichosporin-Via and Trichosporin-Vib from *Trichoderma polysporum* - Application of Fast-Atom-Bombardment Mass-Spectrometry Mass-Spectrometry to Peptides Containing A Unique Aib-Pro Peptide-Bond. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1* **1990**, (12), 3249-3255.
131. Matsuura, K.; Yesilada, A.; Iida, A.; Takaishi, Y.; Kanai, M.; and Fujita, T. Fungal Metabolites .8. Primary Structures of Antibiotic Peptides, Hypelcin-A-I, Hypelcin-A-II, Hypelcin-A-III, Hypelcin-A-IV, Hypelcin-A-V, Hypelcin-A-VI, Hypelcin-A-VII, Hypelcin-A-VIII and Hypelcin-A-IX from *Hypocrea peltata*. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1* **1993**, (3), 381-387.
 132. Tsantrizos, Y. S.; Pischos, S.; and Sauriol, F. Structural assignment of the peptide antibiotic LP237-F8, a metabolite of *Tolypocladium geodes*. *Journal of Organic Chemistry* **1996**, 61 (6), 2118-2121.
 133. Cantin, A.; Moya, P.; Miranda, M. A.; Primo, J.; and Primo-Yuferá, E. Synthesis and biological evaluation of new analogues of the active fungal metabolites N-(2-methyl-3-oxodecanoyl)-2-pyrroline and N-(2-methyl-3-oxodec-8-enoyl)-2-pyrroline (II). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2000**, 48 (8), 3682-3688.
 134. Castillo, M. A.; Moya, P.; Cantin, A.; Miranda, M. A.; Primo, J.; Hernandez, E.; and Primo-Yuferá, E. Insecticidal, anti-juvenile hormone, and fungicidal activities of organic extracts from different *Penicillium* species and their isolated active components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1999**, 47 (5), 2120-2124.
 135. Alfaro, C.; Urios, A.; Gonzalez, M. C.; Moya, P.; and Blanco, M. Screening for metabolites from *Penicillium novae-zeelandiae* displaying radical-scavenging activity and oxidative mutagenicity: isolation of gentisyl alcohol. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **2003**, 539 (1-2), 187-194.
 136. Cantin, K.; Lopez-Gresa, M. P.; Gonzalez, M. C.; Moya, P.; Miranda, M. A.; Primo, J.; Romero, V.; Peris, E.; and Estornell, E. Novel inhibitors of the mitochondrial respiratory chain: Oximes and pyrrolines isolated from *Penicillium brevicompactum* and synthetic analogues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, 53 (21), 8296-8301.
 137. Lopez-Gresa, M. P.; Gonzalez, M. C.; Primo, J.; Moya, P.; Romero, V.; and Estornell, E. Circumdatin H, a new inhibitor of mitochondrial NADH oxidase, from *Aspergillus ochraceus*. *Journal of Antibiotics* **2005**, 58 (6), 416-419.
 138. Castillo, M.; Moya, P.; Couillaud, F.; Garcera, M. D.; and Martínez-Pardo, R. A heterocyclic oxime from a fungus with anti-juvenile hormone activity. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **1998**, 37 (4), 287-294.
 139. Moya, P.; Cantin, A.; Castillo, M. A.; Primo, J.; Miranda, M. A.; and Primo-Yuferá, E. Isolation, structural assignment, and synthesis of N-(2-methyl-3-oxodecanoyl)-2-pyrroline, a new natural product from *Penicillium brevicompactum* with in vivo anti-juvenile hormone activity. *Journal of Organic Chemistry* **1998**, 63 (23), 8530-8535.
 140. Cantin, A.; Moya, P.; Castillo, M. A.; Primo, J.; Miranda, M. A.; and Primo-Yuferá, E. Isolation and synthesis of N-(2-methyl-3-oxodec-8-enoyl)-2-pyrroline and 2-(hept-5-enyl)-3-methyl-4-oxo-6,7,8,8a-tetrahydro-4H-pyrrolo[2,1-b]-3-oxazine - Two new fungal metabolites with in vivo anti-juvenile-hormone and insecticidal activity. *European Journal of Organic Chemistry* **1999**, (1), 221-226.
 141. Moya, P.; Cantin, A.; Miranda, M. A.; Primo, J.; and Primo-Yuferá, E. Synthesis and biological evaluation of new analogues of the active fungal metabolites N-(2-methyl-3-oxodecanoyl)-2-pyrroline and N-(2-methyl-3-oxodec-8-enoyl)-2-pyrroline. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1999**, 47 (9), 3866-3871.
 142. Cantin, A.; Moya, P.; Miranda, M. A.; Primo, J.; and Primo-Yuferá, E. Isolation of N-(2-methyl-3-oxodecanoyl)pyrrole and N-(2-methyl-3-oxodec-8-enoyl)pyrrole, two new natural

- products from *Penicillium brevicompactum*, and synthesis of analogues with insecticidal and fungicidal activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1998**, *46* (11), 4748-4753.
143. Clive, D. L. J. and Hisaindee, S. Synthesis of racemic brevioxime. *Chemical Communications* **1999**, (22), 2251-2252.
 144. Clive, D. L. J. and Hisaindee, S. Synthesis of racemic brevioxime and related model compounds. *Journal of Organic Chemistry* **2000**, *65* (16), 4923-4929.
 145. Nishimura, Y. and Kitahara, T. Concise synthesis of (+/-)-brevioxime. *Heterocycles* **2000**, *52* (2), 553-556.
 146. Karadogan, B. and Parsons, P. J. Synthesis of racemic brevioxime and related analogues. *Tetrahedron* **2001**, *57* (41), 8699-8703.
 147. Clark, D. Synthesis of (-)-Brevioxime. *Tetrahedron* **2000**, *56* (34), 6181-6184.
 148. Nishimura, Y.; Ishigami, K.; and Kitahara, T. Synthesis of both enantiomers of brevioxime and determination of its absolute configuration. *Heterocycles* **2003**, (61), 481-491.
 149. Takao, T.; Kitatani, F.; Watanabe, N.; Yagi, A.; and Sakata, K. A Simple Screening Method for Antioxidants and Isolation of Several Antioxidants Produced by Marine-Bacteria from Fish and Shellfish. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **1994**, *58* (10), 1780-1783.
 150. Hirota, A.; Morimitsu, Y.; and Hojo, H. New antioxidative indophenol-reducing phenol compounds isolated from the *Mortierella* sp. fungus. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **1997**, *61* (4), 647-650.
 151. Cole, M. D. Key Antifungal, Antibacterial and Antiinsect Assays - A Critical-Review. *Biochemical Systematics and Ecology* **1994**, *22* (8), 837-856.
 152. Abell, L. M. Biochemical approaches to herbicide discovery: Advances in enzyme target identification and inhibitor design. *Weed Science* **1996**, *44* (3), 734-742.
 153. Omura, S.; Murata, M.; Hanaki, H.; Hinotozawa, K.; Oiwa, R.; and Tanaka, H. Phosalacine, A New Herbicidal Antibiotic Containing Phosphinothricin - Fermentation, Isolation, Biological-Activity and Mechanism of Action. *Journal of Antibiotics* **1984**, *37* (8), 829-835.
 154. Bowers, W. S.; Ohta, T.; Cleere, J. S., and Marsella, P. A. Discovery of insect anti-juvenile hormones in plants. *Science*, **1976**, 542-547.
 155. Cuñat, P.; Primo, E.; Sanz, I.; Garcera, M. D.; March, M. C.; Bowers, W. S.; and Martinez-Pardo, R. Biocidal Activity of Some Spanish Mediterranean Plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1990**, *38* (2), 497-500.
 156. Casaña-Giner, V.; Gandia-Balaguer, A.; Mengod-Puerta, C.; Primo-Millo, J.; and Primo-Yufer, E. Insect growth regulators as chemosterilants for *Ceratitis capitata* (Diptera : Tephritidae). *Journal of Economic Entomology* **1999**, *92* (2), 303-308.
 157. Carter, T. H.; Dominguez, N.; Zeng, L.; and Kung, H. J. Resistance to Transformation by Insertionally Activated C-ErbB Is A Dominant Phenotype in Fibroblasts. *Virology* **1995**, *212* (1), 277-283.
 158. Estornell, E.; Fato, R.; Pallotti, F.; and Lenaz, G. Assay Conditions for the Mitochondrial NADH - Coenzyme-Q Oxidoreductase. *Febs Letters* **1993**, *332* (1-2), 127-131.
 159. Qian-Cutrone, J. F.; Huang, S.; Shu, Y. Z.; Vyas, D.; Fairchild, C.; Menendez, A.; Krampitz, K.; Dalterio, R.; Klohr, S. E.; and Gao, Q. Stephacidin A and B: Two structurally novel, selective inhibitors of the testosterone-dependent prostate LNCaP cells. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124* (49), 14556-14557.

160. Cutrone, J Q and Krampitz, K. Stephacidin antitumor antibiotics. **2001**, US. 6291461
161. Fenical, W. Avrainvillamide, a cytotoxic marine natural product, and the derivatives thereof. **2000**, US. 6066635
162. Rahbaek, L. and Breinholt, J. Circumdatins D, E, and F: Further fungal benzodiazepine analogues from *Aspergillus ochraceus*. *Journal of Natural Products* **1999**, 62 (6), 904-905.
163. Rahbaek, L.; Breinholt, J.; Frisvad, J. C.; and Christophersen, C. Circumdatin A, B, and C: Three new benzodiazepine alkaloids isolated from a culture of the fungus *Aspergillus ochraceus*. *Journal of Organic Chemistry* **1999**, 64 (5), 1689-1692.
164. Dai, J. R.; Carte, B. K.; Sidebottom, P. J.; Yew, A. L. S.; Ng, S. B.; Huang, Y. C.; and Butler, M. S. Circumdatin G, a new alkaloid from the fungus *Aspergillus ochraceus*. *Journal of Natural Products* **2001**, 64 (1), 125-126.
165. Yamazaki, M.; Miyaki, K.; and Maebayashi, Y. Isolation of A New Type of Pyrazine Metabolite from *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **1972**, 20 (10), 2274-&.
166. Dunn, G.; Newbold, G. T.; and Spring, F. S. Synthesis of Flavacol, A Metabolic Product of *Aspergillus flavus*. *Journal of the Chemical Society* **1949**, 2586-2587.
167. White, E. C. and Hill, J. H. Studies on antibacterial products formed by molds. *Journal of Bacteriology* **1943**, (45), 433-442.
168. Jones, H.; Rake Geoffrey; and Hamre Dorothy M Studies on *Aspergillus flavus*. *Journal of Bacteriology* **1943**, (45), 461-469.
169. Macdonald, J. Biosynthesis of Aspergillilic Acid. *Journal of Biological Chemistry* **1961**, 236 (2), 512-&.
170. Leonard, J. V. and Schapira, A. H. V. Mitochondrial respiratory chain disorders II: neurodegenerative disorders and nuclear gene defects. *Lancet* **2000**, 355 (9201), 389-394.
171. Brandt, U.; Kerscher, S.; Drose, S.; Zwicker, K.; and Zickermann, V. Proton pumping by NADH : ubiquinone oxidoreductase. A redox driven conformational change mechanism. *Febs Letters* **2003**, 545 (1), 9-17.
172. Weiss, H.; Friedrich, T.; Hofhaus, G.; and Preis, D. The Respiratory-Chain NADH Dehydrogenase (Complex-I) of Mitochondria. *European Journal of Biochemistry* **1991**, 197 (3), 563-576.
173. Esposti, M. D. Measuring mitochondrial reactive oxygen species. *Methods* **2002**, 26 (4), 335-340.
174. Kelso, G. F.; Porteous, C. M.; Coulter, C. V.; Hughes, G.; Porteous, W. K.; Ledgerwood, E. C.; Smith, R. A. J.; and Murphy, M. P. Selective targeting of a redox-active ubiquinone to mitochondria within cells - Antioxidant and antiapoptotic properties. *Journal of Biological Chemistry* **2001**, 276 (7), 4588-4596.
175. Li, N. Y.; Ragheb, K.; Lawler, G.; Sturgist, J.; Rajwa, B.; Melendez, J. A.; and Robinson, J. P. Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. *Journal of Biological Chemistry* **2003**, 278 (10), 8516-8525.
176. Esposti, M. D. Inhibitors of NADH-ubiquinone reductase: an overview. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics* **1998**, 1364 (2), 222-235.
177. Bermejo, A.; Figadere, B.; Zafra-Polo, M. C.; Barrachina, I.; Estornell, E.; and Cortes, D. Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. *Natural Product Reports* **2005**, 22 (2), 269-303.

178. Fang, N. B. and Casida, J. E. Cube resin insecticide: Identification and biological activity of 29 rotenoid constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1999**, *47* (5), 2130-2136.
179. Fontana, A.; Cimino, G.; Gavagnin, M.; Gonzalez, M. C.; and Estornell, E. Novel inhibitors of mitochondrial respiratory chain: Endoperoxides from the marine tunicate *Stolonica socialis*. *Journal of Medicinal Chemistry* **2001**, *44* (14), 2362-2365.
180. Glaser, R.; Shifan, D.; and Froimowitz, M. NMR structure determination of brefeldin-A, a 13-membered ring fungal metabolite. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2000**, *38* (4), 274-280.
181. Singleton, V. I.; Bohonos, N., and Ullstrup, A. J. Decumbin, a new compound from a species of *Penicillium*, 181, 1072-1073. **1958**.
182. Haerri, E.; Loeffler, W.; Sigg, H. P.; Staehelin, H., and Tamm, C. Isolation of new metabolic products from *Penicillium brefeldianum*, 46, 1235-1243. **1963**.
183. Hutchinson, C. R.; Kurobane, I.; Mabuni, C. T.; Kumola, R. W.; Mcinnes, A. G.; and Walter, J. A. Biosynthesis of Macrolide Antibiotics .3. Regiochemistry of Isotopic Hydrogen Labeling of Brefeldin A by Acetate. *Journal of the American Chemical Society* **1981**, *103* (9), 2474-2477.
184. Niwa, S.; Ishibashi, O.; and Inui, T. Brefeldin A inhibits osteoclastic bone resorption through induction of apoptosis. *Life Sciences* **2001**, *70* (3), 315-324.
185. Hudson, T. H. and Grillo, F. G. Brefeldin-A Enhancement of Ricin A-Chain Immunotoxins and Blockade of Intact Ricin, Modeccin, and Abrin. *Journal of Biological Chemistry* **1991**, *266* (28), 18586-18592.
186. Prasad, C. Bioactive Cyclic Dipeptides. *Peptides* **1995**, *16* (1), 151-164.
187. Mitova, M.; Tutino, M. L.; Infusini, G.; Marino, G.; and De Rosa, S. Exocellular peptides from antarctic psychrophile *Pseudoalteromonas haloplanktis*. *Marine Biotechnology* **2005**, *7* (5), 523-531.
188. Bull, S. D.; Davies, S. G.; Parkin, R. M.; and Sanchez-Sancho, F. The biosynthetic origin of diketopiperazines derived from D-proline. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1* **1998**, (15), 2313-2320.
189. Jayatilake, G. S.; Thornton, M. P.; Leonard, A. C.; Grimwade, J. E.; and Baker, B. J. Metabolites from an Antarctic sponge-associated bacterium, *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Natural Products* **1996**, *59* (3), 293-296.
190. Schmitz, F. J.; Vanderah, D. J.; Hollenbeak, K. H.; Enwall, C. E. L.; Gopichand, Y.; Sengupta, P. K.; Hossain, M. B.; and Vanderhelm, D. Metabolites from the Marine Sponge *Tedania ignis* - A New Atisanediol and Several Known Diketopiperazines. *Journal of Organic Chemistry* **1983**, *48* (22), 3941-3945.
191. Adamczeski, M.; Reed, A. R.; and Crews, P. New and Known Diketopiperazines from the Caribbean Sponge, *Calyx cf podatypa*. *Journal of Natural Products-Lloydia* **1995**, *58* (2), 201-208.
192. Liesch, J. M. and Wichmann, C. F. Novel Antinematodal and Antiparasitic Agents from *Penicillium charlesii* .2. Structure Determination of Paraherquamide-B, Paraherquamide-C, Paraherquamide-D, Paraherquamide-E, Paraherquamide-F, and Paraherquamide-G. *Journal of Antibiotics* **1990**, *43* (11), 1380-1386.
193. Blanchflower, S. E.; Banks, R. M.; Everett, J. R.; and Reading, C. Further Novel Metabolites of the Paraherquamide Family. *Journal of Antibiotics* **1993**, *46* (9), 1355-1363.

194. Lee, B H and Taylor, R. Marcfortine/paraherquamide derivatives useful as antiparasitic agents. **1992**, US. 9310120
195. Whyte, A. C.; Gloer, J. B.; Wicklow, D. T.; and Dowd, P. F. Sclerotiamide: A new member of the paraherquamide class with potent antiinsectan activity from the sclerotia of *Aspergillus sclerotiorum*. *Journal of Natural Products* **1996**, 59 (11), 1093-1095.
196. Stocking, E. M.; Sanz-Cervera, J. F.; and Williams, R. M. Studies on the biosynthesis of paraherquamide: Synthesis and incorporation of a hexacyclic indole derivative as an advanced metabolite. *Angewandte Chemie-International Edition* **2001**, 40 (7), 1296-1298.
197. Williams, R. M. and Cox, R. J. Paraherquamides, brevianamides, and asperparalines: Laboratory synthesis and biosynthesis. An interim report. *Accounts of Chemical Research* **2003**, 36 (2), 127-139.
198. Adams, L. A.; Gray, C. R.; and Williams, R. M. Concise synthesis of the core bicyclo[2.2.2]diazaoctane ring common to asperparaline, paraherquamide, and stephacidin alkaloids. *Tetrahedron Letters* **2004**, 45 (23), 4489-4493.
199. Stocking, E. M.; Sanz-Cervera, J. F.; Unkefer, C. J.; and Williams, R. M. Studies on the biosynthesis of paraherquamide. Construction of the amino acid framework. *Tetrahedron* **2001**, 57 (25), 5303-5320.
200. Stocking, E. M.; Martinez, R. A.; Silks, L. A.; Sanz-Cervera, J. F.; and Williams, R. M. Studies on the biosynthesis of paraherquamide: Concerning the mechanism of the oxidative cyclization of L-isoleucine to Beta-methylproline. *Journal of the American Chemical Society* **2001**, 123 (14), 3391-3392.
201. Blizzard, T. A.; Marino, G.; Mrozik, H.; Fisher, M. H.; Hoogsteen, K.; and Springer, J. P. Chemical Modification of Paraherquamide .1. Unusual Reactions and Absolute Stereochemistry. *Journal of Organic Chemistry* **1989**, 54 (11), 2657-2663.
202. Vacca, A.; Ribatti, D.; Iurlaro, M.; Merchionne, F.; Nico, B.; Ria, R.; and Dammacco, F. Docetaxel versus paclitaxel for antiangiogenesis. *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research* **2002**, 11 (1), 103-118.
203. Low, S. H.; Wong, S. H.; Tang, B. L.; Tan, P.; Subramaniam, V. N.; and Hong, W. J. Inhibition by Brefeldin-A of Protein Secretion from the Apical Cell-Surface of Madin-Darby Canine Kidney-Cells. *Journal of Biological Chemistry* **1991**, 266 (27), 17729-17732.
204. Kim, D. J.; Lee, J. K.; Shim, P. J.; Lim, J. I.; Jo, H.; and Kim, S. H. Asymmetric total synthesis of (+)-brefeldin a from (S)-lactate by triple chirality transfer process and nitrile oxide cycloaddition. *Journal of Organic Chemistry* **2002**, 67 (3), 764-771.
205. Robertson, A. P.; Clark, C. L.; Burns, T. A.; Thompson, D. P.; Geary, T. G.; Trailovic, S. M.; and Martin, R. J. Paraherquamide and 2-deoxy-paraherquamide distinguish cholinergic receptor subtypes in *Ascaris* muscle. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2002**, 302 (3), 853-860.
206. Zinser, E. W.; Wolf, M. L.; Alexander-Bowman, S. J.; Thomas, E. M.; Davis, J. P.; Groppi, V. E.; Lee, B. H.; Thompson, D. P.; and Geary, T. G. Anthelmintic paraherquamides are cholinergic antagonists in gastrointestinal nematodes and mammals. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **2002**, 25 (4), 241-250.
207. Nauen, R.; Ebbinghaus, U.; and Tietjen, K. Ligands of the nicotinic acetylcholine receptor as insecticides. *Pesticide Science* **1999**, (55), 608-610.
208. Nougier, R.; Gastaldi, S.; Stien, D.; Bertrand, M.; Villar, F.; Andrey, O.; and Renaud, P. Synthesis of (+/-)- and (-)-botryodiplodin using stereoselective radical cyclizations of acyclic esters and acetals. *Tetrahedron-Asymmetry* **2003**, 14 (19), 3005-3018.

-
209. Gupta, R. S.; Chandran, R. R.; and Divekar, P. V. Botryodiplodin-A New Antibiotic from *Botryodiplodia theobromae* Pat .I. Production Isolation and Biological Properties. *Indian Journal of Experimental Biology* **1966**, 4 (3), 152-&.
210. Arsenault, G. and Althaus, J. R. Structure of Antibiotic Botryodiplodin-Use of Chemical Ionization Mass Spectrometry in Organic Structure Determination. *Journal of the Chemical Society D-Chemical Communications* **1969**, (23), 1414-&.
211. Moreau, S.; Lablachecombier, A.; Biguet, J.; Foulon, C.; and Delfosse, M. Botryodiplodin, A Myco-Toxin Synthesized by A Strain of *P.roqueforti*. *Journal of Organic Chemistry* **1982**, 47 (12), 2358-2359.
212. Fuska, J.; Proksa, B.; and Uhrin, D. The Antibiotic Psx-1 Produced by *Penicillium stipitatum* Is Identical with Botryodiplodin. *Folia Microbiologica* **1988**, 33 (3), 238-240.
213. Renault, F.; Moreau, S.; and Lablachecombier, A. Biosynthesis of Botryodiplodin, A Mycotoxin of *Penicillium roqueforti* - Incorporations of [1-C-13], [2-C-13],[1-2-C-13]Acetate and [2-C-13, Carboxyl-C-13],[3-4-C-13]Orsellinic Acid. *Tetrahedron* **1984**, 40 (10), 1823-1834.
214. Renault, F.; Moreau, S.; Lablachecombier, A.; and Tiffon, B. Botryodiplodin - A Mycotoxin from *Penicillium roqueforti* - Reaction with Amino-Pyrimidines, Amino-Purines and 2'-Deoxynucleosides. *Tetrahedron* **1985**, 41 (5), 955-962.
215. Moule, Y.; Renault, F.; Darracq, N.; and Douce, C. Dna-Protein Cross-Linking by the Myco-Toxin, Botryodiplodin, in Mammalian-Cells. *Carcinogenesis* **1982**, 3 (2), 211-214.
216. Andrey, O.; Vidonne, A.; and Alexakis, A. Organocatalytic Michael addition, a convenient tool in total synthesis. First asymmetric synthesis of (-)-botryodiplodin. *Tetrahedron Letters* **2003**, 44 (43), 7901-7904.
217. Lee, S. M.; Li, X. F.; Jiang, H. L.; Cheng, J. G.; Seong, S.; Choi, H. D.; and Son, B. W. Terreusinone, a novel UV-A protecting dipyrroloquinone from the marine algicolous fungus *Aspergillus terreus*. *Tetrahedron Letters* **2003**, 44 (42), 7707-7710.