



FACULTAD DE FARMACIA
ESCUELA DE QUÍMICA Y FARMACIA
LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES

EXTRACCIÓN Y MODIFICACIONES ESTRUCTURALES DE HOPANOS LIQUÉNICOS Y
EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD CONTRA *BOTRYTIS CINEREA*

Tesis para optar al Título de Químico Farmacéutico

CRISTIAN ANDRÉS QUINTANA ROMERO

Director de tesis: Dra. Natalia Quiñones Sobarzo

2016

*Dedicado a mis padres,
el Hugo y la Chabe*

AGRADECIMIENTOS

Primero que todo, gracias a mis viejos y mi familia que me han apoyado durante esta etapa y en realidad, en toda mi vida. Muchas gracias, sin ustedes no sería quien hoy soy.

Agradezco también a todos mis amigos, los que vienen del colegio y los que conocí aquí en la u, gracias por prestar apoyo cuando era necesario y distracción también. A Mankeke y Guatón también por haber hecho de su casa, nuestra casa-estudio y también el centro de reuniones extra-curriculares. Aún esperamos el cocimiento.

A los profes, Natalia y Cuellar, gracias por la paciencia, admito que no fui el tesista ejemplar, pero Natalia, la culpa es de Cuellar, él te tiró el cacho a ti. De todas formas, Natalia, te pasaste, hasta tarde en la noche me llamaste cuando estabas leyendo esta tesis, dudo que haya otro profe tan comprometido. Te felicito por tu pasión y dedicación en lo que haces. En el laboratorio, gracias a los que me ayudaron de alguna u otra forma, lavando un par de balones o con sus consejos cuando ninguna reacción funcionaba.

Por último, pero por nada menos importante, a la Chilombiana, que ha estado junto a mí la mayor parte de este camino, me ha apoyado y retado cuando sólo quedaban ganas de tirar la toalla, gracias amor por obligarme más de alguna vez a estudiar o por botarme de la cama cuando tenía que levantarme temprano para ir a clases, de verdad, gracias por todo.

RESUMEN

Los líquenes son organismos simbióticos compuestos por un hongo (micobionte) y un alga o cianobacteria (fotobionte). Existen más de 1600 especies de líquenes descritos en el mundo y sólo en Chile se describen al menos 1000, por lo que cobra importancia la investigación de las propiedades farmacológicas o aplicaciones industriales que puedan tener sus metabolitos, que ya han demostrado propiedades biológicas como actividad antitumoral, antibacteriana, antifúngica, entre otras. Con el objetivo de la búsqueda de nuevas aplicaciones biológicas de compuestos liquénicos de la serie del hopano, en el presente trabajo se llevó a cabo el aislamiento de cuatro derivados hopanoides del líquen *Pseudocyphellaria divulsa*, hopan-7 β ,22-diol (**6**), hopan-6 α ,22-diol (**7**), 7 β -acetoxihopan-22-ol (**9**), y hopan-15 α ,22-diol (**10**) y la obtención de seis derivados sintéticos (6-oxo-hopan-22-ol (**11**), 7-oxo-hopan-22-ol (**12**), 15-oxo-hopan-22-ol (**13**), 6 α -acetoxihopan-22-ol (**14**), 15 α -acetoxihopan-22-ol (**15**), 15,21-dioxo-hopano (**17**)) mediante modificaciones estructurales de estos. Finalmente, se evaluó la actividad antifúngica de los compuestos contra el hongo *Botrytis cinerea*, evaluando su actividad a tres concentraciones: 50, 150 y 250 ppm. Ningún compuesto presentó inhibición del crecimiento *in vitro* a 50 ppm. A 150 ppm **10** presentó un porcentaje de inhibición de 41 \pm 1,8 %, mientras que **13** presentó un 34 \pm 3,8. A 250 ppm, todos los compuestos presentaron una inhibición del crecimiento superior al 80%, excepto **12** y **9**, que tampoco mostraron actividad a esta concentración.

EXTRACTION AND STRUCTURAL MODIFICATIONS TO LICHENIC HOPANES AND EVALUATION OF THEIR ACTIVITY AGAINST *BOTRYTIS CINEREA*

ABSTRACT

Lichens are symbiotic organism formed by a fungus (mycobiont) and a seaweed or cyanobacteria (photobiont). There are more than 1600 known lichen species in the world and in Chile at least 1000 are described, thus takes matter the research of their pharmacological properties or industrial applications that their metabolites may have, which had already demonstrated biological properties like antitumor, antibacterial and antifungal activity, among others.

In the present study it was carried out the isolation of four hopanoids derivates from the lichen *Pseudocyphellaria divulsa*, hopan-7 β ,22-diol (**6**), hopan-6 α ,22-diol (**7**), 7 β -acetoxihopan-22-ol (**9**), y hopan-15 α ,22-diol (**10**) and the obtaining of six synthetic derivates (6-oxo-hopan-22-ol (**11**), 7-oxo-hopan-22-ol (**12**), 15-oxo-hopan-22-ol (**13**), 6 α -acetoxihopan-22-ol (**14**), 15 α -acetoxihopan-22-ol (**15**), 15,21-dioxo-hopano (**17**)) through structural modifications of these.

Finally, it was evaluated the antifungal activity of the compounds against *B. cinerea* fungus, evaluating its activity at three concentrations: 50, 150 and 250 ppm. Any compound showed inhibition of *in-vitro* growth at 50 ppm. At 150 ppm **10** showed an inhibition percentage of $41 \pm 1,8$ %, while **13** showed $34 \pm 3,8$ %. At 250 ppm, all compounds present a growth inhibition above 80%, except **9** and **12**, that showed no activity at this concentration either.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. HIPÓTESIS	11
3. OBJETIVOS	13
4. METODOLOGÍA	15
4.1. ANÁLISIS QUÍMICO	16
4.2. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA	21
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
6. CONCLUSIONES	45
7. EXPERIMENTAL	47
8. BIBLIOGRAFÍA	52
9. ANEXOS	56

1. INTRODUCCIÓN.

El estudio de los metabolitos secundarios de plantas, hongos, y organismos marinos, ha tenido gran relevancia en los últimos años. La función de cada uno de estos compuestos no se conoce del todo con exactitud, aunque se cree que muchos son sintetizados por los organismos para defenderse de diversos agentes externos (Williams, Stone, Hauck, & Raham, 1989). Como consecuencia de ser el resultado de una selección a lo largo de la evolución de las especies, estos compuestos poseen actividades biológicas muy interesantes, por lo que se han utilizado en terapéutica o tomado como modelo para realizar modificaciones estructurales específicas y generar nuevos fármacos (Newman, 2008).

Chile destaca, dentro del área de productos naturales, por el estudio de los líquenes y sus metabolitos secundarios, al poseer una de las micobiotas más diversas y abundantes en términos de biomasa del mundo (Guzmán, 2008). Por definición, un líquen es un organismo simbiótico compuesto por un hongo, el micobionte, y uno o más organismos fotosintéticos, los fotobiontes (Nash, 2001). Se puede decir también que un líquen es un microecosistema, ya que en él conviven un productor primario y un consumidor primario. De esta asociación hongo-alga u hongo-cianobacteria, el hongo es el organismo dominante, por lo mismo, los nombres de los líquenes están referidos respecto del hongo de la asociación (Purvis, 2000), sin embargo, como toda simbiosis, ambos organismos son requirentes del otro, de modo que si concluye la asociación, el líquen deja de existir (Gerard J. Tortora, 2007). Gracias a esta simbiosis, el líquen tiene gran capacidad de adaptación por lo que es capaz de resistir condiciones ambientales

extremas, lo que permite su amplia distribución a lo largo de la variedad de biomas que el país posee, desde el desierto de Atacama hasta la Antártida (Guzmán, 2008). Esta misma variedad de biomas, determina también la gran cantidad de especies que se pueden encontrar en Chile, especialmente en los bosques del sur del país (Russo, Piovano, Lombardo, Garbarino, & Cardile, 2008). Para 1998, se describían 1383 especies (Quilhot W. , 1998), sin embargo, hoy en día se conocen cerca de 1600 y se espera que el número aumente conforme aumente la exploración de nuestro territorio (Galloway, 1998).

Junto a la amplia variedad de especies liquénicas, existe también una gran variedad de compuestos sintetizados por estos organismos, la gran mayoría metabolitos secundarios exclusivos de los líquenes. Se han descrito más de 1000 moléculas distintas (Huneck & Yoshimura, 1996) (Quilhot, Rubio, & Fernández, 2007), muchas de ellas con importantes actividades biológicas, demostradas *in vitro* e *in vivo*, dentro de las que destacan: antibacteriana, antineoplásica, antifúngica entre otras (Quilhot, Rubio, & Fernández, 2007).

Estos compuestos pueden ser clasificados en tres grandes grupos basados en sus rutas biosintéticas: derivados de acetato-polimalonato, del ácido mevalónico y del ácido chiquímico (Elix, Biochemistry and secondary metabolites, 2008) (Huneck & Yoshimura, 1996). Dentro de los metabolitos liquénicos derivados de la ruta del acetato-polimalonato, encontramos dépsidos, depsidonas, difeniléteres, dibenzofuranos, ácidos úsnicos y depsonas. (Elix, Biochemistry and secondary

metabolites, 2008) (Mosbach, 1973). Estos se consideran metabolitos liquénicos exclusivos, porque raramente se encuentran en otros vegetales. De la ruta del ácido chiquímico se producen terfenilquinonas y derivados del ácido pulvínico. Por último, de la ruta del ácido mevalónico se producen terpenos y esteroides, ambos provienen de la ruta del escualeno y ellos se diferencian debido a que los esteroides son generalmente tetracíclicos, mientras que los terpenoides son pentacíclicos.

Tabla 1.

Principales clases de metabolitos secundarios en líquenes (Quilhot, Rubio, & Fernández, 2007).

<p>1. Ruta del Acetato- polimalonato:</p> <p>1.1 Ácidos alifáticos secundarios, ésteres y derivados relacionados</p> <p>1.2 Policétidos derivados de compuestos aromáticos</p> <p>1.2.1 Compuestos fenólicos mononucleares.</p> <p>1.2.2 Derivados diaril y triaril de unidades fenólicas simples</p> <p>1.2.2a Dépsidos, tridépsidos y ésteres bencilicos</p> <p>1.2.2b Depsidonas y difeniléteres</p> <p>1.2.2c Depsonas</p> <p>1.2.2d Difenzofuranos, ácidos úsnicos y derivados</p> <p>1.2.3 Antraquinonas</p> <p>1.2.4 Cromonas</p> <p>1.2.5 Naftaquinonas</p> <p>1.2.6 Xantonas</p> <p>2. Ruta del ácido chiquímico:</p> <p>2.1 Terfenilquinonas.</p> <p>2.2 Derivados del ácido pulvínico</p> <p>3. Ruta del ácido mevalónico:</p> <p>3.1 Di-, sester- y triterpenos</p> <p>3.2 Esteroides</p>
--

Ejemplos de triterpenos acumulados por los líquenes que corresponden a la familia de las series del Hopano, Lupano, Oleano, Ursano, y fernano son: carandinol (1), ácido betulinico (2), ácido oleanoico (3), ácido ursólico (4) y Fern-9(11)-en-3 β ,12 β -diol (5), respectivamente.(Marcano & Hasegawa, 2002) (Figura 1).

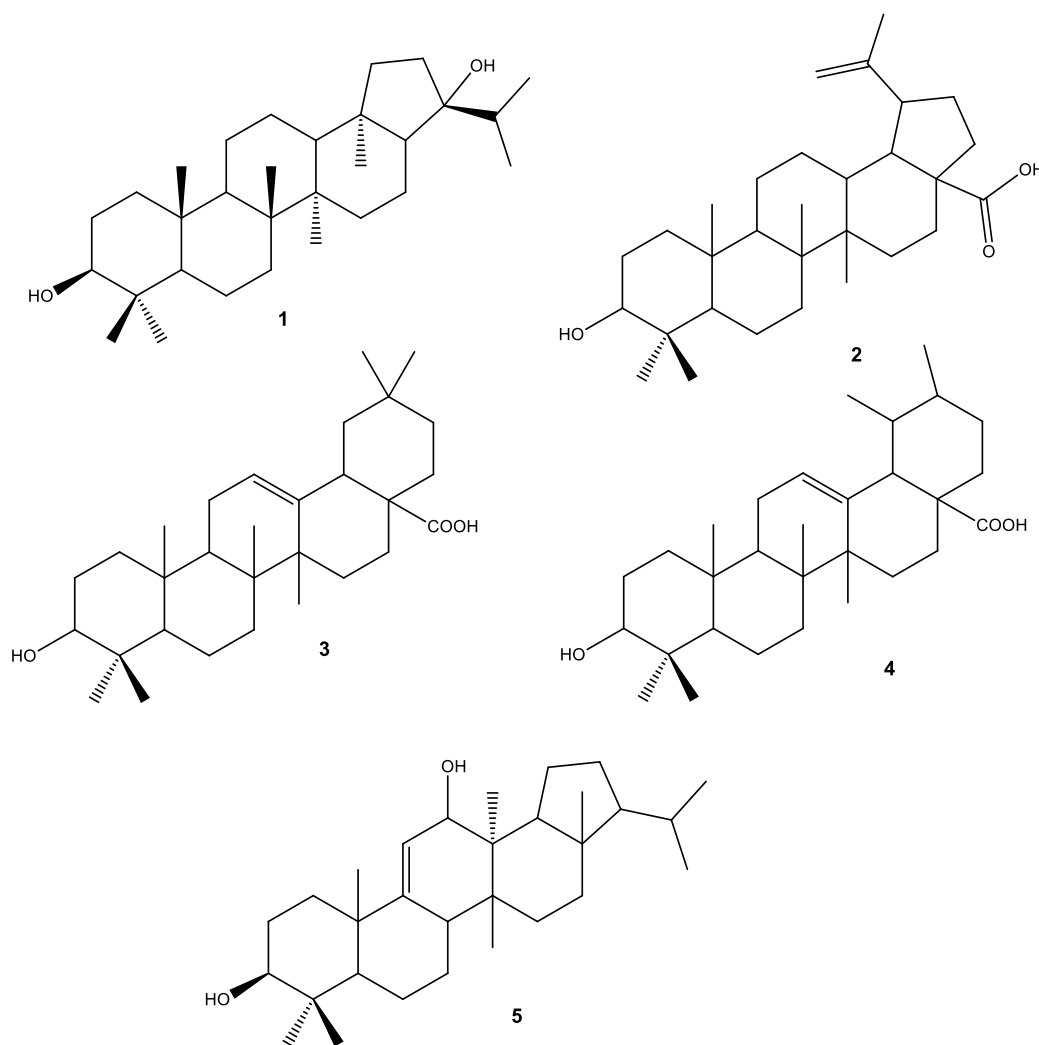


Figura 1: Ejemplos de compuestos triterpénicos de las series hopano, lupano, oleano, ursano, y fernano.

Diversos metabolitos liquénicos se han utilizado tradicionalmente en la medicina popular para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, fúngicas, virales y bacterianas (Quilhot, Rubio, & Fernández, 2007) (Díaz, Ugarte, Quilhot, Vera, & Gambaro, 1988). Por ejemplo el ácido úsnico ha mostrado efectos inhibitorios sobre el virus herpes simple tipo 1 y polio tipo 1 (Wu, Zhang, Ding, Tan, & Yan, 1995), además exhibe propiedades antiinflamatorias comparables a las del ibuprofeno (Vijayakumar, y otros, 2000). En Europa incluso existieron preparaciones farmacéuticas que se comercializaron del mismo ácido liquénico para el tratamiento de infecciones, eczemas, mastitis y furunculosis (Ögmundsdóttir, Zoega, Gissurarason, & Ingollfsdottir, 1998).

El potencial uso de dépsidos y depsidonas (dos grupos de metabolitos liquénicos) como antibacterianos también ha sido evaluado. Dentro de este grupo de compuestos destaca el Ácido Perlatólico, el cual presenta una actividad similar a Cefotaxima contra microorganismos como *Stafilococco Aureus* Meticilin Sensible y Meticilin Resistente (Piovano, y otros, 2002).

En los bosques templados del sur de Chile, las especies liquénicas del genero *Pseudocyphellaria* son muy comunes, este género destaca por su alta productividad y compleja diversidad química, incluidos metabolitos de las tres principales rutas biogénicas, sin embargo este género destaca por la gran acumulación de metabolitos de la serie del Hopano. Por ejemplo, hopano-7 β ,22-diol (6) , hopan-6 α ,22-diol (7) y hopan-6 α ,7 β ,22-triol (8), son aislados desde

Pseudocyphellaria crocata (Elix, A catalogue of standardized Chromatographic Data and Biosynthetic Relationships for Lichen Substances, 2014) y *Pseudocyphellaria divulsa* (Cuellar, y otros, 2008).

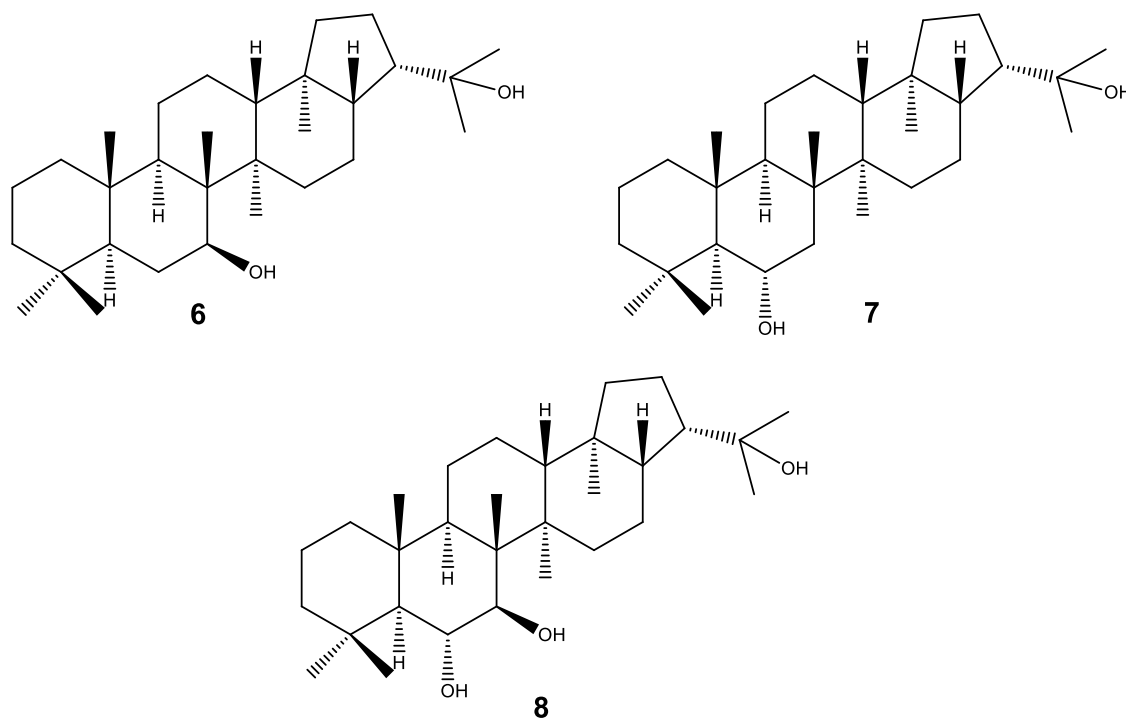


Figura 2: hopano-7 β ,22-diol (**6**), hopano-6 α ,22-diol (**7**) y hopano-6 α ,7 β ,22-triol (**8**).

Sin embargo para los triterpenos liquénicos, no se han reportado actividades biológicas de interés, motivo por el cual estos compuestos no han sido muy utilizados en la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos. Recientemente se ha visto que hopano-6 α ,22-diol (**7**) conocido con el nombre común de zeorina, muestra actividad antibacteriana y antifúngica comparable a estreptomycin y ketoconazol respectivamente (Kosanic, Rankovic, & Sukdolak, 2010).

Además se demostró que carandinol (1), otro metabolito liquénico con esqueleto hopano, ha mostrado tener actividad antineoplásica *in vitro* comparable a doxorubicina (Begum, Syed, Siddiqui, Sattar, & Choudhary, 2013).

Por otra parte en Chile, la agricultura y más específicamente, la cosecha de uva y la exportación del vino, constituyen un importante sector económico del país, posicionando a Chile como quinto en la producción y exportación de vino, produciendo un 8% de la producción total mundial al 2009. Dicha producción se ve afectada por un hongo que ataca a una gran cantidad de vegetales, entre ellos la uva, *Botrytis cinerea* (Kong & García, 2014).

Botrytis cinerea, es un hongo filamentoso patógeno para una gran cantidad de vegetales, es la infección que más pérdidas económicas produce en la agricultura, siendo la industria vitivinícola la más afectada en nuestro país con una pérdida estimada anual de \$252 millones de dólares, según cifras no oficiales. Este hongo puede causar un gran daño durante el crecimiento de la planta o luego de la cosecha, produciendo el comúnmente llamado moho gris, podredumbre gris o simplemente "*Botrytis*" (Kong & García, 2014).

La infección por el hongo *Botrytis* consta de varias fases, primero ocurre una adhesión y germinación de las esporas que han sido transportadas por corrientes de aire por largas distancias en la superficie del vegetal (Jarvis, 1977). Luego, ocurre una penetración al tejido vegetal directamente por heridas o aberturas

naturales o por acción enzimática. Tras la penetración, el patógeno se establece y destruye las células adyacentes, dando lugar a la lesión primaria como consecuencia de los mecanismos de defensa de la planta. A continuación se produce un período de latencia temporal, donde la planta con sus mecanismos de defensa es capaz de controlar la infección, estado que es temporal, que al vencer el patógeno estos mecanismos de defensa, inicia una diseminación en el tejido vegetal circundante, determinando la colonización y maceración del tejido infectado. Esta necrosis se produce principalmente por un metabolito llamado Botrydial, un sesquiterpeno que se produce durante la infección y que es capaz de inducir hiperclorosis y colapso celular, lo que facilitaría la penetración y colonización (Colmenares, Durán-Patrón, Aleu, Collado, & Hernández-Galán, 2002). Otras toxinas producidas por *Botrytis cinerea* son las derivadas del ácido botcínico (Reino, Hernandez-Galan, Duran-Patron, & Collado, 2004) y especies reactivas de oxígeno (ROS) (Rolke, y otros, 2004). Finalmente, sobre este tejido necrosado, se puede producir una nueva generación de esporas que darán lugar nuevamente al proceso infeccioso en otros vegetales (Benito, Arranz, & Eslava, 2000).

Estudios más recientes, indican que *Botrytis* posee los factores de virulencia de otros agentes fúngicos patógenos, pero también dan cuenta de una alta variabilidad genética entre cepas que pueden dar cuenta de su comportamiento necrotrofico y polifágico.

Actualmente, para combatir esta infección, se utilizan pesticidas de alta toxicidad para el ser humano, incluso, en la industria vitivinícola, se puede encontrar residuos de ellos en el vino, el producto final, lo que es muy perjudicial para la salud (Edder, 2009) y más preocupante aún, es que son cada vez menos efectivos dada la resistencia que están adquiriendo distintas cepas del hongo *Botrytis cinerea* (Esterio, Auger, Ramos, & Araneda, 2014), por lo que encontrar nuevas estrategias y compuestos para controlar estas infecciones no es sólo un tema de minimizar las cuantiosas pérdidas monetarias que la industria sufre, sino que también ofrecer alternativas más amigables con el medio ambiente, la salud de los trabajadores de la industria y la de los consumidores.

Considerando que hopano-6 α ,22-diol (**7**) posee actividad antifúngica, cobra sentido pensar que otros metabolitos liquénicos de estructuras similares tendrán un potencial en el uso de estos como productos antifúngicos que permitan controlar las infecciones por el hongo *Botrytis cinerea*.

2. HIPÓTESIS.

En base a los antecedentes antes mencionados la hipótesis de este trabajo es que, metabolitos liquénicos con esqueleto de hopano y compuestos obtenidos por modificaciones estructurales de estos, tendrán actividad antifúngica contra el hongo *Botrytis cinerea*.

3. OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL

Aislar hopanos liquénicos desde *P. Divulsa*, y obtener derivados sintéticos de estos. Evaluar la actividad de los compuestos obtenidos contra *Botrytis cinerea*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Aislar y purificar compuestos de la serie del hopano desde el liquen *Pseudocyphellaria divulsa*, como: hopan-7 β ,22-diol (**6**), hopan-6 α ,22-diol (**7**), 7 β -acetoxihopan-22-ol (**9**)
- ✓ Obtener derivados acetilados de los compuestos naturales aislados.
- ✓ Realizar la oxidación de los grupos hidroxilo en diferentes posiciones para la obtención de grupos carbonilo en los compuestos naturales.
- ✓ Realizar reacciones de lactonización de los compuestos con fragmento cetónico.
- ✓ Evaluar actividad fungicida de los metabolitos y sus derivados contra *Botrytis cinerea*.

4. METODOLOGÍA.

4.1 Análisis Químico

4.1.1 Materiales y equipos

Materiales

- ✓ Clorocromato de piridina
- ✓ Ácido meta-cloroperoxibenzoico
- ✓ Anhídrido trifluoroacético
- ✓ Peróxido de hidrógeno
- ✓ Anhídrido Acético
- ✓ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$
- ✓ Hanesian
- ✓ Cromatoplasmas de sílice gel Merck 60 F254
- ✓ Sílice gel Merck 60 G de 0.032-0.063 nm
- ✓ Papel filtro
- ✓ Material de vidrio Glassco ®
- ✓ Solventes orgánicos grado: acetato de etilo, diclorometano, metanol, hexano p.a.

Equipos

- ✓ Balanza analítica RADWAG ® AS220/cC/2
- ✓ Rotavapor Buchi ® R210
- ✓ Lámpara UV (254nm y 365nm) Viber Loumat ®
- ✓ Espectrofotómetro (RMN) Bruker Spectrometer ® model AVANCE 400
- ✓ Placa calefactora/ agitador magnético Fargo ® HMS-102 Thermolyne (50-350°C)
- ✓ Cámara de flujo laminar clase II ESCO ®
- ✓ Medidor de punto de fusión Stuart-Scientific SMP3
- ✓ Polarímetro Polax-2L

4.1.2 Procedimientos generales

Espectros de resonancia magnética nuclear (RMN)

Los espectros de resonancia magnética nuclear (^1H -RMN y ^{13}C -RMN), se registraron en un Espectrofotómetro Bruker Spectrometer ® model AVANCE 400; ^1H a 400 MHz y ^{13}C a 100,623 MHz. Las muestras fueron disueltas en cloroformo deuterado (CDCl_3). Como referencia interna se utilizó tetrametilsilano (TMS). Los desplazamientos químicos se expresan en escala de ppm (partes por millón) y las constantes de acoplamiento J , en Hz

Abreviaturas utilizadas en RMN:

s:	singlete
dd:	doble doblete
dt:	doble triplete
Hz:	Hertz
ppm:	partes por millón

Espectros IR

Los espectros de IR se registraron en un espectrofotómetro RAYLEIGH WQF-510^a FTIR, repitiéndose las medidas 64 veces.

Cromatografía en capa fina (CCF)

Los cromatogramas se realizaron en cromatofolios de aluminio con gel de sílice Merck ® 60 F 254. La cromatografía se desarrolló con mezclas de AcOEt/hexano y AcOEt/diclorometano, en las proporciones adecuadas para cada caso. Los cromatogramas se revelaron con luz ultravioleta (254 nm) y/o con mezcla Hanessian, calentando posteriormente a 120°C.

Cromatografía en columna (CC)

Las CC se realizaron en gel de sílice Merck ® 60 G de 0,032- 0,063mm, eluidas con mezclas de AcOEt/Hexano en polaridad creciente.

Puntos de fusión

Los puntos de fusión (p.f.) se determinaron en un equipo Stuart-Scientific SMP10.

Rotaciones específicas ($[\alpha]_D$)

Se determinaron en un polarímetro Polax-2L con una lámpara LED ($\lambda=589$ nm, en línea D) en una celda de 1 dm. Las mediciones se realizaron en solución clorofórmica. Las concentraciones se expresan en gramos por 100 mL.

Extracción y purificación de los compuestos liquénicos

Pseudocyphellaria divulsa (Taylor) Imshaug se recolectó en el parque nacional Queulat y a 10 Km de Caleta Tortel, en la Región de Aysén, en el año 2007. Especímenes de estas recolecciones se encuentran depositados en el herbario de Líquenes (UV) de la Facultad de Farmacia, Universidad de Valparaíso.

El material liquénico se limpió bajo lupa para eliminar restos orgánicos y partículas de roca y tierra. Se secó a 60°C para determinar su peso seco y se trituró para su análisis. El peso seco obtenido fue de 352,3 g.

El material liquénico se sometió a extracciones sucesivas, a temperatura ambiente, durante 72 horas con hexano. Posteriormente el extracto obtenido se concentró en un rotavapor a presión reducida.

Extracto hexano

El concentrado de hexano (14,52 g) se purificó mediante CC utilizando como eluyente una mezcla de hexano-acetato de etilo con polaridad creciente. Se recogieron fracciones de aproximadamente 5 mL que fueron agrupadas mediante patrones de similitud por CCF, aislándose 4 compuestos. El primero corresponde a un sólido blanco, rotulado como Q01 (6,03 g), el segundo, tercer y cuarto compuesto comparten la misma apariencia física que el primer compuestos y son rotulados como Q02 (0,87 g), Q03 (0,76 g) y Q04 (0,35 g) respectivamente. (fig. 3)

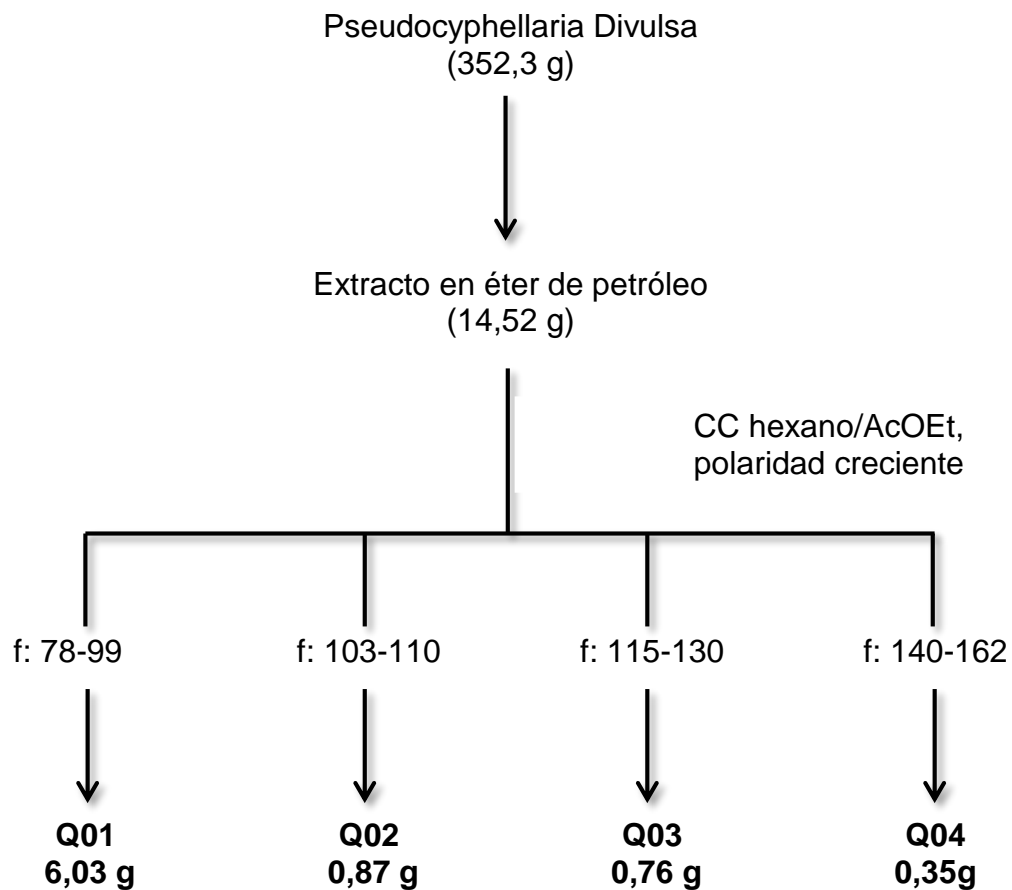


Figura 3 Esquema de separación del extracto de hexano

4.2 Determinación de actividad biológica; Ensayo de inhibición de crecimiento micelial *in vitro* de Botrytis.

4.2.1 Materiales

- ✓ Agar PDA
- ✓ Glucosa
- ✓ Agar
- ✓ Placas de Petri
- ✓ Incubador
- ✓ Placas de 12 pocillos
- ✓ Medio de cultivo PDA
- ✓ Captan® > Ácido tricloroacético (TCA) y ácido acético

4.2.2 Procedimientos Generales

Mediante la realización del Test de Envenenamiento Radial se determinó la efectividad de los compuestos obtenidos sobre el crecimiento micelial de *B. cinerea*. Este ensayo consiste en sembrar un disco del inóculo (4 mm) crecido del patógeno en el centro de una placa de Petri de 5 cm de diámetro, la cual posee medio de cultivo PDA (agar papa dextrosa, Difco™) más la adición de los compuestos a estudiar en tres concentraciones distintas (50, 150 y 250 ppm) evaluadas de forma independiente y por triplicado. Las placas se introducen en una cámara de cultivo con fotoperiodo controlado bajo un régimen de 16/8 horas de luz/oscuridad a 23 °C.

Posterior a las 72 horas de post-inoculación, se evalúa el halo de crecimiento del

patógeno en presencia de los compuestos mencionados para calcular el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del hongo con respecto al control negativo.

Los controles utilizados en este ensayo corresponden a:

- Control Negativo: consiste en el crecimiento de *B. cinerea* cepa UK en medio PDA más etanol al 1%.
- Control Positivo: consiste en el crecimiento de *B. cinerea* en medio PDA y en presencia del fungicida comercial Captan®; a las tres concentraciones evaluadas en los compuestos, 50, 150 y 250 ppm.

El porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del hongo, para cada tratamiento, se realizó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de inhibición promedio de cada tratamiento} = \frac{c - t}{c} * 100$$

Dónde:

c = Promedio del área del crecimiento micelial de las 3 réplicas del control negativo (C⁻).

t = Promedio del área del crecimiento micelial de las 3 réplicas en presencia del compuesto adicionado.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

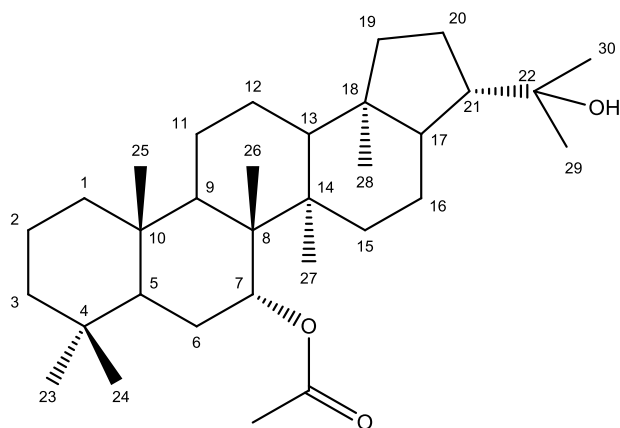
5.1 Rendimientos experimentales

Aislación e identificación de metabolitos liquénicos.

Los metabolitos liquénicos presentes en *P. Divulsa*, han sido descritos con anterioridad (Medel, 2008). En estos reportes se indica que metabolitos de la serie del hopano se obtienen en el extracto de hexano. Por esta razón se realizó la extracción de los metabolitos únicamente con este solvente.

Desde el extracto en hexano de *P. Divulsa*, se aislaron 4 compuestos rotulados como Q01, Q02, Q03 y Q04. Mediante sus datos espectroscópicos (Tablas 2-5) y comparación con datos bibliográficos, estos fueron identificados como:

Q01: 7 β -acetoxihopan-22-ol (C₃₂H₅₄O₃)



9

IR (KBr): 3521, 2997, 2947, 2870, 1724, 1466, 1373, 1254. $[\alpha]_D^{25} = +26,0$ (CHCl₃ c 0,71).

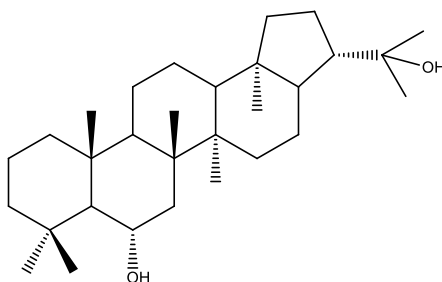
Tabla 2.

Resumen de la asignación espectroscópica ¹H-RMN y ¹³C-RMN del compuesto **9**.

H/C	δ H	δ C	H/C	δ H	δ C
1		40,1	17		53,2
2		18,5	18		44,0
3		41,7	19		41,4
4		33,1	20		26,4
5		52,7	21		51,1
6		25,7	22		73,8
7	5,07 (dd, $J = 5,2; 10,8$ Hz)	75,9	23	0,85 (3H, s)	33,1
8		46,3	24	0,77 (3H, s)	21,4
9		50,5	25	0,82 (3H, s)	15,5
10		37,2	26	1,07 (3H, s)	12,5
11		20,4	27	1,02 (3H, s)	17,8
12		23,9	28	0,74 (3H, s)	16,0
13		49,9	29	1,19 (3H, s)	28,7
14		43,2	30	1,16 (3H, s)	30,8
15		36,6	COCH ₃		170,5
16		22,3	COCH ₃	1,96	21,9

Los datos espectroscópicos del compuesto obtenido concuerdan con lo que describe la literatura (Corbett & Wilkins, 1977) (L.Wilkins, Ronaldson, & Jager, 1987).

Q02: hopan-6 α ,22-diol (C₃₀H₅₂O₂)



7

IR (KBR): 3292, 3005, 2939, 2866, 1464, 1385, 1161, 1041. $[\alpha]_D = +63,3$ (CHCl₃ c 0,56).

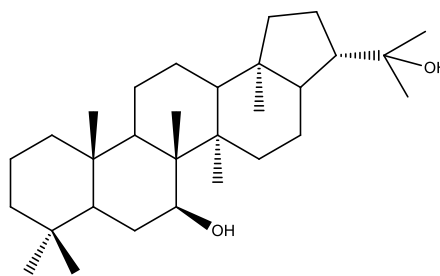
Tabla 3

Resumen de la asignación espectroscópica ¹H-RMN y ¹³C-RMN del compuesto 7.

H/C	δ H	δ C	H/C	δ H	δ C
1		41,2	16		53,9
2		18,5	17		44,0
3		40,3	18		43,8
4		33,6	19		26,6
5		61,0	20		51,1
6	3,95 (dt, $J = 4,2; 10,6$ Hz)	69,2	21		73,9
7		45,4	22		36,7
8		42,8	23	1,01 (3H, s)	22,1
9		49,4	24	0,86 (3H, s)	17,1
10		39,3	25	0,99 (3H, s)	18,3
11		21,0	26	1,20 (3H, s)	17,1
12		24,0	27	1,06 (3H, s)	16,1
13		49,7	28	0,76 (3H, s)	30,9
14		41,9	29	1,24 (3H, s)	30,9
15		34,3	30	1,22 (3H, s)	170,5

Los datos espectroscópicos del compuesto obtenido concuerdan con lo que describe la literatura (Corbett & Wilkins, 1977) (L.Wilkins, Ronaldson, & Jager, 1987).

Q03: hopan-7 β ,22-diol (C₃₀H₅₂O₂)



6

IR (KBr): 3402, 2997, 2947, 2870, 2844, 1458, 1387, 1169, 1038. $[\alpha]_D = +23,0$ (CHCl₃ c 0,64).

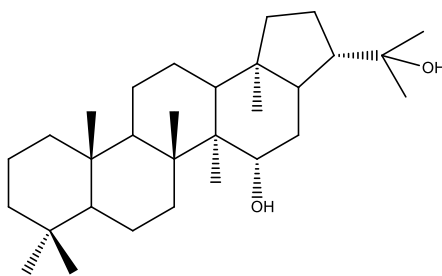
Tabla 4

Resumen de la asignación espectroscópica ¹H-RMN y ¹³C-RMN del compuesto **6**.

H/C	δ H	δ C	H/C	δ H	δ C
1		40,2	16		22,2
2		18,6	17		53,1
3		41,8	18		44,1
4		33,2	19		41,4
5		50,0	20		26,4
6	3,88 (dd, $J= 5,0; 10,8$ Hz)	33,0	21		47,6
7		73,8	22		73,4
8		47,6	23	0,86 (3H, s)	33,2
9		50,4	24	0,79 (3H, s)	21,4
10		37,4	25	0,76 (3H, s)	15,5
11		20,6	26	1,03 (3H, s)	11,2
12		24,1	27	0,97 (3H, s)	17,7
13		51,1	28	0,80 (3H, s)	16,1
14		43,4	29	1,21 (3H, s)	28,8
15		38,4	30	1,17 (3H, s)	30,8

Los datos espectroscópicos del compuesto obtenido concuerdan con lo que describe la literatura (Corbett & Wilkins, 1977) (L.Wilkins, Ronaldson, & Jager, 1987).

Q04 hopan-15 α ,22-diol (C₃₀H₅₂O₂)



10

IR (KBr): 3410, 2991, 2958, 2871, 1464, 1375, 1147, 930. $[\alpha]_D^{25} = +34$ (CHCl₃ c 1,30).

Tabla 5

Resumen de la asignación espectroscópica ¹H-RMN y ¹³C-RMN del compuesto **10**.

H/C	δ H	δ C	H/C	δ H	δ C
1		40,4	16		32,5
2		18,7	17		50,3
3		41,9	18		44,2
4		33,2	19		40,8
5		55,7	20		26,9
6		18,9	21		50,5
7		36,7	22		73,7
8		43,5	23	0,78 (3H, s)	33,3
9		50,4	24	0,82 (3H, s)	21,6
10		37,5	25	0,84 (3H, s)	15,7
11		20,8	26	0,99 (3H, s)	17,4
12		24,0	27	1,04 (3H, s)	11,7
13		48,9	28	0,76 (3H, s)	15,8
14		47,1	29	1,20 (3H, s)	28,6
15	3,84 (1H, dd, J= 5,2; 9,9 Hz)	74,8	30	1,17 (3H, s)	30,9

Los datos espectroscópicos del compuesto obtenido concuerdan con lo que describe la literatura (Corbett & Wilkins, 1977) (L.Wilkins, Ronaldson, & Jager, 1987).

Los rendimientos totales obtenidos a partir del peso seco de la muestra inicial son los siguientes:

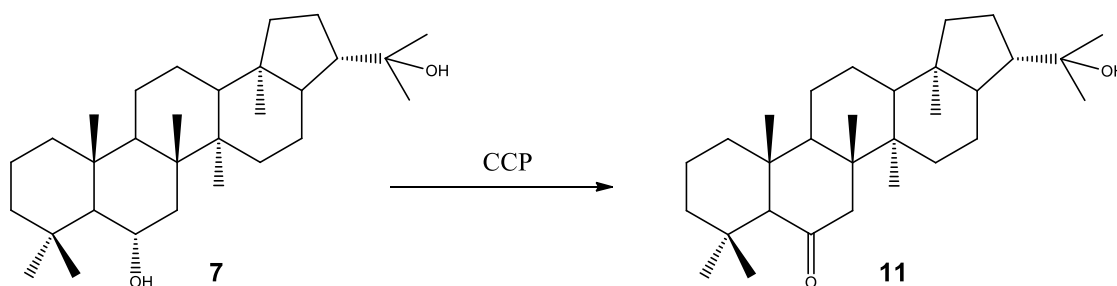
Tabla 6. Rendimientos totales de metabolitos aislados.

Metabolito	Masa obtenida	Rendimiento (%)
7βAcetoxihopan-22-ol (9)	6,03 g	1,71
Hopan-6α,22-diol (7)	0,87 g	0,25
Hopan-7β,22-diol (6)	0,76 g	0,22
Hopan-15α,22-diol (10)	0,35 g	0,10

5.2 Obtención de derivados.

Oxidación de hopano-6 α ,22-diol (**7**)

La oxidación de hopano-6 α ,22-diol (**7**) se llevó a cabo con clorocromato de piridinio (CCP), reactivo comúnmente utilizado para oxidar alcoholes. Así se obtuvo 6-oxo-hopano-22-ol (**11**) con un 91% de rendimiento. (Esquema 1).



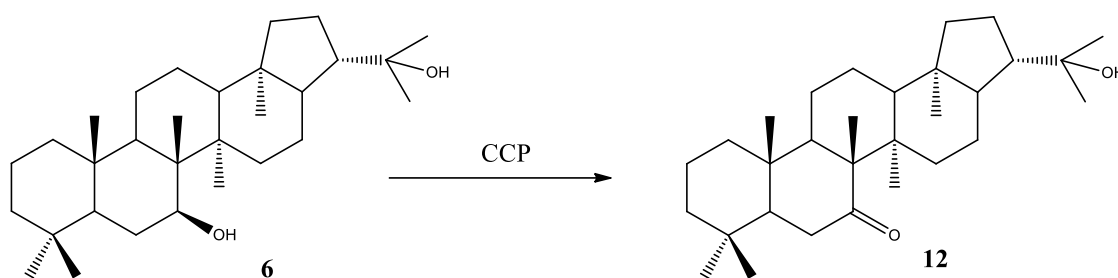
Esquema 1. Oxidación de hopano-6 α ,22-diol (**7**), obtención de 6-oxo-hopano-22-ol (**11**)

La asignación estructural del compuesto **11** está fundamentada en que la señal a $\delta = 3,95$ (dt, $J = 4,2; 10,6$ Hz) asignada como el protón carbinólico H-6 en **7** desaparece en el compuesto obtenido. Por otra parte, la presencia de una señal a $\delta = 215,0$ ppm, en el espectro de ^{13}C -RMN, corresponde al carbono carbonílico generado en la reacción, lo que confirma la estructura del producto **11**. La asignación espectroscópica se encuentra resumida en la tabla 7.

IR (KBr): 3446, 2981, 2868, 2844, 1695, 1471, 1388, 1361, 1171, 955.

Oxidación de hopan-7 β ,22-diol (**6**)

La oxidación de hopan-7 β ,22-diol (**6**) se llevó a cabo bajo las mismas condiciones anteriores. De esta manera se obtuvo 7-oxo-hopan-22-ol (**12**) con un 58% de rendimiento. (Esquema 2)



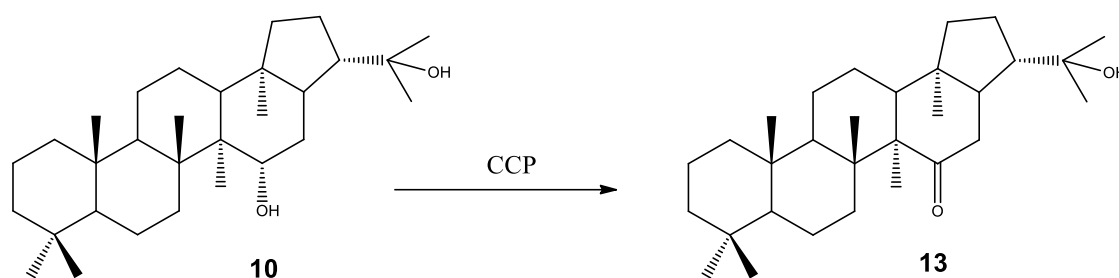
Esquema 2. Oxidación de hopan-7 β ,22-diol (**6**), obtención de 7-oxo-hopan-22-ol (**12**)

La asignación del compuesto **12**, está fundamentada en base a lo anteriormente mencionado, es decir, la desaparición de la señal a $\delta = 3,88$ ppm (dd, $J = 5,0; 10,8$ Hz) asignada como el protón carbinólico H-7, y la presencia de una señal a $\delta = 215,4$ ppm en ^{13}C -RMN, correspondiente a la cetona en C-7 de **12** (Tabla 7).

IR (KBr): 3462, 2952, 2870, 1697, 1460, 1388, 1252, 1161, 939.

Oxidación de hopan-15 α ,22-diol (**10**)

La oxidación de hopan-15 α ,22-diol (**10**) se llevó a cabo bajo las mismas condiciones anteriores. Con esta reacción se obtiene la cetona 15-oxo-hopan-22-ol (**13**) con un 72% de rendimiento. (Esquema 3)



Esquema 3. Oxidación hopan-15 α ,22-diol (**10**), obtención de 15-oxo-hopan-22-ol (**13**)

En el espectro $^1\text{H-RMN}$ del producto se observa la desaparición de la señal a $\delta = 3,84$ (1H, dd, $J = 5,2; 9,9$ Hz) asignada como el protón carbinólico H-15. Por otro lado se observa en el espectro de $^{13}\text{C-RMN}$ la aparición de una señal a $\delta = 214,7$ ppm correspondiente a la cetona en C-15, esto confirma la estructura del producto **13** (Tabla 7).

IR (KBr): 3479, 2999, 2939, 2862, 1684, 1456, 1387, 1361, 1171, 1142, 1022, 949.

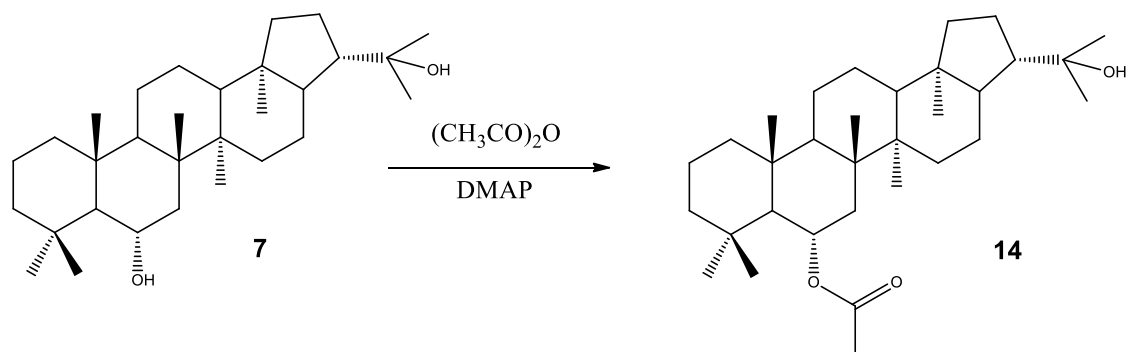
Los datos de $^{13}\text{C-RMN}$ de los compuestos **11**, **12** y **13** se pueden observar en la tabla 7. Los datos espectroscópicos concuerdan con lo que describe la literatura (Corbett & Wilkins, 1977) (L.Wilkins, Ronaldson, & Jager, 1987).

Tabla 7:
 Datos de ^{13}C -RMN de los compuestos 11, 12 y 13

C	δC 11	δC 12	δC 13
1	40,8	40,4	40,4
2	18,6	18,4	18,8
3	42,6	41,7	41,9
4	32,5	33,4	33,2
5	66,4	53,0	56,3
6	213,9	37,0	18,8
7	51,4	215,4	34,2
8	48,5	58,3	43,0
9	50,7	54,0	50,6
10	44,0	37,6	38,1
11	21,5	20,6	21,4
12	23,8	24,7	23,9
13	49,6	51,4	50,0
14	42,3	42,5	57,1
15	34,3	35,8	214,7
16	21,8	22,3	40,8
17	53,9	54,0	51,8
18	44,0	44,5	44,1
19	41,2	41,3	41,3
20	26,6	26,2	26,9
21	51,0	51,1	50,9
22	73,8	73,8	73,2
23	32,5	32,6	33,3
24	21,8	20,9	21,5
25	16,7	15,7	15,9
26	17,5	15,8	15,4
27	16,9	19,8	15,6
28	16,0	16,1	15,9
29	28,0	29,0	29,0
30	31,0	30,7	31,0

Acetilación de hopan-6 α ,22-diol (**7**)

La acetilación del hidroxilo en posición 6 del hopan-6 α ,22-diol (**7**) se realizó según protocolo de acetilación de alcoholes, utilizando anhídrido acético y DMAP como catalizador. Con esta reacción se obtuvo el compuesto **14** con un 89% de rendimiento. (Esquema 4)



Esquema 4. Acetilación de hopan-6 α ,22-diol (**7**), obtención de 6 α -acetoxihopan-22-ol (**14**)

En el espectro de ^1H -RMN se puede observar la aparición de una señal a $\delta = 2,03$ ppm (3H, s) que corresponde a los protones metílicos del acetato (COCH_3). Por otro lado en el espectro de ^{13}C -RMN se observa una señal a $\delta = 170,7$ ppm que confirma la presencia del grupo acetilo (COCH_3).

IR (KBr): 3558, 3003, 2924, 2875, 1720, 1464, 1365, 1265, 1146, 1024, 949.

Los datos espectroscópicos del compuesto obtenido concuerdan con lo que describe la literatura (Huneck & Yoshimura, 1996), los cuales se pueden observar en la Tabla 8.

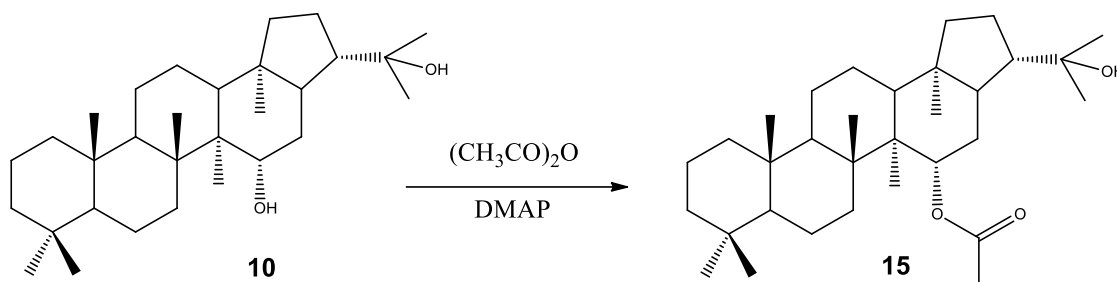
Tabla 8

Resumen de la asignación espectroscópica ^1H -RMN y ^{13}C -RMN del compuesto **14**.

H/C	δH	δC	H/C	δH	δC
1		41,2	17		53,9
2		18,4	18		43,9
3		40,1	19		43,5
4		32,2	20		26,6
5		58,4	21		51,0
6	5,22 (dt, $J = 7,3; 11,40$ Hz)	72,0	22		73,9
7		40,9	23	0,85 (3H, s)	36,3
8		42,7	24	0,77 (3H, s)	22,1
9		49,3	25	0,82 (3H, s)	17,0
10		39,5	26	1,07 (3H, s)	18,0
11		21,0	27	1,02 (3H, s)	17,0
12		23,9	28	0,74 (3H, s)	16,1
13		49,7	29	1,19 (3H, s)	30,9
14		42,0	30	1,16 (3H, s)	30,9
15		34,3	<u>C</u> OCH ₃		170,37
16		21,8	CO <u>C</u> H ₃	2,03 (3H, s)	21,9

Acetilación de hopan-15 α ,22-diol (**10**)

La acetilación del hidroxilo en posición 15 de hopan-15 α ,22-diol (**10**) se realizó bajo las mismas condiciones anteriores. De esta forma se obtuvo el compuesto **15** con un 80% de rendimiento. (Esquema 5)



Esquema 5. Acetilación de hopan-15 α ,22-diol (**10**), obtención de 15 α -acetoxihopan-22-ol (**15**)

En el espectro de ^1H -RMN se puede observar la aparición de una señal a $\delta = 1,97$ ppm (3H, s) que corresponde a los protones metílicos del acetato (COCH_3). Por otro lado en el espectro de ^{13}C -RMN se observa una señal a $\delta = 171,4$ ppm que confirma la presencia del grupo acetilo (COCH_3). Los datos de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN se pueden observar en la tabla 9.

IR (KBr): 3330, 2951, 2870, 1732, 1693, 1456, 1373, 1244.

Tabla 9:

Resumen de la asignación espectroscópica ^1H -RMN y ^{13}C -RMN del compuesto **15**.

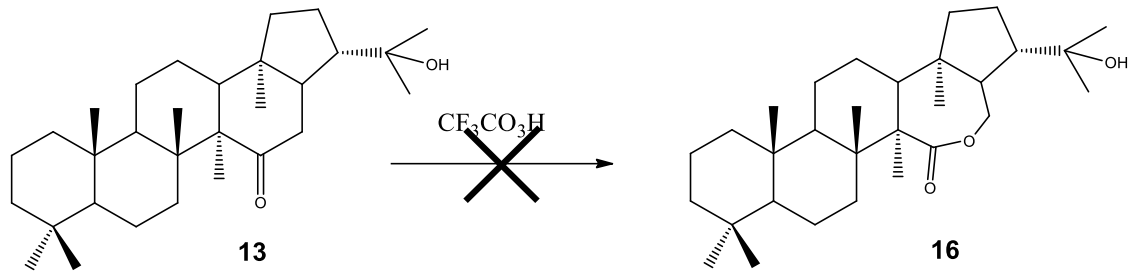
H/C	δH	δC	H/C	δH	δC
1		40,4	17		50,1
2		18,7	18		44,0
3		42,0	19		40,8
4		33,1	20		26,9
5		55,5	21		50,4
6		19,0	22		73,6
7		35,0	23	0,78 (3H, s)	33,4
8		43,3	24	0,82 (3H, s)	21,5
9		50,4	25	0,84 (3H, s)	15,8
10		37,5	26	0,99 (3H, s)	17,4
11		20,7	27	1,04 (3H, s)	12,9
12		23,8	28	0,76 (3H, s)	15,8
13		49,0	29	1,20 (3H, s)	28,5
14		45,9	30	1,17 (3H, s)	31,0
15	5,02 (dd, J= 5,0; 10,4 Hz)	76,9	<u>COCH₃</u>		170,7
16		28,5	<u>COCH₃</u>	2,16 (3H, s)	22,0

Los datos espectroscópicos de los compuestos obtenidos concuerdan con lo que describe la literatura (Corbett & Wilkins, 1977) (L.Wilkins, Ronaldson, & Jager, 1987).

Intento de lactonización del compuesto 15-oxo-22-hopanol (13)

En intento de lactonización del compuesto **13** se realizó mediante el método de Baeyer Villiger, con ácido trifluoroperoxiacético como agente oxidante (Takatsuto & Ikekawa, 1983) (Placeholder1), en diclorometano como solvente. Bajo estas

condiciones la lactona (**16**) no se generó, sin embargo como sub-producto de la reacción se obtuvo el compuesto **17** con un 15% de rendimiento.



Esquema 6. Intento de lactonización de 15-oxo-22-hopanol.

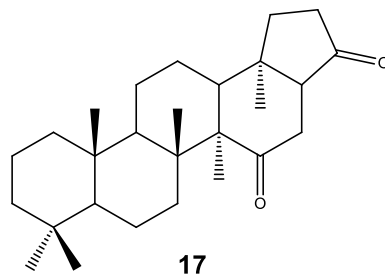
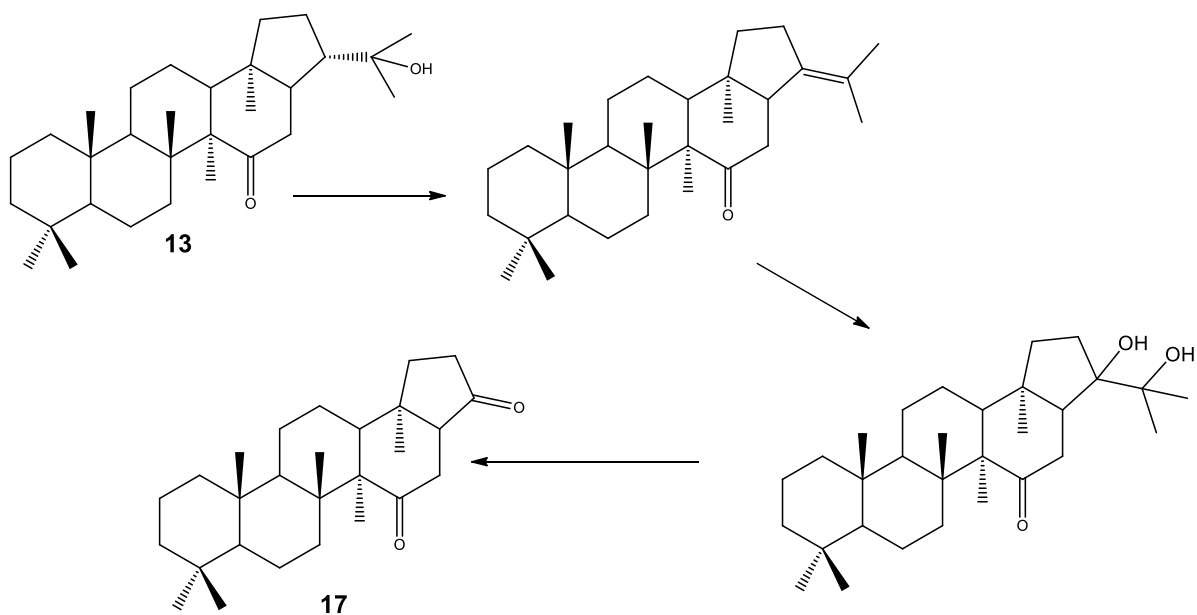


Figura 4: Subproducto de la reacción de oxidación de 15-oxo-22-hopanol.

La obtención del compuesto **17** puede explicarse según el esquema 7, en donde la condición ácida generada en el medio favorece la deshidratación del grupo OH de la posición 22, la cual puede ser transformada en un glicol que por ruptura oxidativa daría origen al compuesto **17**, este tipo de productos también se ha reportado con otros agentes oxidantes sobre sustratos hopánicos (Abdellaoui & cols, 2005). La asignación espectroscópica del compuesto **17** se resume en la tabla 11. Donde, en el espectro de ^{13}C -RMN, se puede observar la presencia de

dos señales a 216,6 y 219,3 ppm los cuales corresponden a los dos grupos carbonílicos en las posiciones 15 y 21 respectivamente en su estructura.

IR (KBr): 2991, 2949, 2868, 1780, 1734, 1697, 1448, 1171.



Esquema 7. Posible ruta de oxidación para la formación de 15,21-dioxo-hopano.

Tabla 11.Resumen de la asignación espectroscópica ^{13}C -RMN del nuevo compuesto **17**.

C	δ 17
1	40,4
2	18,7
3	41,9
4	33,2
5	55,1
6	18,6
7	34,2
8	42,9
9	51,2
10	38,1
11	21,4
12	23,6
13	51,2
14	56,2
15	216,6
16	40,8
17	55,1
18	46,3
19	40,9
20	18,4
21	219,3
22	--
23	33,3
24	21,5
25	18,3
26	18,4
27	15,4
28	16,1

Actividad biológica de los compuestos:

Actividad antifúngica in vitro de *Botrytis cinerea*.

De los productos obtenidos, los compuestos **6, 7, 9, 10, 12, 13, 15**, fueron testeados en test de inhibición de crecimiento micelial de *Botrytis cinerea*. El compuesto **10** presenta una mejor inhibición de crecimiento a partir de los 150 mg/L, comportándose más activo a los 250 mg/L con un 85% de inhibición del crecimiento del patógeno (Figura 4) en comparación al control negativo. Si comparamos el compuesto **10** con **13** y **15** que poseen solo una variación en el anillo D, se puede observar que la actividad mejora cuando está presente un grupo hidroxilo en lugar de una función cetona o éster, respectivamente (Tabla 10).

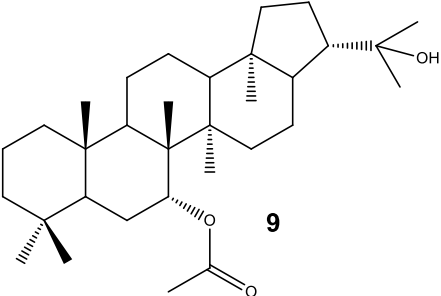
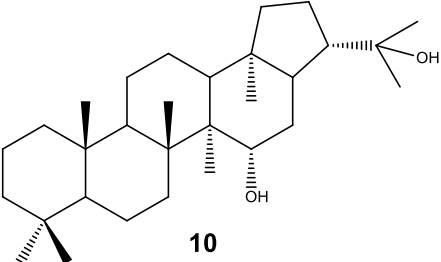
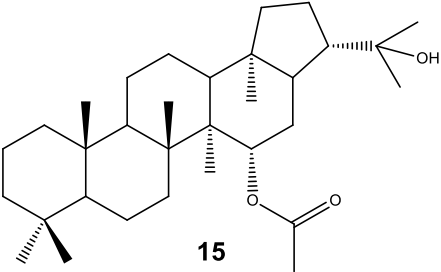
Igualmente, si comparamos los compuestos **6, 7, 9 y 12**, podemos observar que cuando en el anillo B esta presenta un grupo hidroxilo como es el caso de **6** y **7** la actividad se presenta a partir de los 250 mg/L, independiente de la posición en el anillo; a diferencia de los otros dos compuestos **9** y **12** donde no existe inhibición a ninguna concentración utilizada cuando se encuentra un grupo cetona o éster.

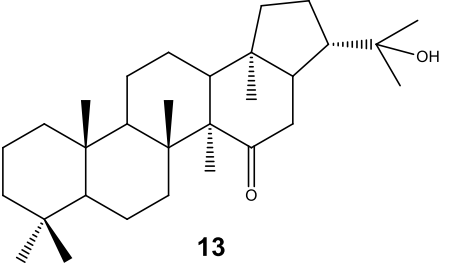
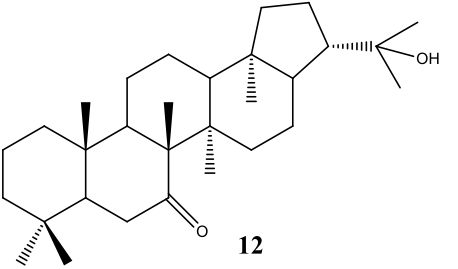
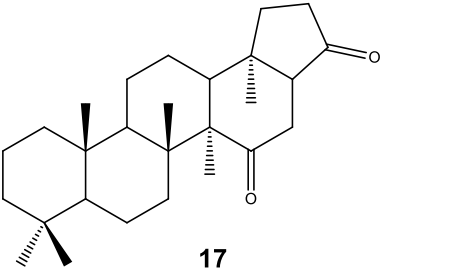
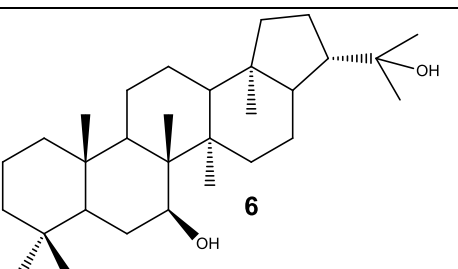
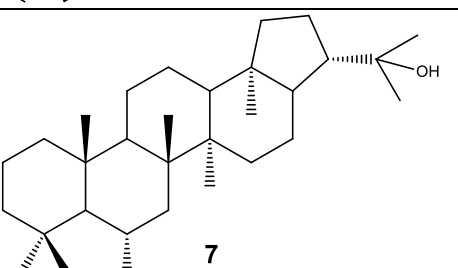
El control positivo utilizado presenta una mayor actividad que todos los compuestos probados, sin embargo, cabe destacar que la solubilidad de estos derivados del hopano es menos eficiente, lo cual podría disminuir su efecto sobre el patógeno. Por lo tanto, sería interesante poder probar la actividad antifúngica

con moléculas derivados de esta serie que posean grupos hidroxilos tanto en anillo B y D. Además, sería pertinente buscar algún transportador como un emulsificador o coadyuvante que permitiera solubilizar mejor los compuestos antes de la aplicación.

Tabla 10.

Efecto de compuestos liquénicos de la serie hopano sobre el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *B. cinerea* in vitro posterior a 72 horas de incubación

	Porcentaje de Inhibición del crecimiento micelial de <i>Botrytis cinerea</i> (%).		
	50 ppm	150 ppm	250 ppm
 <p>9</p>	0±0	0±0	0±0
 <p>10</p>	7±2,2	41±1,8	85±1,8
 <p>15</p>	0±0	0±0	86±1,5

 <p style="text-align: center;">13</p>	0 ± 0	$34\pm 3,8$	$46\pm 8,7$
 <p style="text-align: center;">12</p>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
 <p style="text-align: center;">17</p>	0 ± 0	0 ± 0	$86\pm 4,0$
 <p style="text-align: center;">6</p>	0 ± 0	0 ± 0	$87\pm 3,5$
 <p style="text-align: center;">7</p>	0 ± 0	0 ± 0	$90\pm 2,7$
Control Negativo (C-)	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Control Positivo (Captan)(C+)	± 0	100 ± 0	100 ± 0

* El porcentaje de inhibición del crecimiento micelial se basa en la medición del diámetro de la colonia después de 72 horas de incubación. Cada punto representa la media de tres réplicas de experimentos independientes \pm desviación estándar.

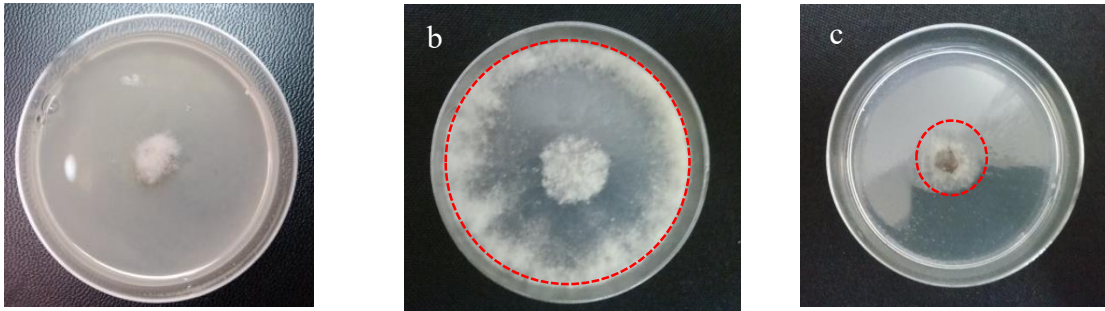


Figura 4. Efecto de compuesto liquénico derivado de la serie hopano sobre el crecimiento micelial de *B. cinerea*. (a)Control positivo, Captan; (b) Control Negativo, el medio contiene solo PDA y 1% de solvente; (c)compuesto 10. Concentración de Captan y compuesto 10 es 250 mg/L. La línea roja corresponde al diámetro de crecimiento en comparación al control negativo del compuesto testeado.

Se ha visto que los antifúngicos comúnmente utilizados muestran CIM < 32 mg/L, excepto a Carbedazim, donde en un ensayo, un 72,4% de los aislamientos fue capaz de crecer aún en presencia de este antifúngico a concentraciones de 160 mg/L (Gepp & cols, 2012). Según esto, se puede ver en la tabla 2, que ninguno de los compuestos aislados o sintetizados muestra actividad significativa sobre el hongo *Botrytis cinerea in vitro*. Se plantea además la necesidad de efectuar las pruebas en un modelo *in vivo* o en otras cepas del hongo *Botrytis cinerea*, que presenta una gran variabilidad de sensibilidad a los distintos antifúngicos según su cepa (Gepp & cols, 2012).

6. CONCLUSIONES.

Se logró purificar los compuestos 7 β -acetoxihopan-22-ol (**9**), hopan-6 α ,22-diol (**7**), hopan-7 β ,22-diol (**6**), y hopano-15 α ,22-diol (**10**) de *P. Divulsa*. De éstos, el compuesto 10 no se encontraba reportado para *P. Divulsa* en la bibliografía consultada (Medel, 2008).

Se obtuvieron los compuestos acetilados **14** y **15** con buen rendimiento (89%, 80%) a partir de los compuestos naturales hopan-6 α ,22-diol (**7**) y hopan-15 α ,22-diol (**10**) respectivamente.

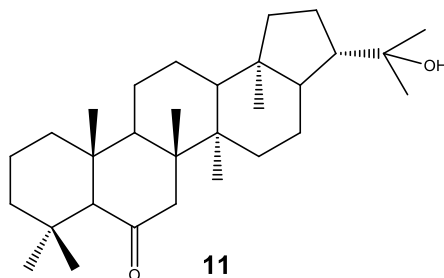
La oxidación con PCC de hopan-6 α ,22-diol (**7**), hopan-7 β ,22-diol (**6**) y hopan-15 α ,22-diol (**15**) fue exitosa, con rendimientos de 91, 58 y 72% respectivamente

El intento de formación de una lactona mediante la oxidación de Baeyer-Villiger en el compuesto **13** fue infructuosa en la obtención del producto esperado **16**. Sin embargo, se logró obtener un subproducto de la reacción (**17**) que presenta dos grupos carbonílicos en su estructura, en las posiciones 15 y 21 del esqueleto hopano.

Respecto de la evaluación de la actividad biológica, en general, se puede decir que los derivados naturales y sintéticos obtenidos a partir de *P. Divulsa* no presentan actividad antifúngica significativa en comparación con los antifúngicos utilizados en la industria actualmente, sin embargo cabe destacar que el compuesto **10** presenta la mayor capacidad de inhibición de crecimiento fúngico a 150 mg/L, y que modificaciones al hidroxilo del anillo D de la molécula disminuyen su actividad antifúngica ante *Botrytis cinerea*.

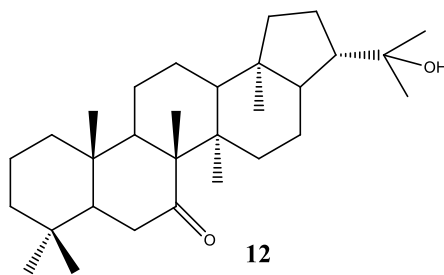
7. EXPERIMENTAL.

Síntesis de 6-oxo-hopan-22-ol (11)



A una solución de 150 mg de hopano-6 α ,22-diol (0,67 mmoles) disueltos en 50 mL de CH₂Cl₂ se agregan 250 mg (1,16 mmoles) de clorocromato de piridinio, manteniendo la reacción en agitación por 24 horas. El producto resultante se purificó mediante CC y se concentró, obteniéndose un sólido blanco (137 mg, 91% R) pf= 222 – 226°C. [α]_D= +25,2 (CHCl₃ c 0,39).

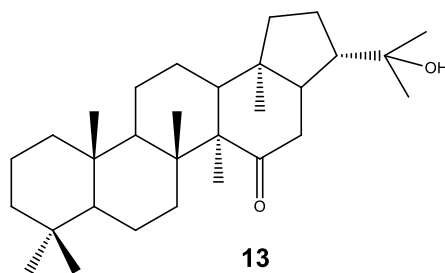
Síntesis de 7-oxo-hopan-22-ol (12)



12

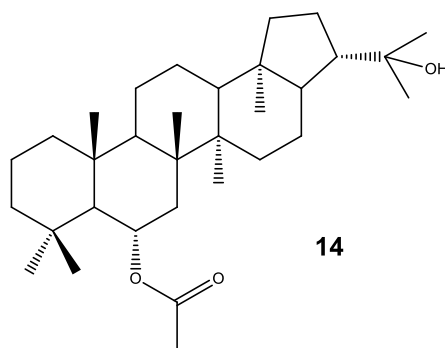
A una solución de 550 mg de hopan-7 β ,22-diol (0,76 mmoles) disueltos en 50 mL de CH₂Cl₂ se agregan 300 mg (1,39 mmoles) de clorocromato de piridinio, manteniendo la reacción en agitación por 24 horas. El producto resultante se purificó mediante CC y se concentró, obteniéndose un sólido blanco (320 mg, 58%R), pf= 209 – 212°C.

Síntesis de 15-oxo-hopan-22-ol (13)



A una solución de 337 mg de hopan-15 α ,22-diol (0,67 mmoles) disueltos en 50 mL de CH₂Cl₂ se agregan 250 mg (1,16 mmoles) de clorocromato de piridinio, manteniendo la reacción en agitación por 24 horas. El producto resultante se purificó mediante CC y se concentró, obteniéndose un sólido blanco (243 mg, 72% R) pf= 134 – 140°C.

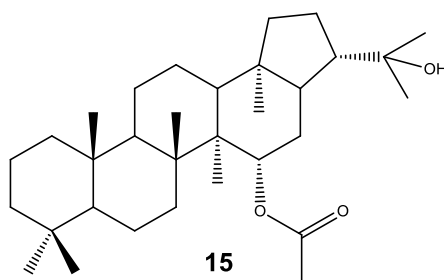
Síntesis de 6 α -Acetoxihopan-22-ol (14)



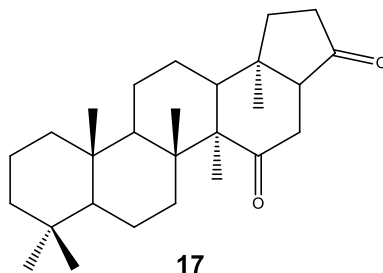
A una solución de 100 mg (0,20 mmoles) de hopan-6 α ,22-diol en 40 mL de diclorometano se adicionó 2,3 mL de (CH₃CO)₂O en presencia de DMAP como catalizador. La reacción fue mantenida bajo agitación a temperatura ambiente por 24 horas. La desaparición total del material de partida fue monitoreada y confirmada mediante el método CCF (AcOEt : n-hexano 30%). El producto final

fue sometido a extracción diclorometano/agua. La fase orgánica se concentró y se purificó mediante CC, obteniendo al final un sólido blanco (97 mg, 89% R) $pf= 170 - 175^{\circ}C$. $[\alpha]_D= +78,1$ ($CHCl_3$ c 0,64).

Síntesis de 15 α -acetoxihopan-22-ol (15)



A una solución de 300 mg de hopan-15 α ,22-diol (0,67 mmoles) en 40 mL de diclorometano se adicionó 2,3 mL de $(CH_3CO)_2O$ (24,33 mmoles) en presencia de DMAP como catalizador. La reacción fue mantenida bajo agitación a temperatura ambiente por 24 horas. La desaparición total del material de partida fue monitoreada y confirmada mediante el método CCF (AcOEt : n-hexano 30%). El producto final sometido a extracción con diclorometano/agua. La fase orgánica fue purificada en CC y concentrada, obteniéndose un sólido verde. (264 mg, 80,0% R) $pf= 170 - 175^{\circ}C$. $[\alpha]_D= +22,1$ ($CHCl_3$ c 0,58).

Síntesis de 15 α ,21-dioxo-hopano (17)

Para preparar el agente oxidante, el ácido trifluoroperoxiacético, se mezcló 0,4 mL de peróxido de hidrógeno 30% (3,92 mmoles) con 2,5 mL de anhídrido trifluoroacético (17,7 mmoles) a 0°C, bajo campana. Preparado el ácido trifluoroperoxiacético, éste se agregó por goteo lento a una solución del compuesto 7oxo,22-hopanol (0,34 mmoles) en diclorometano, agitando por 24 horas en atmósfera de nitrógeno. La mezcla fue tratada con 15 mL de una solución saturada de Na₂S₂O₅, manteniéndola en agitación por 1 hora. Al finalizar, la mezcla fue extraída por workup y separados sus compuestos por CC en polaridad creciente de AcOET en hexano. Se obtuvo 83 mg del producto mayoritario (16% R). pf= 133 – 137°C.

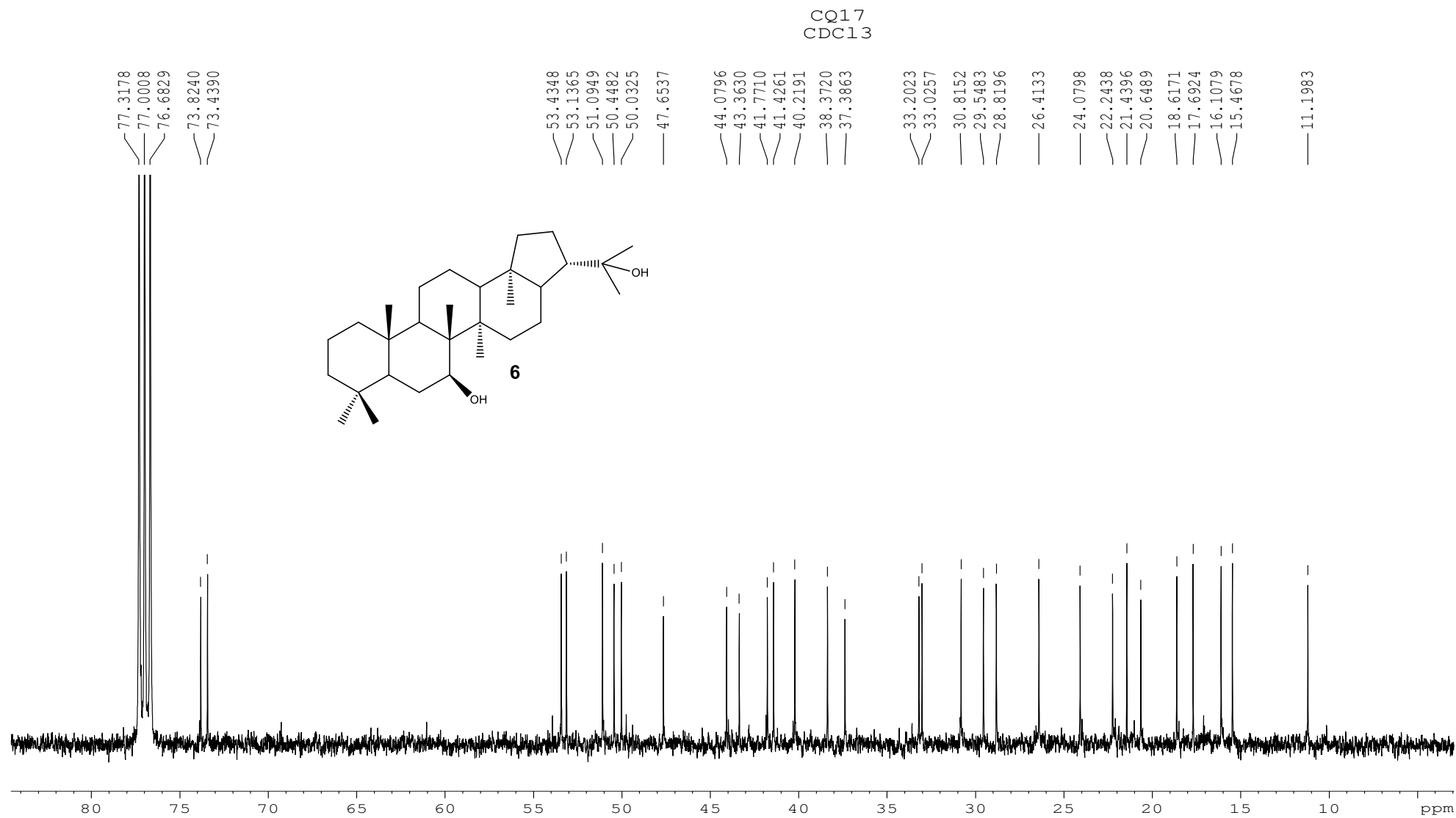
8. BIBLIOGRAFÍA.

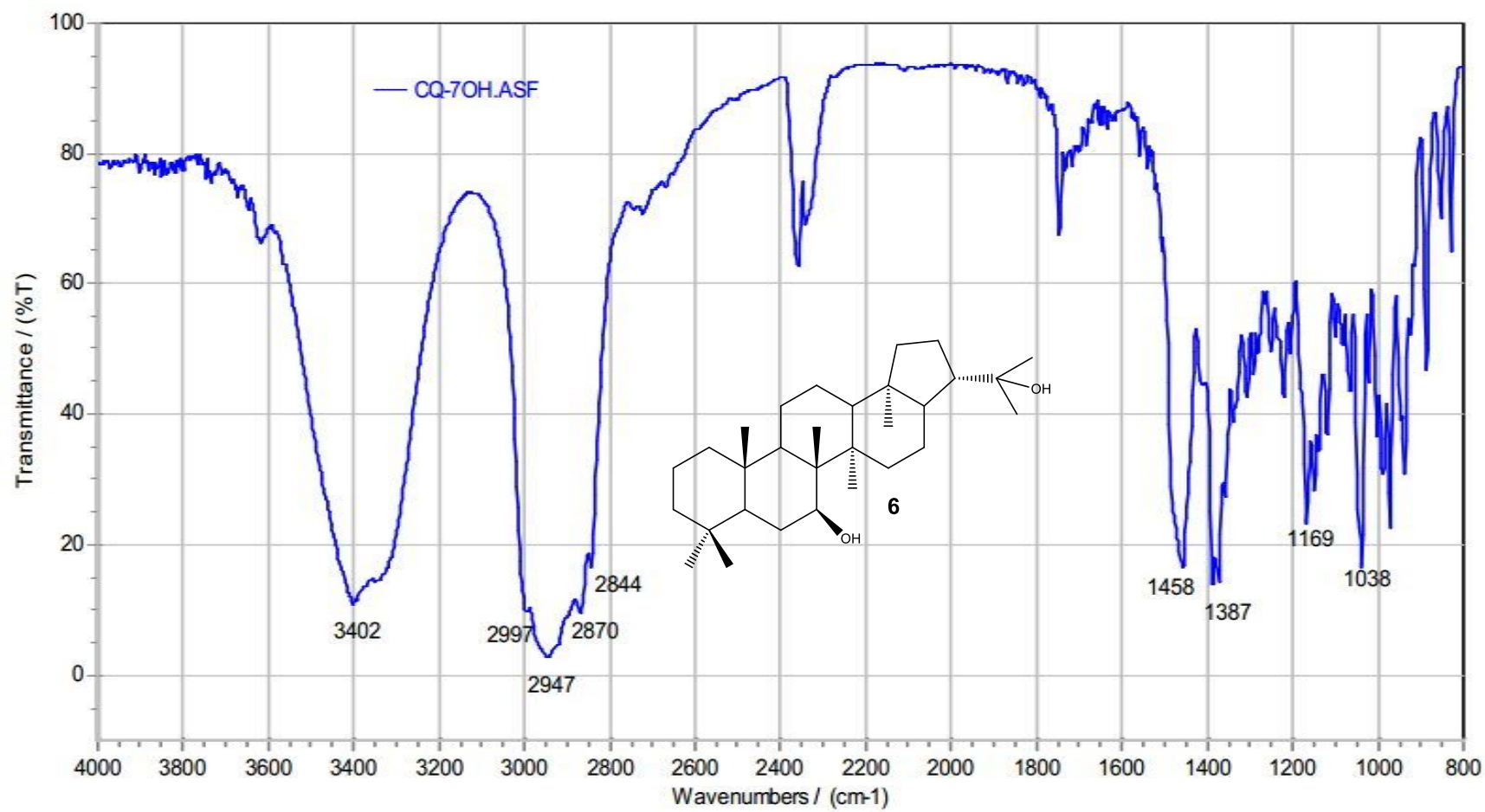
- Abdellaoui, Z., & cols, y. (2005). Du diploptérol vers la tétrahymanone: une transformation chimique simple de la série hopane en série gammacérane. *C. R. Chimie*, 8, 1960-1968.
- Begum, S., Syed, S., Siddiqui, S., Sattar, S., & Choudhary, M. (2013). Carandinol: first isohopane triterpene from the leaves of *Carissa Carabdas* L. and its cytotoxicity against cancer cell lines. *Phytochem. Lett.*, 6, 91-95.
- Benito, E., Arranz, M., & Eslava, A. (2000). Factores de patogenicidad de *Botrytis cinerea*. *Rev iber mic*, 17, 43-46.
- Colmenares, A., Durán-Patrón, R., Aleu, J., Collado, G., & Hernández-Galán, R. (2002). The Putative Role of Botrydial and Related Metabolites in the Infection Mechanism of *Botrytis cinerea*. *Journal of Chemical Ecology*, 28, 997-1005.
- Corbett, R. E., & Wilkins, a. A. (1977). Revised Structures for Hopane Triterpenoids Isolated from the Lichen *Pseudocyphellaria mougeotiana*. *Aust. J. Chem.*, 30, 2329-2332.
- Cuellar, M., Qulhot, W., Rubio, C., Soto, C., Espinoza, L., & Carrasco, H. (2008). Phenolics,depsidesand triterpenes from the Chilean lichen *Pseudocyphellaria Nudata* (Zahlbr.). *J. Chil. Chem. Soc.*, 53, 1624–1625.
- Díaz, B., Ugarte, R., Quilhot, W., Vera, A., & Gambaro, V. (1988). In vitro antibacterial activity of depsidone chlorate 1'-chloropannarine. *Rev latinoam microb*, 30(2), 30-79.
- Edder, P. (2009). Control strategies against grey mould (*Botrytis cinerea* Pers.: Fr) and corresponding fungicide residues in grapes and wines. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 26(5).
- Elix, J. (2008). Biochemistry and secondary metabolites. En H. Thomas, *Lichen Biology* (págs. 104-133). Cambridge: Cambridge University Press.
- Elix, J. (2014). *A catalogue of standarized Chromatographic Data and Biosynthetic Relationships for Lichen Substances* (3 ed.). Canberra.
- Esterio, M., Auger, J., Ramos, C., & Araneda, M. (2014). Botrytis en uva de mesa de exportación: PCR en Tiempo Real una innovadora herramienta tecnológica para la detección oportuna de resistencia a fungicidas. *Proyecto InnovaChile de CORFO*, 125, 1-8.
- Galloway, D. (1998). The lichens of Chile: present knowledge and future and prospects. (M. M. Seaward, Ed.) 69(1), 87-100.
- Gepp, V., & cols, &. (2012). Resistencia a fungicidas en *Botrytis cinerea* en el Uruguay. *Agrociencia Uruguay*, 16(1), 97-107.
- Gerard J. Tortora, B. R. (2007). Eucariontes: Hongos, algas, protozoos y helmitos. En *Introducción a la Microbiología* (pág. 355). México: Panamericana.
- Guzmán, G. (2008). Líquenes. En J. Rovira, *Biodiversidad de Chile, patrimonio y desafíos* (págs. 376-377). Santiago, Chile: Comisión nacional del medio ambiente.
- Huneck, S., & Yoshimura, I. (1996). *Identification of lichen substances*. Berlin, Alemania: Springer.

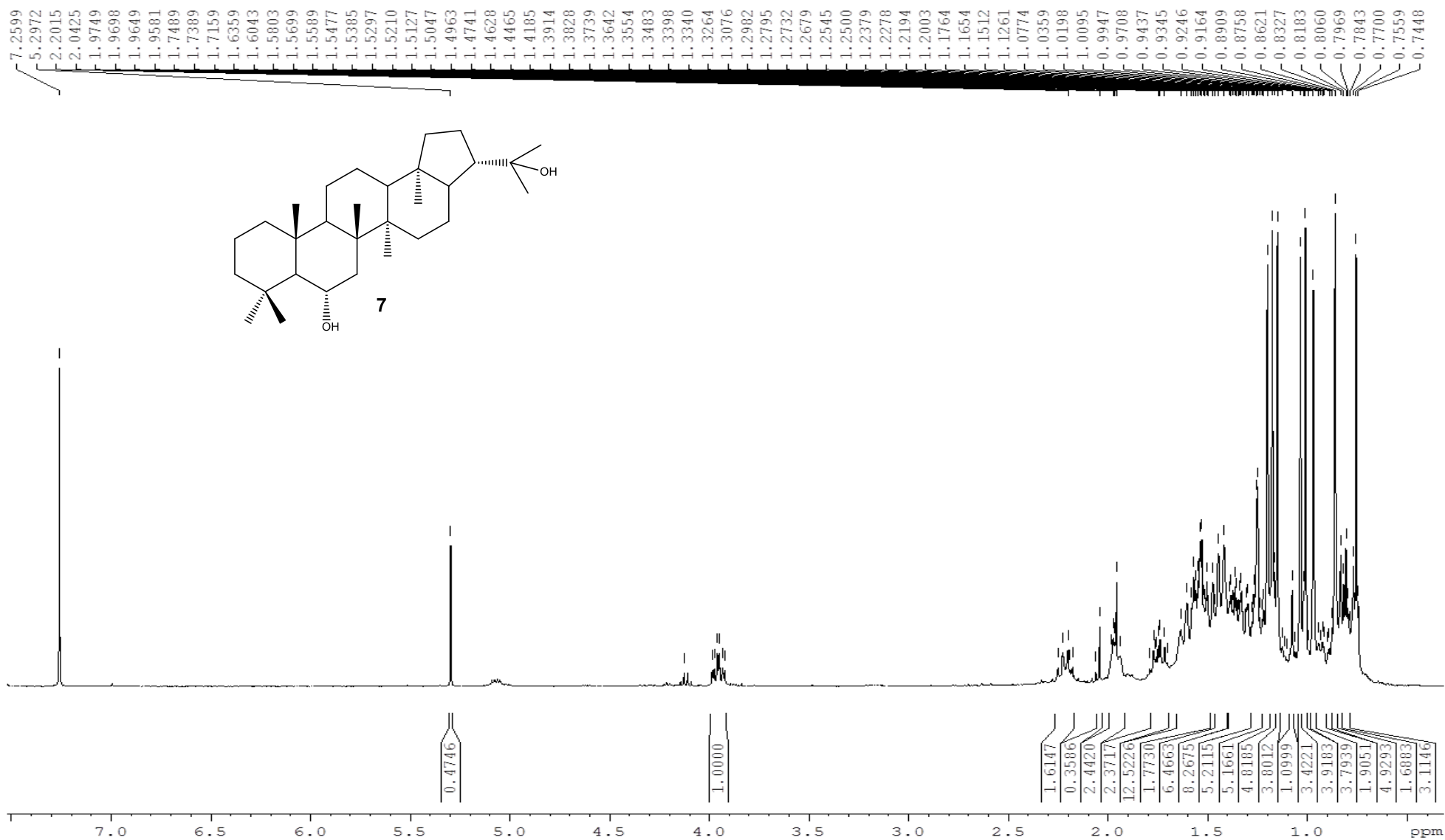
- Jarvis, W. (1977). *Botryotinia and Botrytis species : taxonomy, physiology, and pathogenicity*. Canada department of agriculture.
- Khripach, V. (2000). Twenty years of brassinosteroids: Steroidal plant hormones warrant better crops for the XXI century. *Ann Bot*, 86, 441-447.
- Kong, F. A., & García, J. C. (2014). Resistencia del hongo botrytis a los fungicidas en vides. *Agua-Tierra*, 2, 4-7.
- Kosanic, M., Rankovic, R., & Sukdolak, S. (2010). Antimicrobial activity of lichen lecanora frustulosa and Parmeliopsis hyperopta and their divaricatic acid and zeorin constituents. *African Journal of Microbiology Research*, 4, 885-890.
- L.Wilkins, A., Ronaldson, K. J., & Jager, P. M. (1987). A ¹³C N.M.R. Study of Some Oxygenated Hopane Triterpenes. *Aust. J. Chem*, 1713-1721.
- Marcano, D., & Hasegawa, M. (2002). *Fitoquímica Orgánica*. Caraca : Universidad Central de Venezuela.
- Medel, P. (2008). Metabolitos liquénicos y derivados con potencial actividad antineoplásica. *Tesis para optar al título de Químico Farmacéutico*. Valparaíso: Universidad de Valparaíso.
- Mosbach, K. (1973). Biosynthesis of lichen substances. En V. Ahmdjian, & M. Hale, *The lichen* (págs. 523-546). New York: Academic Press.
- Nash, T. H. (2001). *Lichen Biology*. Cambridge, United Kingdom: Press syndicate of the university of Cambridge.
- Newman, D. (2008). Natural products as lead to potential drugs: an old process or the new hope for drug discovery? *J. med. chem*, 51, 2589-2599.
- Ögmundsdóttir, H., Zoega, G., Gissurarason, S., & Ingollfsdottir, K. (1998). Antiproliferative effect of lichen-derived inhibitor of 5-lipoxygenase of malignant cell lines and mitogen-stimulated Lymphocyte. *Journal of pharmacology*, 50(1), 50-107.
- Piovano, M., Garvarino, J., Giannini, F., Correche, E., Feresin, G., Tapia, A., . . . Enriz, R. (2002). Evaluation of antifungal and antibacterial activities of aromatic metabolites from lichens. *Bol. Soc. Chil. Quím*, 47, 235-240.
- Purvis, W. (2000). *Lichens*. (L. Series, Ed.) London: The Natural History Museum.
- Quilhot, W. (1998). Categorías de conservación de líquenes nativos de Chile. *Boletín del Museo nacional de historia natural*, 47, 9-22.
- Quilhot, W., Rubio, C., & Fernández, E. (2007). Lichens Products. En K. Ramawat, & J. Merillon, *Biotechnology: secondary metabolites plants and microbes* (págs. 391-415). Plymouth: Science Publisher.
- Reino, J., Hernandez-Galan, R., Duran-Patron, R., & Collado, I. (2004). Virulence-toxin production relationship in isolates of the plant Pathogenic Fungus *Botrytis cinerea*. *Journal of phitopathology*, 152(10), 563-566.
- Rolke, Y., Liu, S., Quidde, T., Williamson, B., Schouten, A., Weltring, K., . . . Tudzynski, P. (2004). Functional analysis of H₂O₂-generating systems in *Botrytis cinerea*: the major Cu–Zn-superoxide dismutase (BCSOD1) contributes to virulence on French bean, whereas a glucose oxidase (BCGOD1) is dispensable. *Mol Plant Pathol*, 5(1), 17-27.

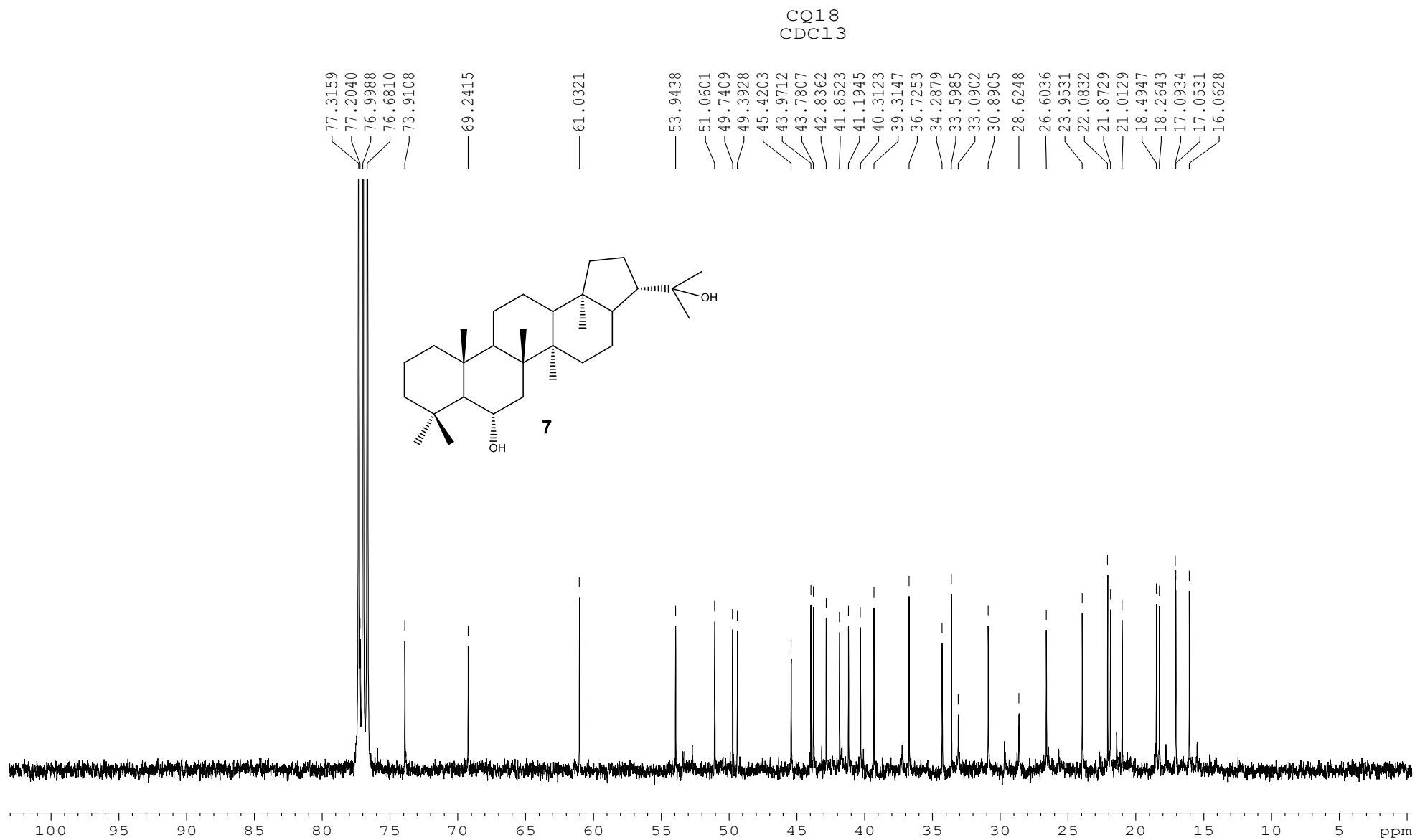
- Russo, A., Piovano, M., Lombardo, L., Garbarino, J., & Cardile, V. (2008). Lichen metabolites prevent UV light and nitric oxidemediated plasmid DNA damage and induce apoptosis in human melanoma cells. *Life. Sci.*, 83(13-14), 468-474.
- Takatsuto, S., & Ikekawa, N. (1983). Remote substituent effect on the regioselectivity in the Baeyer-Villiger oxidation of 5a-Cholestan-6-one derivatives. *Tetrahedron Lett.*, 24, 917-920.
- Vijayakumar, C., Viswanathan, S., Kannappa-Reddy, M., Pavathavarthini, S., Kundu, A., & Sukumar, E. (2000). Antiinflammatory activity of (+)-Usnic Acid. *Fitoterapia*, 71(5), 71-564.
- Williams, O., Stone, M., Hauck, P., & Raham, S. (1989). Why are secondary metabolites (natural products) biosynthesized? *Journal of natural products*, 52(6), 1189-1208.
- Wu, J., Zhang, M., Ding, D., Tan, T., & Yan, B. (1995). Effect of *Cladonia alpestris* on *Trichomonas vaginalis* in vitro. *Chinese Journal of Parasitology*, 13(2), 13-126.

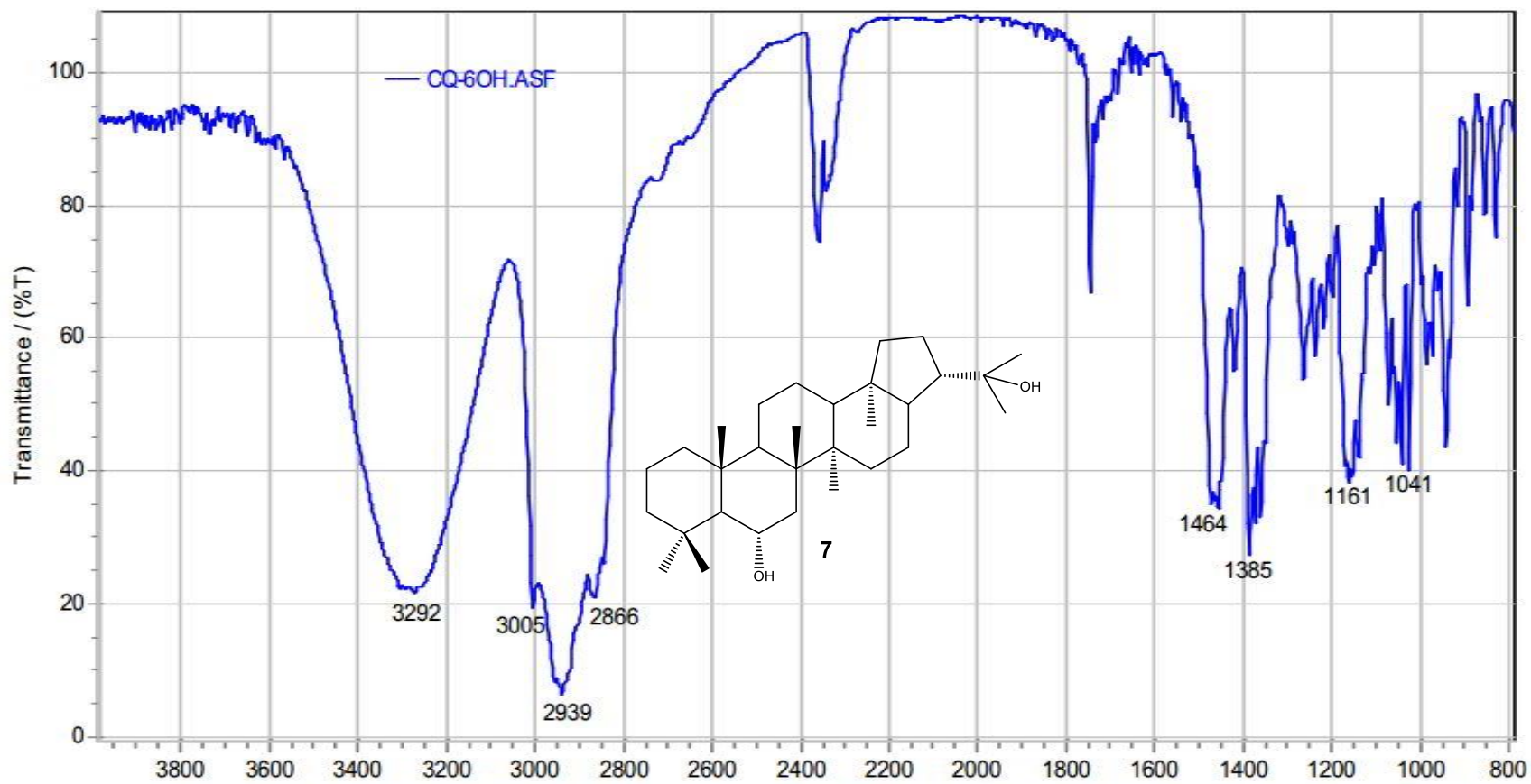
CQ17
CDC13Espectro ¹H-RMN compuesto 6

Espectro ^{13}C -RMN compuesto 6

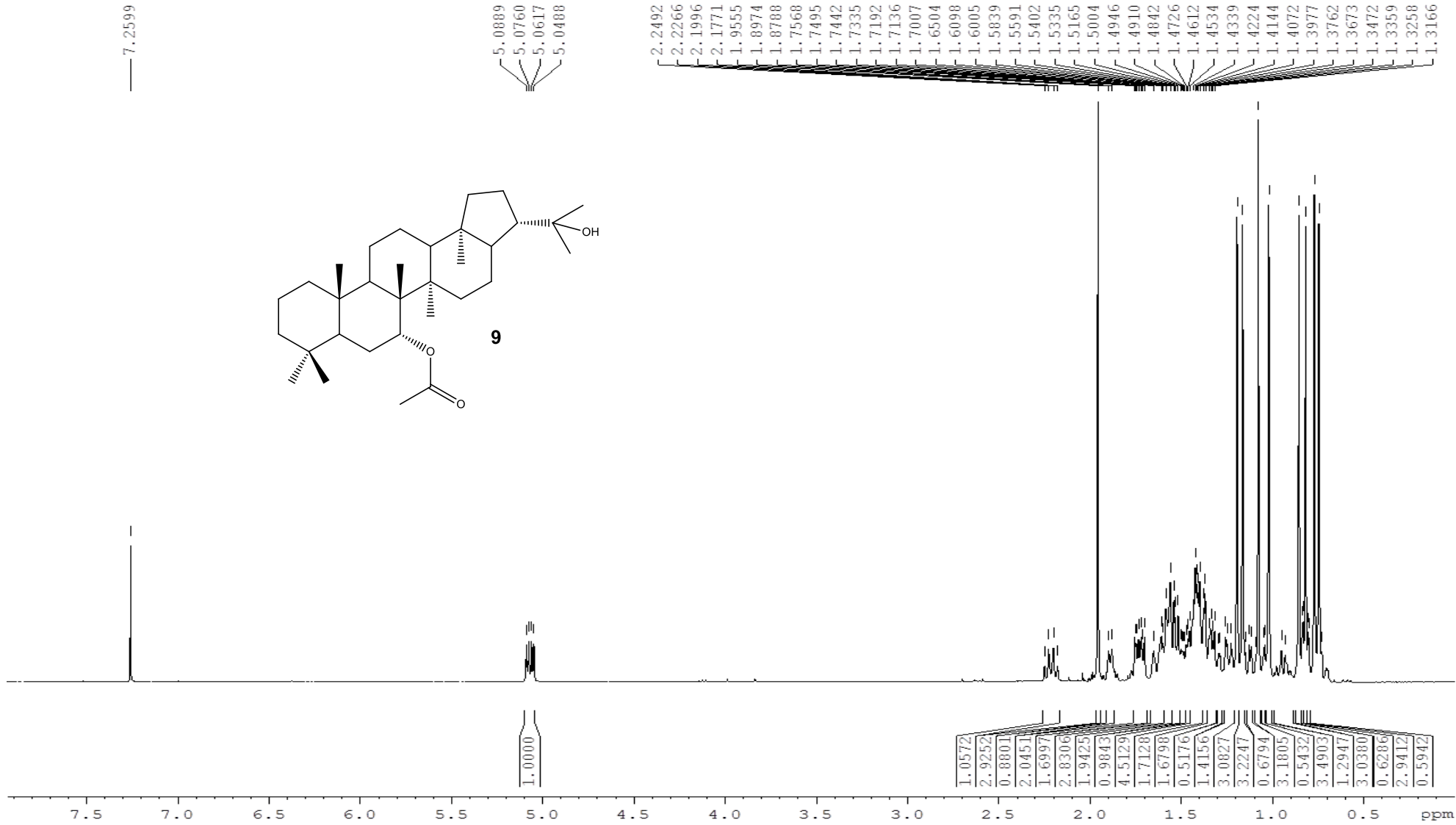
Espectro ^{IR} compuesto 6

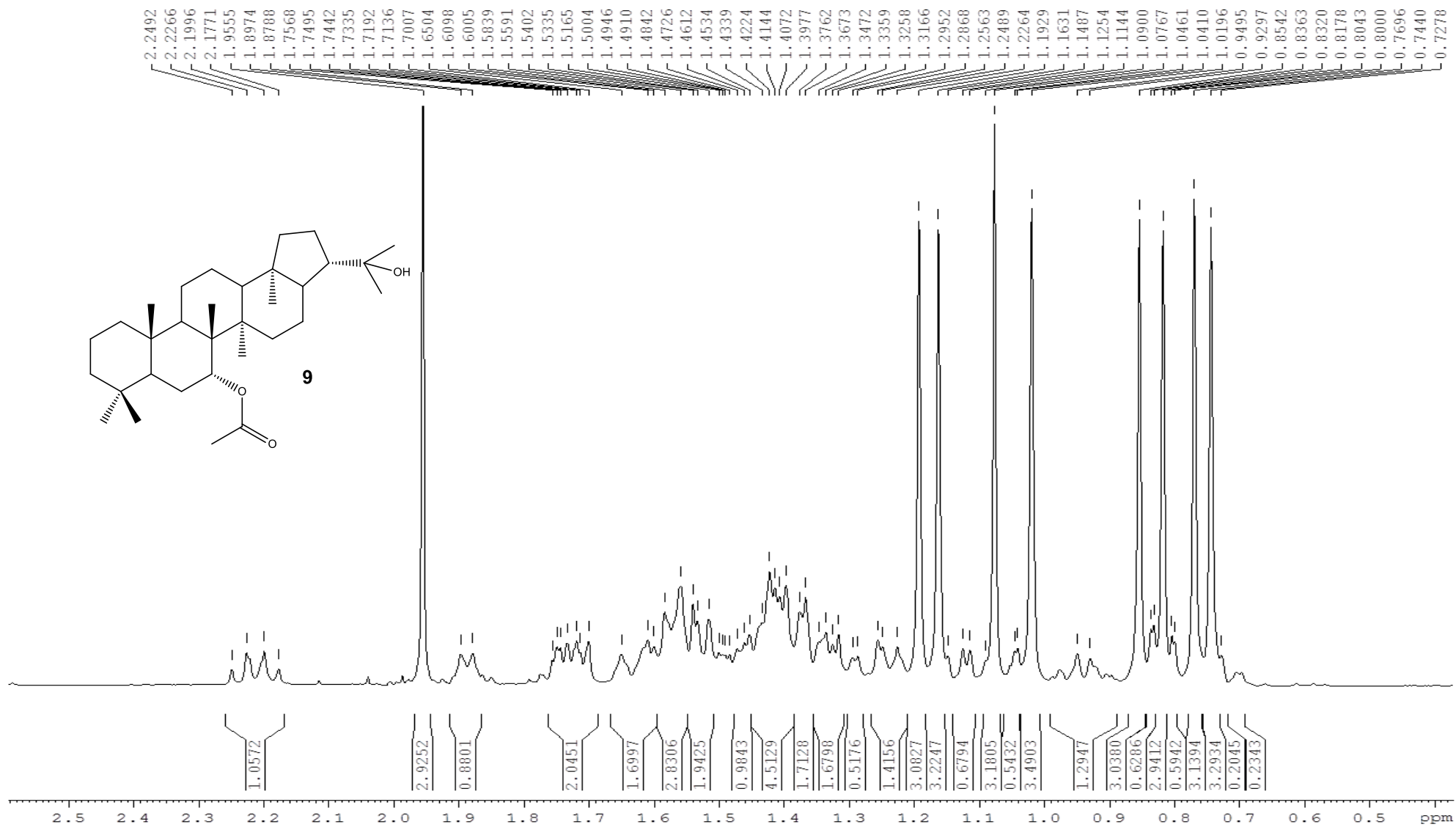
CQ18
CDCl3Espectro ¹H-RMN compuesto 7

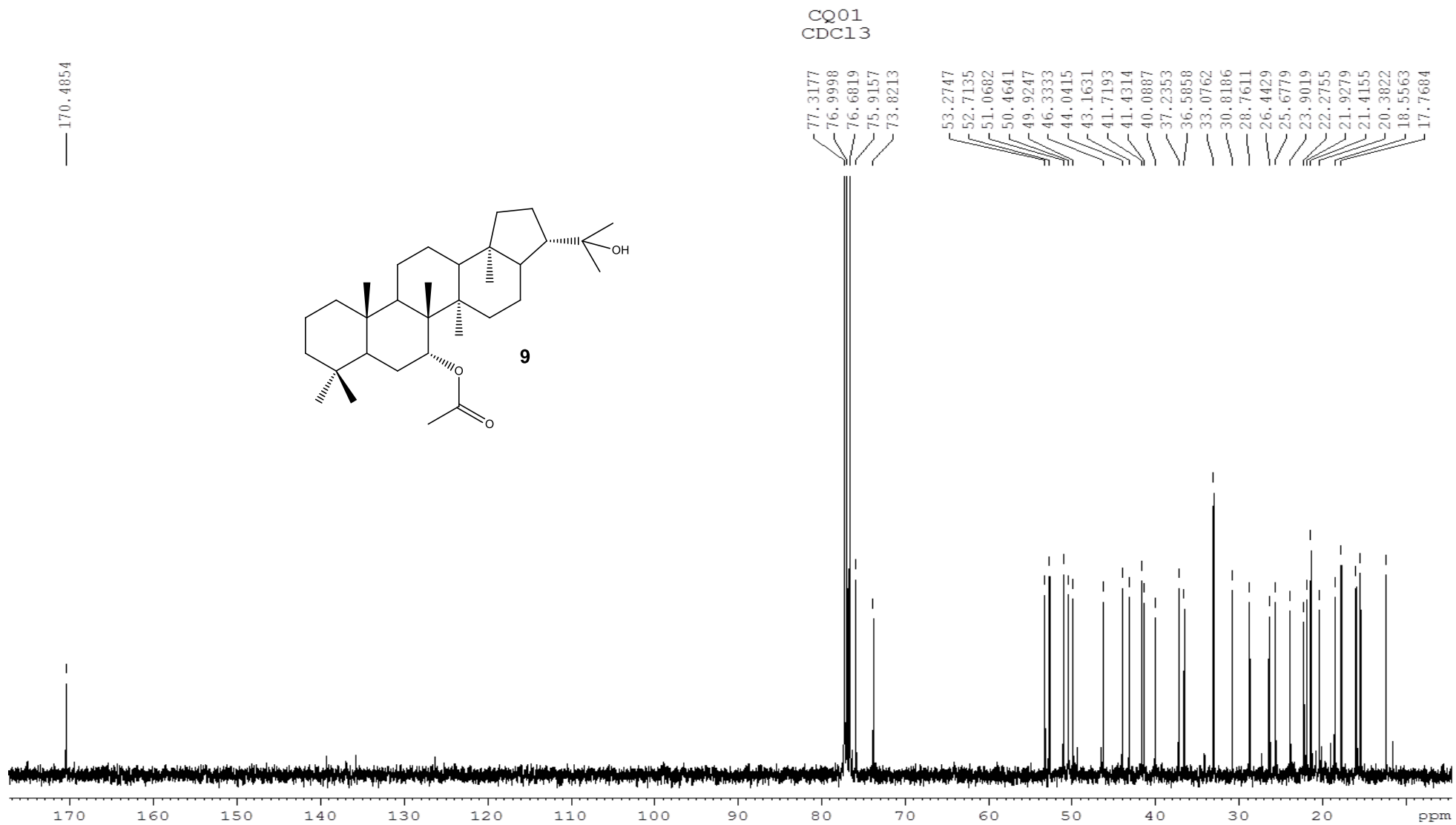
Espectro ^{13}C -RMN compuesto 7

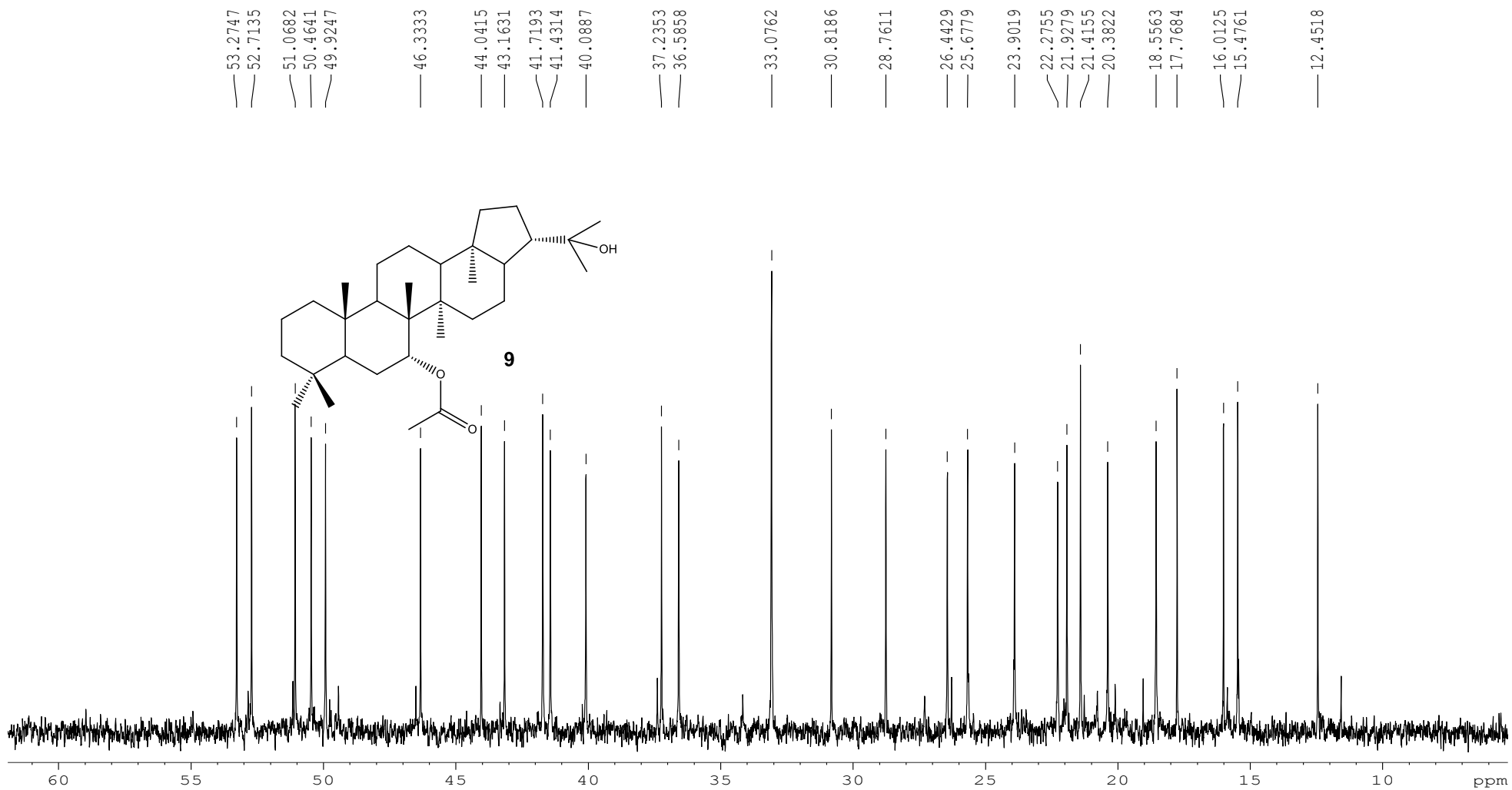


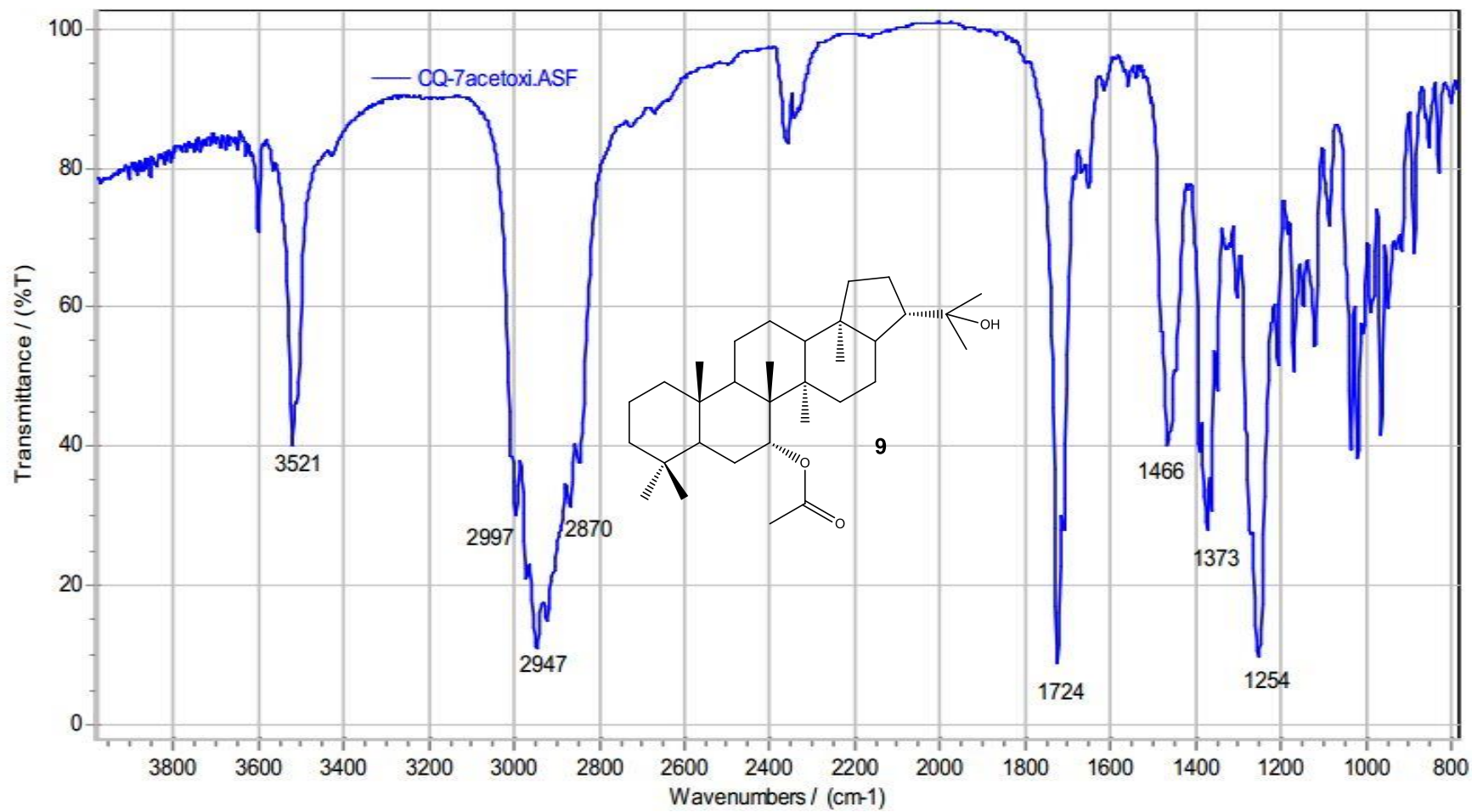
Espectro IR compuesto 7

CQ01
CDC13Espectro ¹H-RMN compuesto **9**

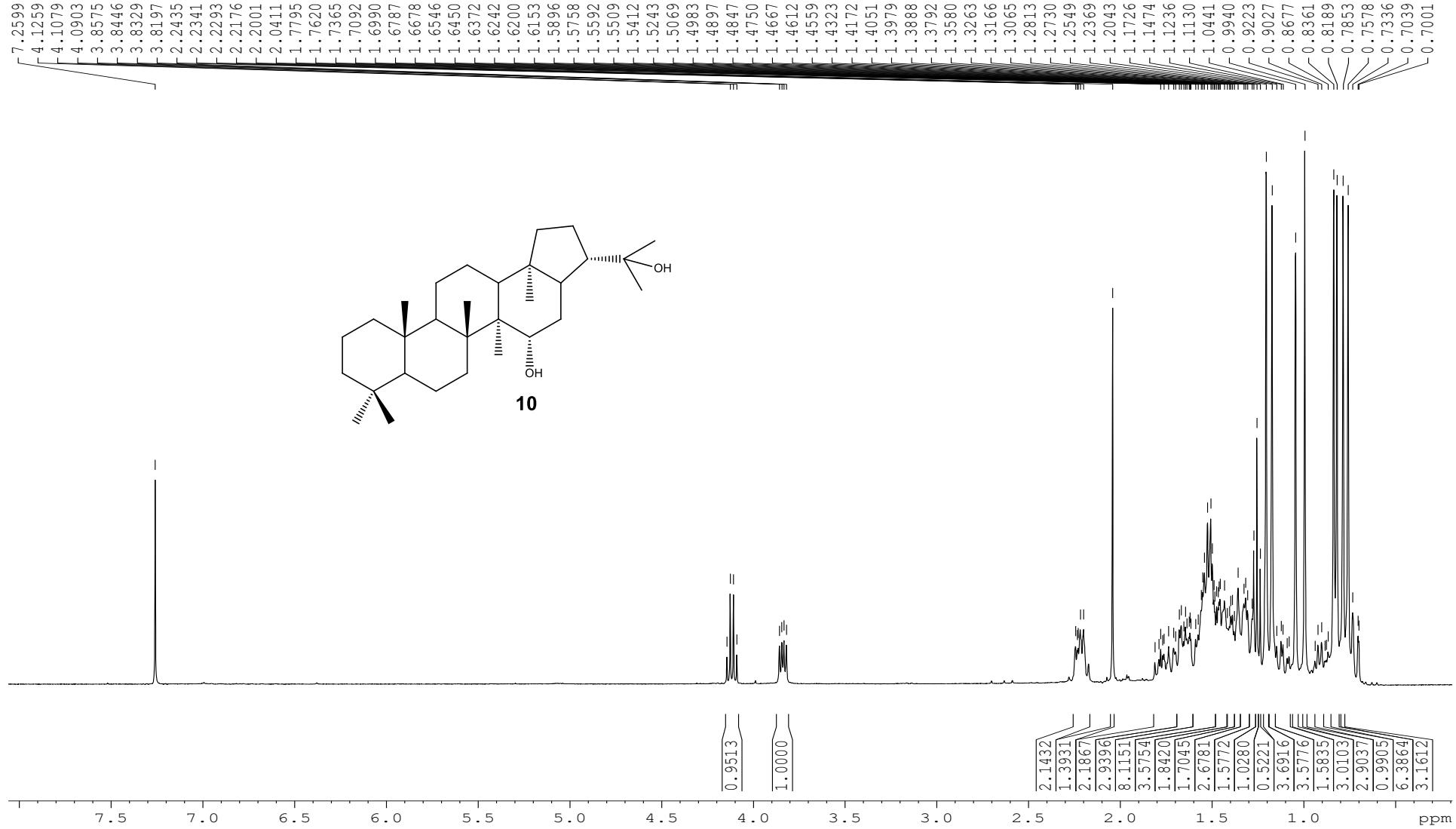
CQ01
CDC13Ampliación espectro ¹H-RMN compuesto **9**

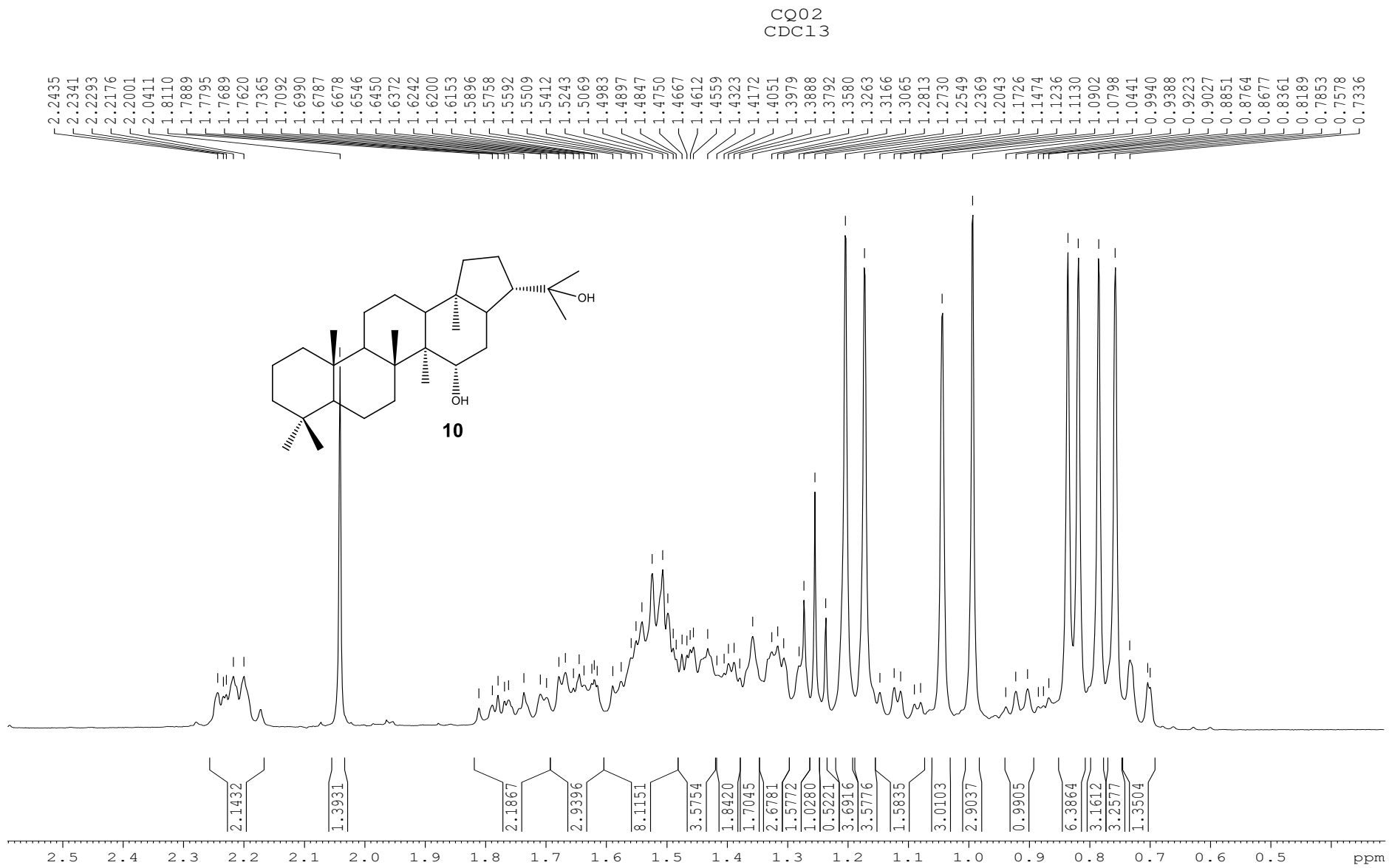
Espectro ^{13}C -RMN compuesto **9**

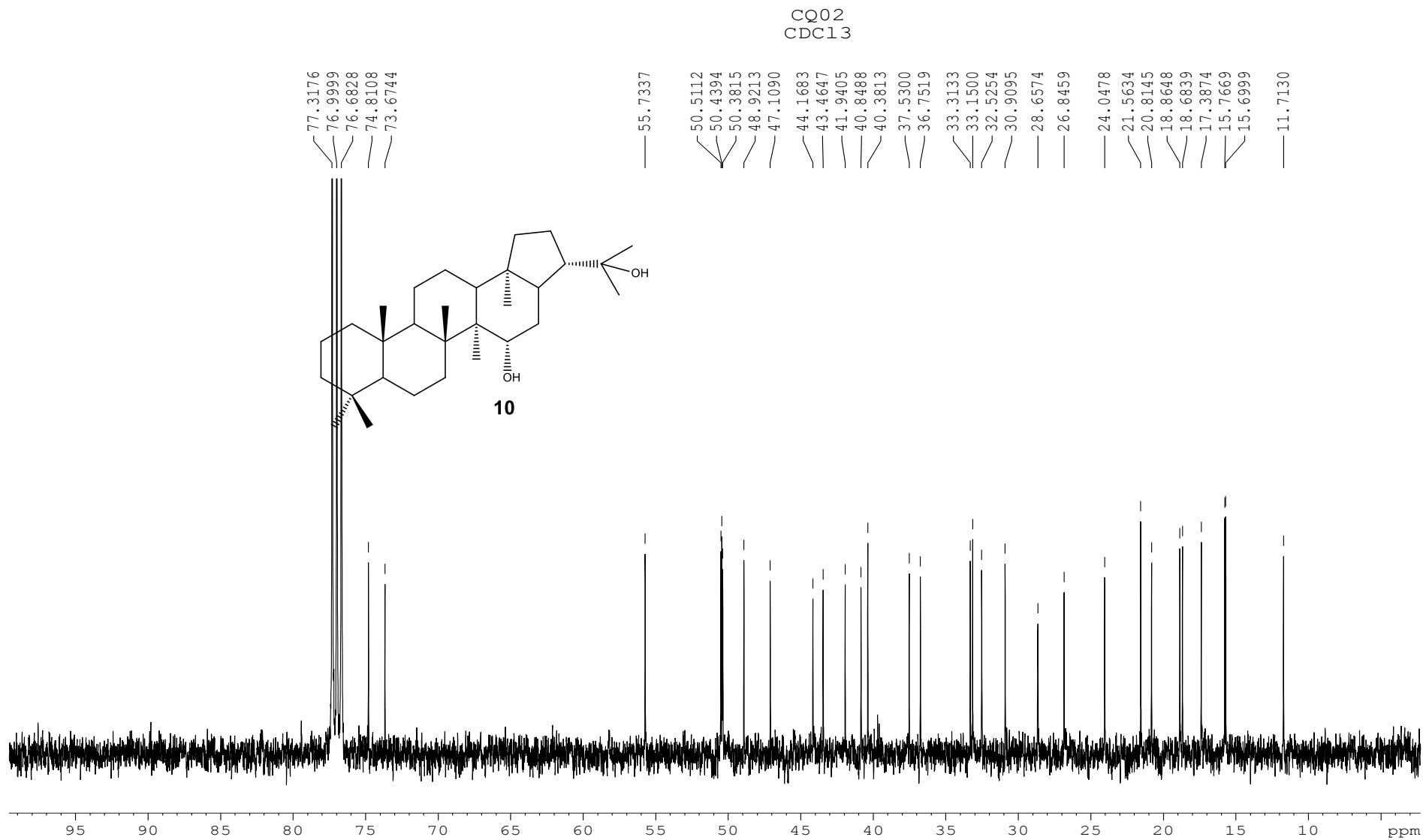
CQ01
CDC13Ampliación espectro ^{13}C -RMN compuesto 9

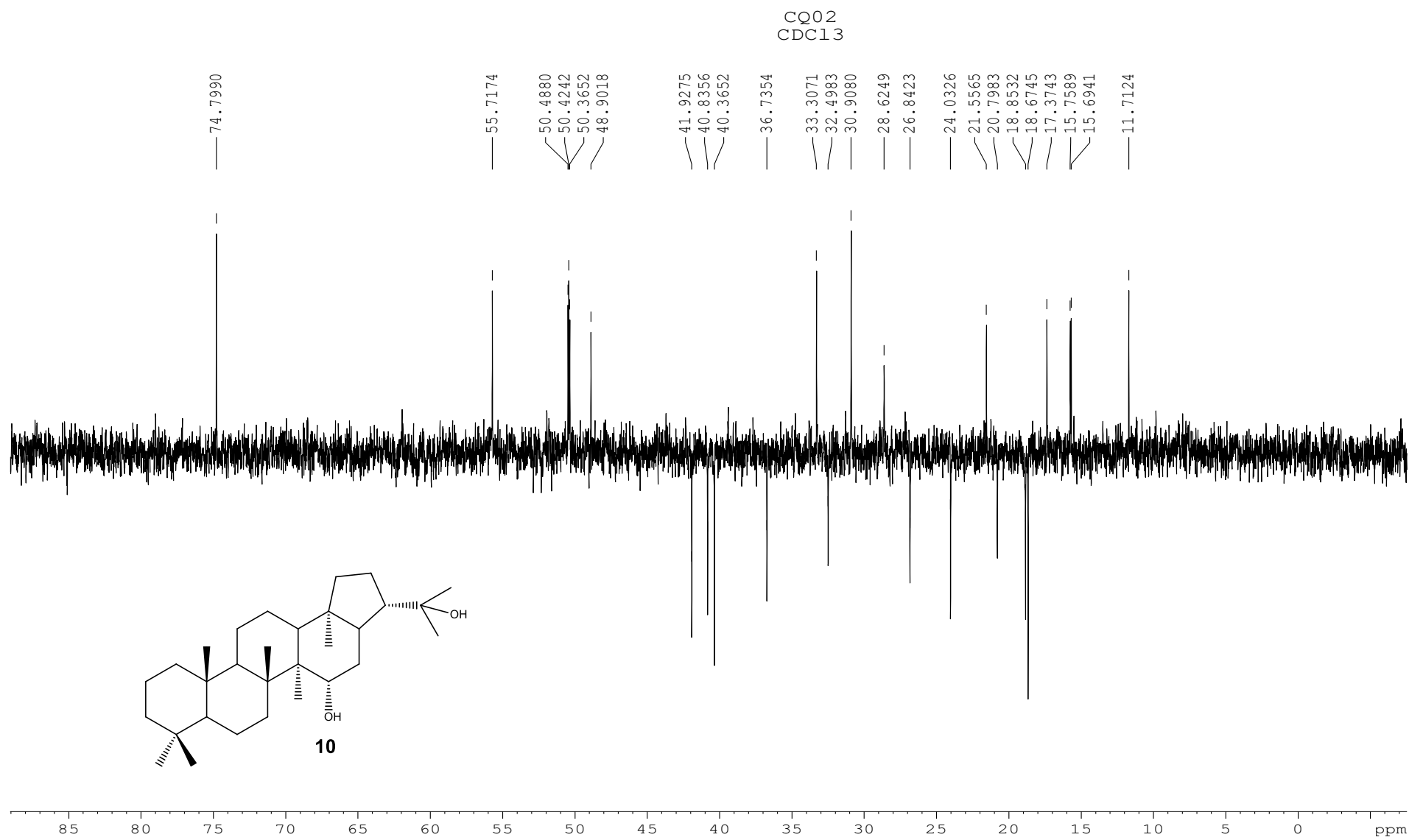


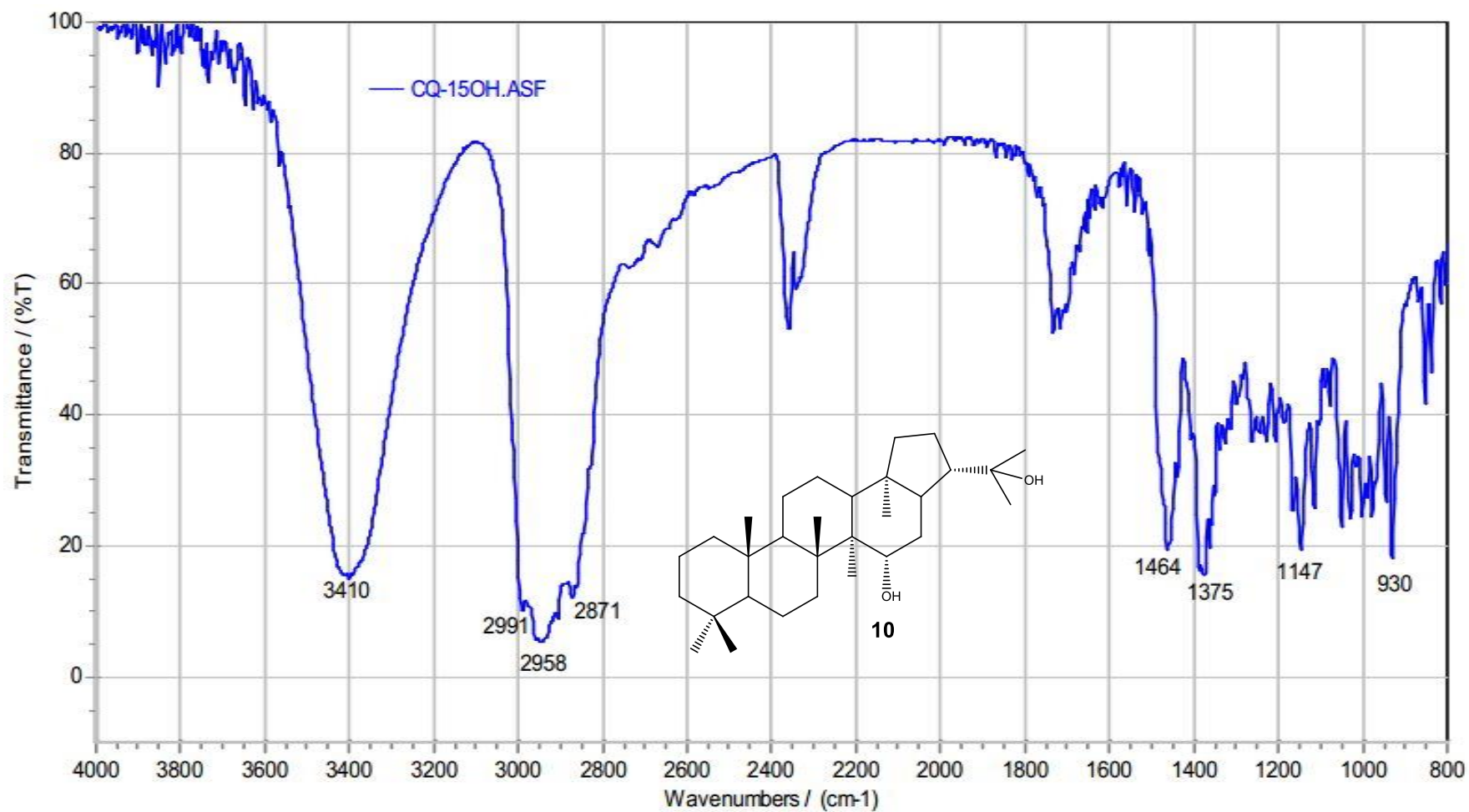
Espectro IR compuesto 9

CQ02
CDC13Espectro ¹H-RMN compuesto **10**

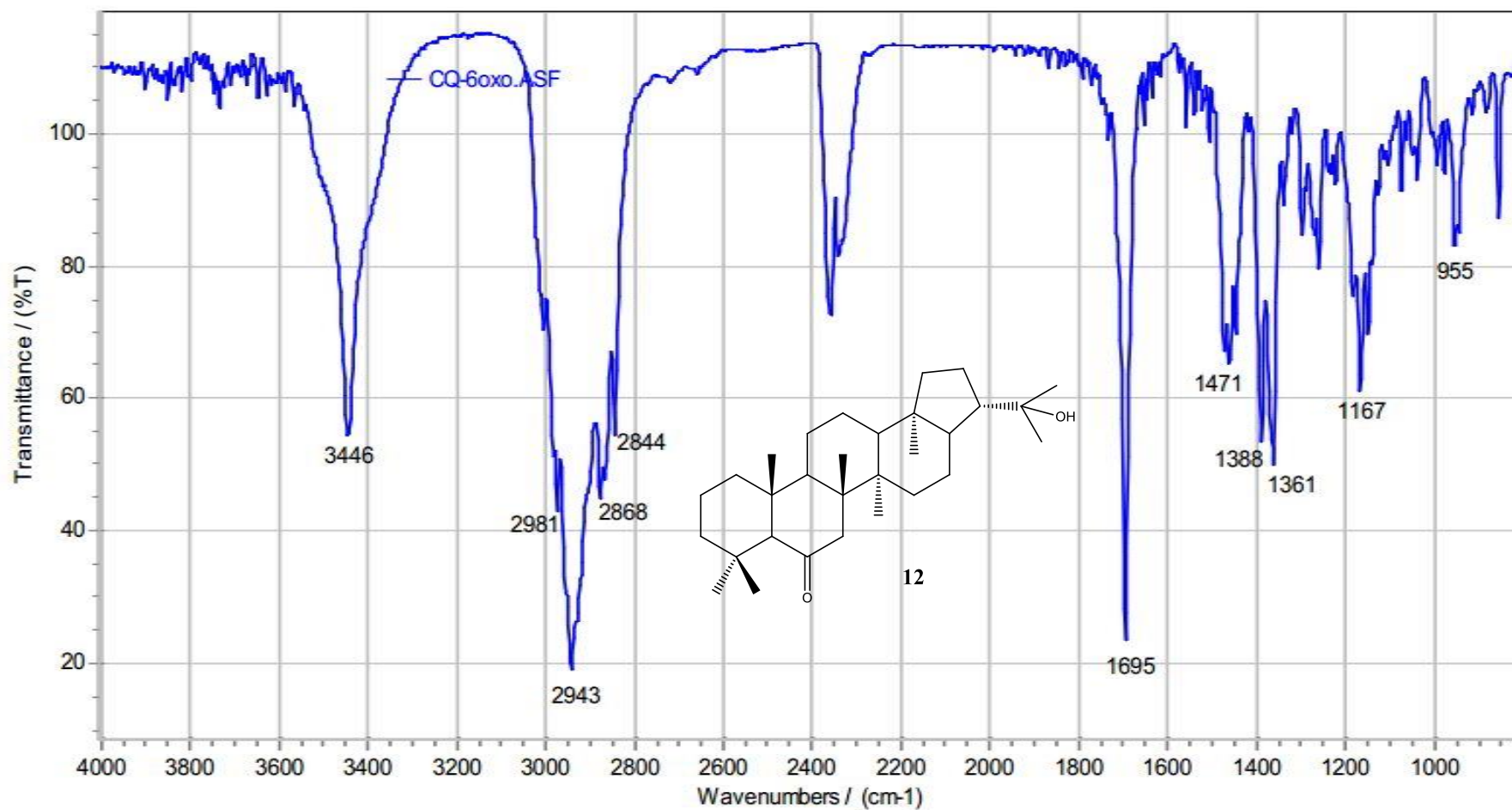
Ampliación espectro ^1H -RMN compuesto **10**

Espectro ^{13}C -RMN compuesto **10**

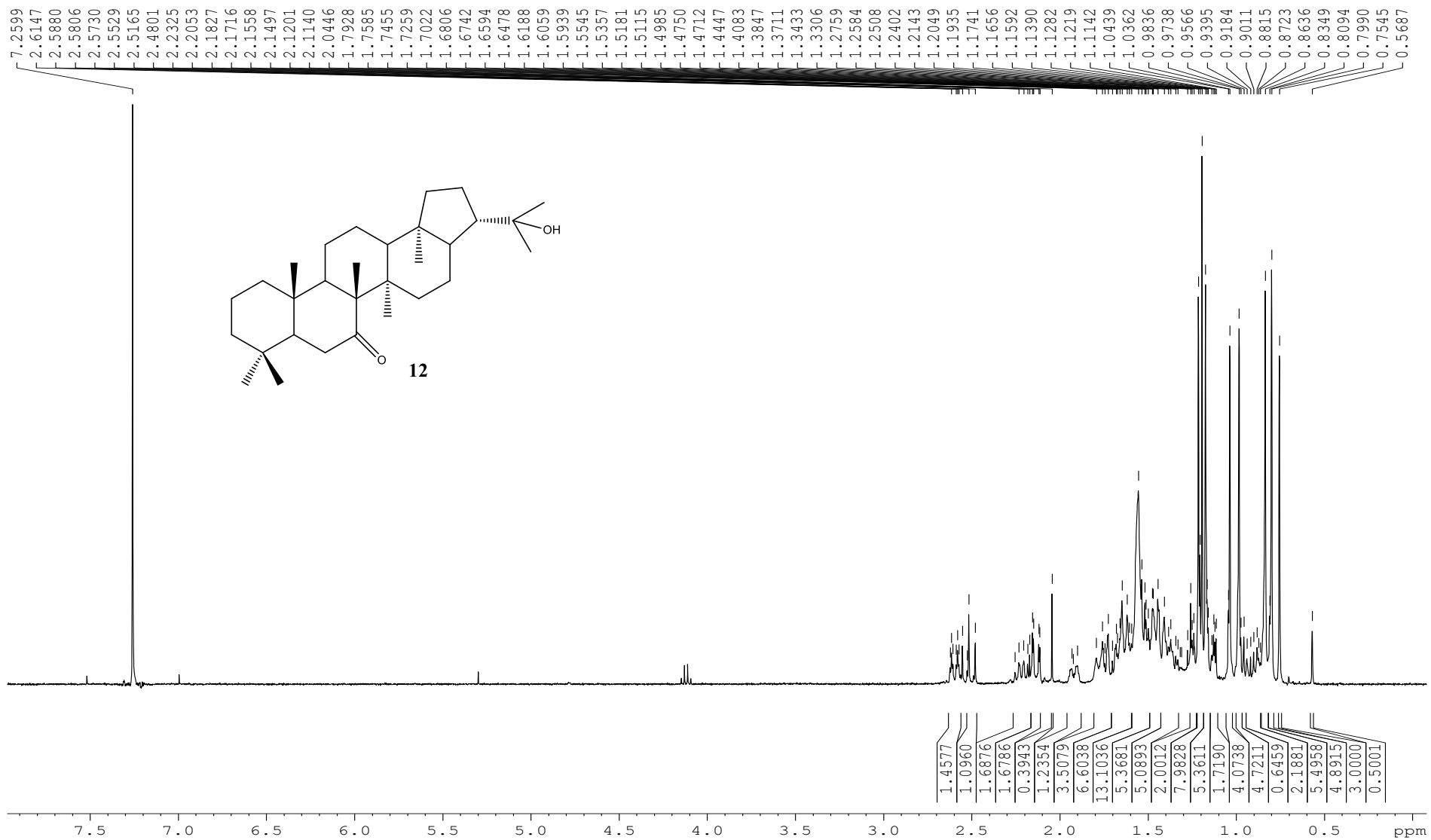
Espectro DEPT-135 compuesto **10**

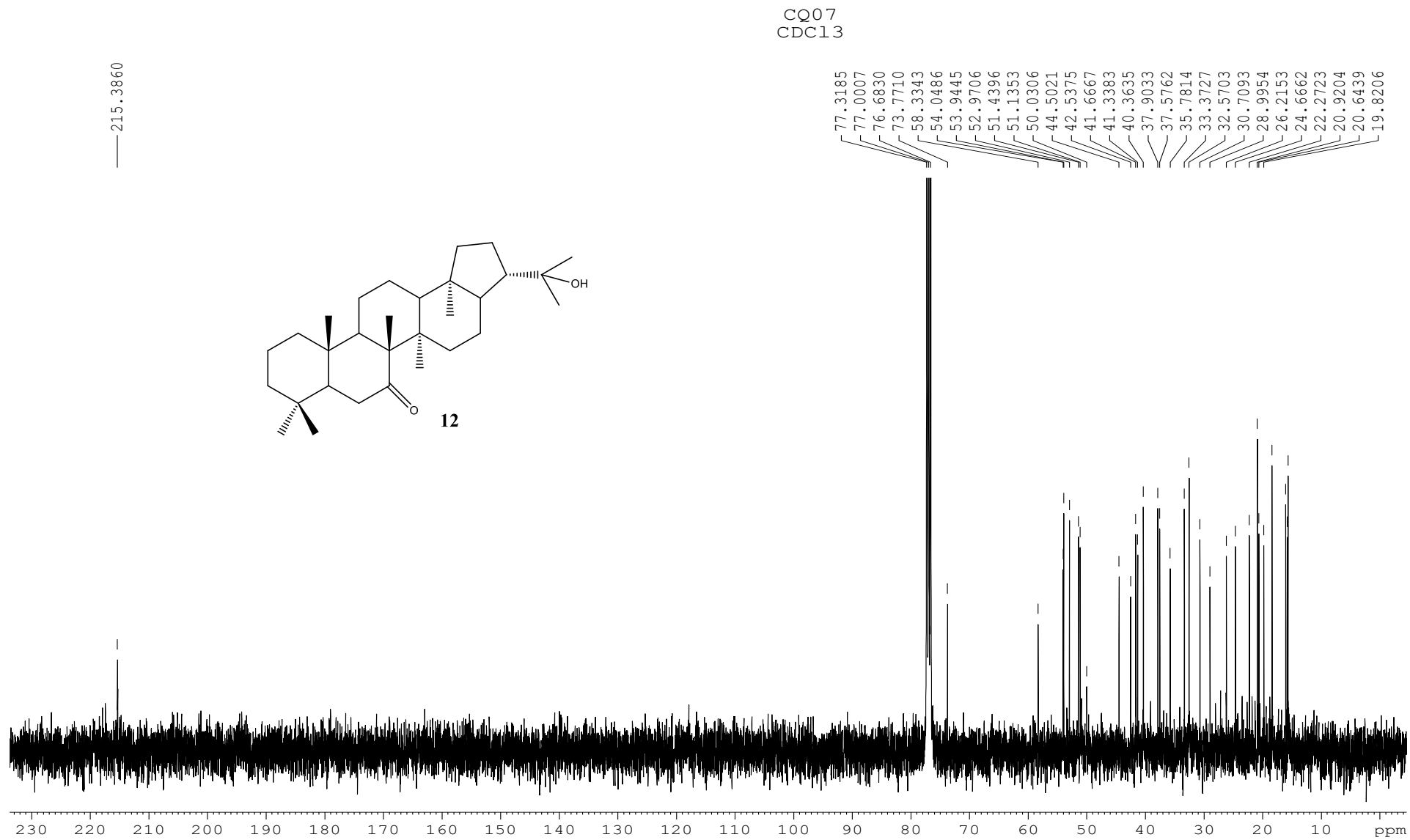


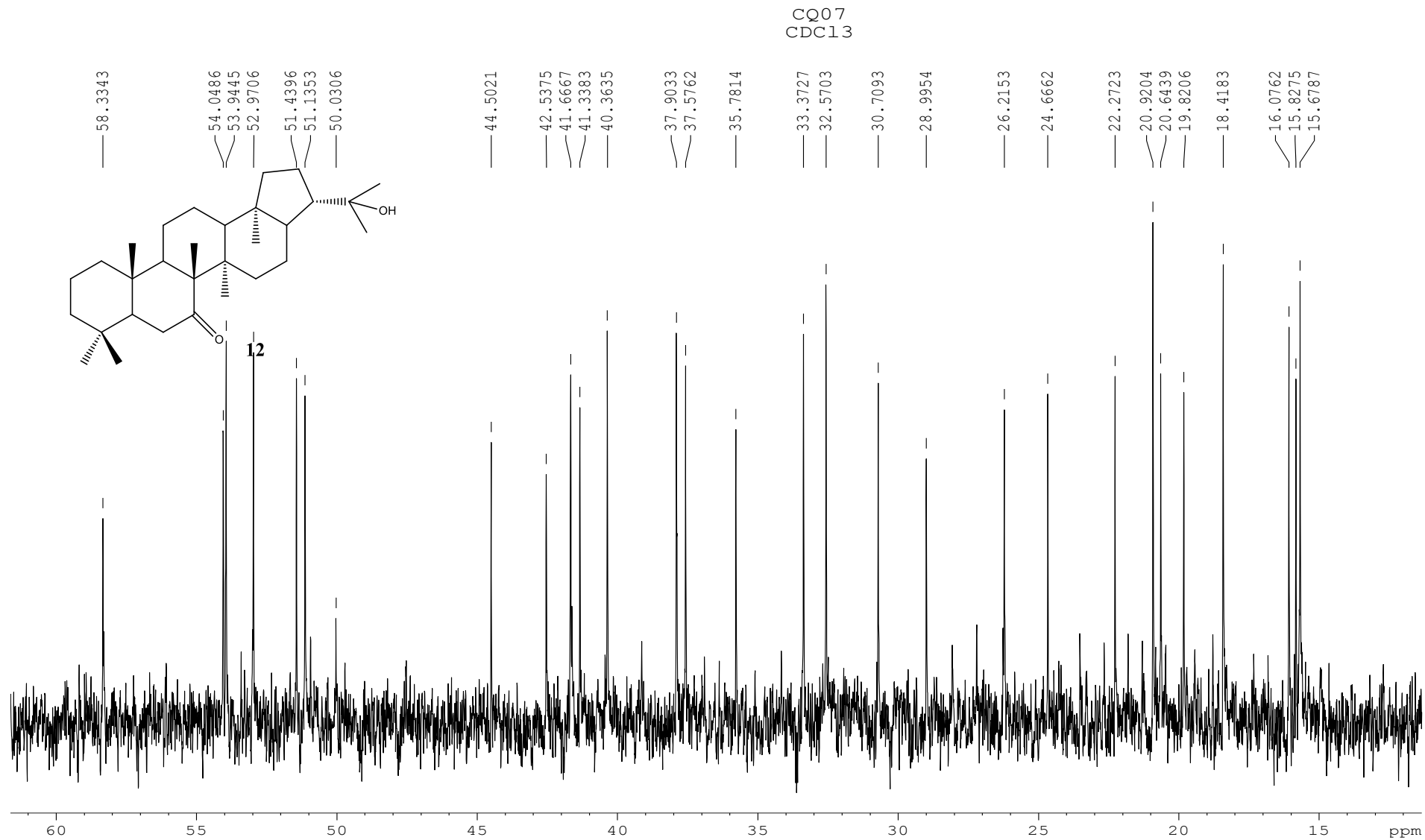
Espectro IR compuesto 10



Espectro IR compuesto 11

CQ07
CDC13Espectro ¹H-RMN compuesto 12

Espectro ^{13}C -RMN compuesto 12

Ampliación espectro ^{13}C -RMN compuesto 12

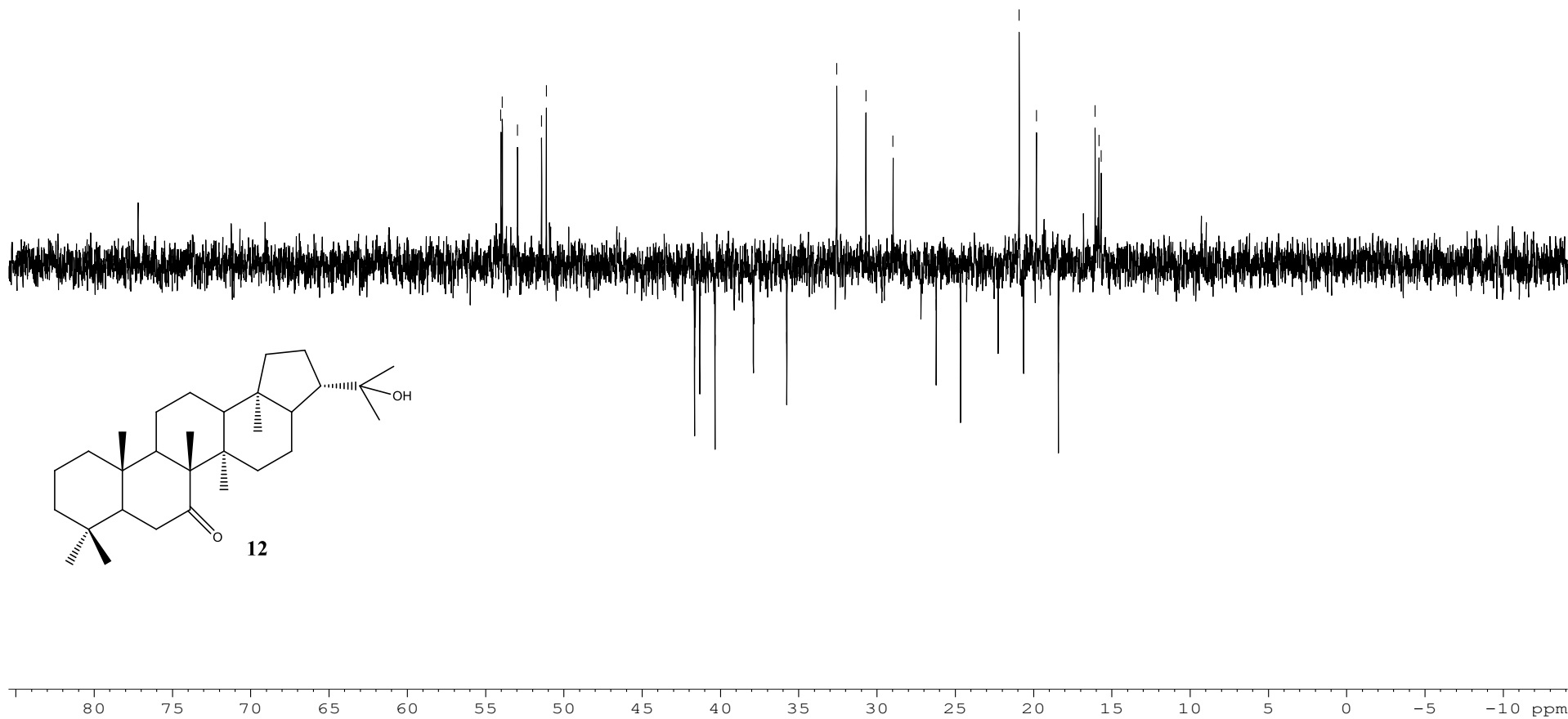
CQ07
CDC13

54.0297
53.9333
52.9590
51.4261
51.1222

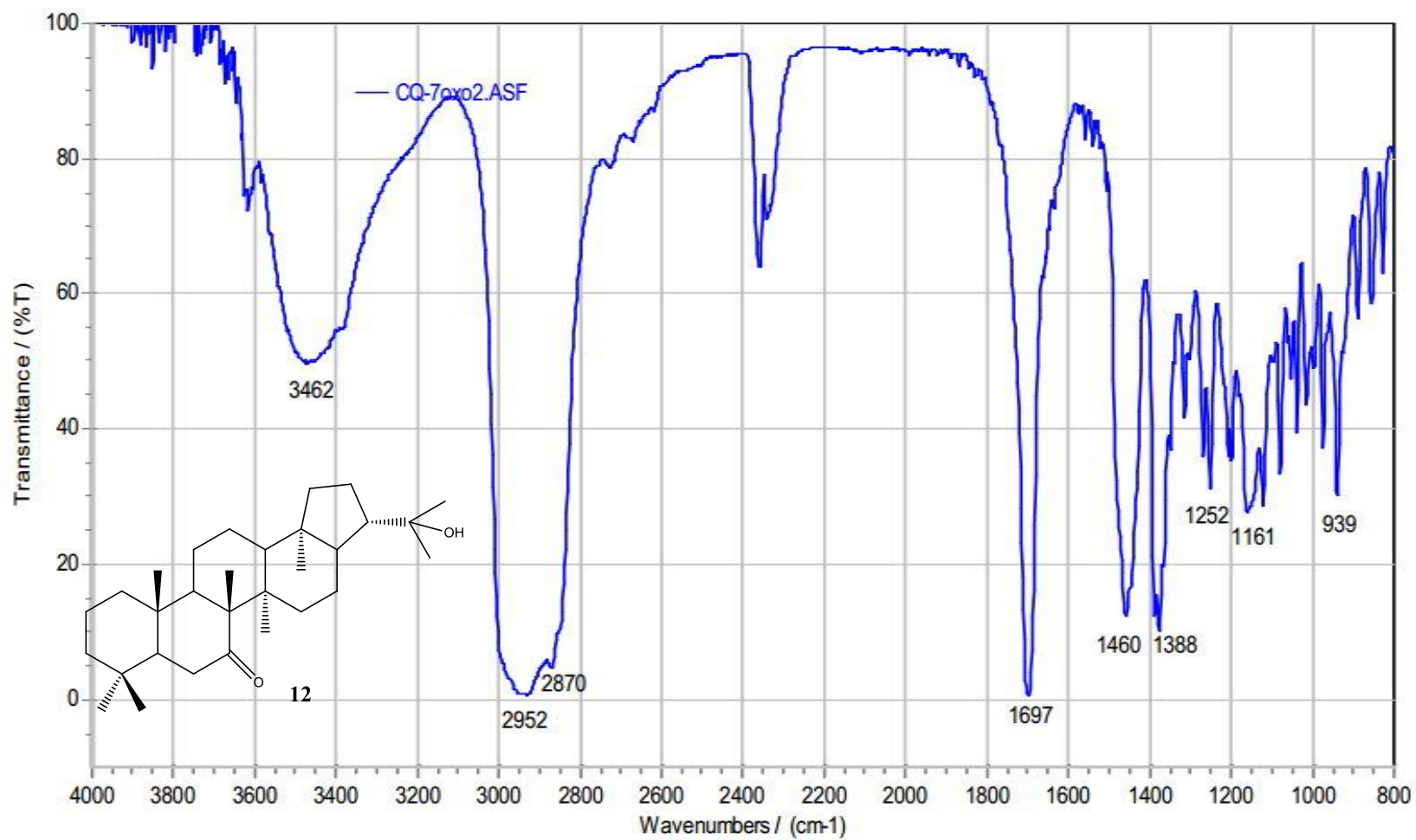
41.6522
41.3244
40.3499
37.8998
35.7665

32.5693
30.7038
28.9783

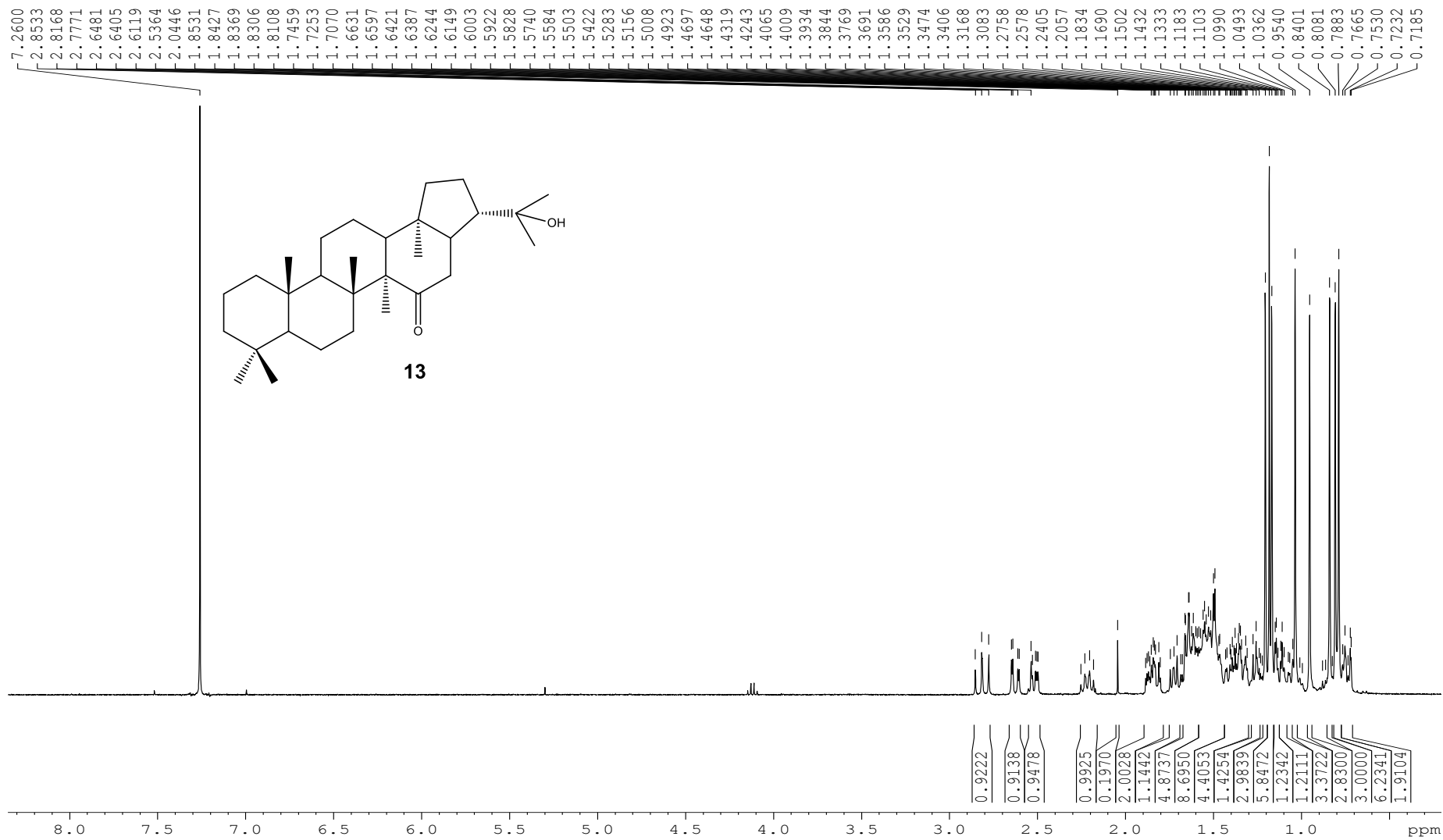
26.2168
24.6587
22.2654
20.9208
20.6367
19.8221
18.4119
16.0753
15.8222
15.6814

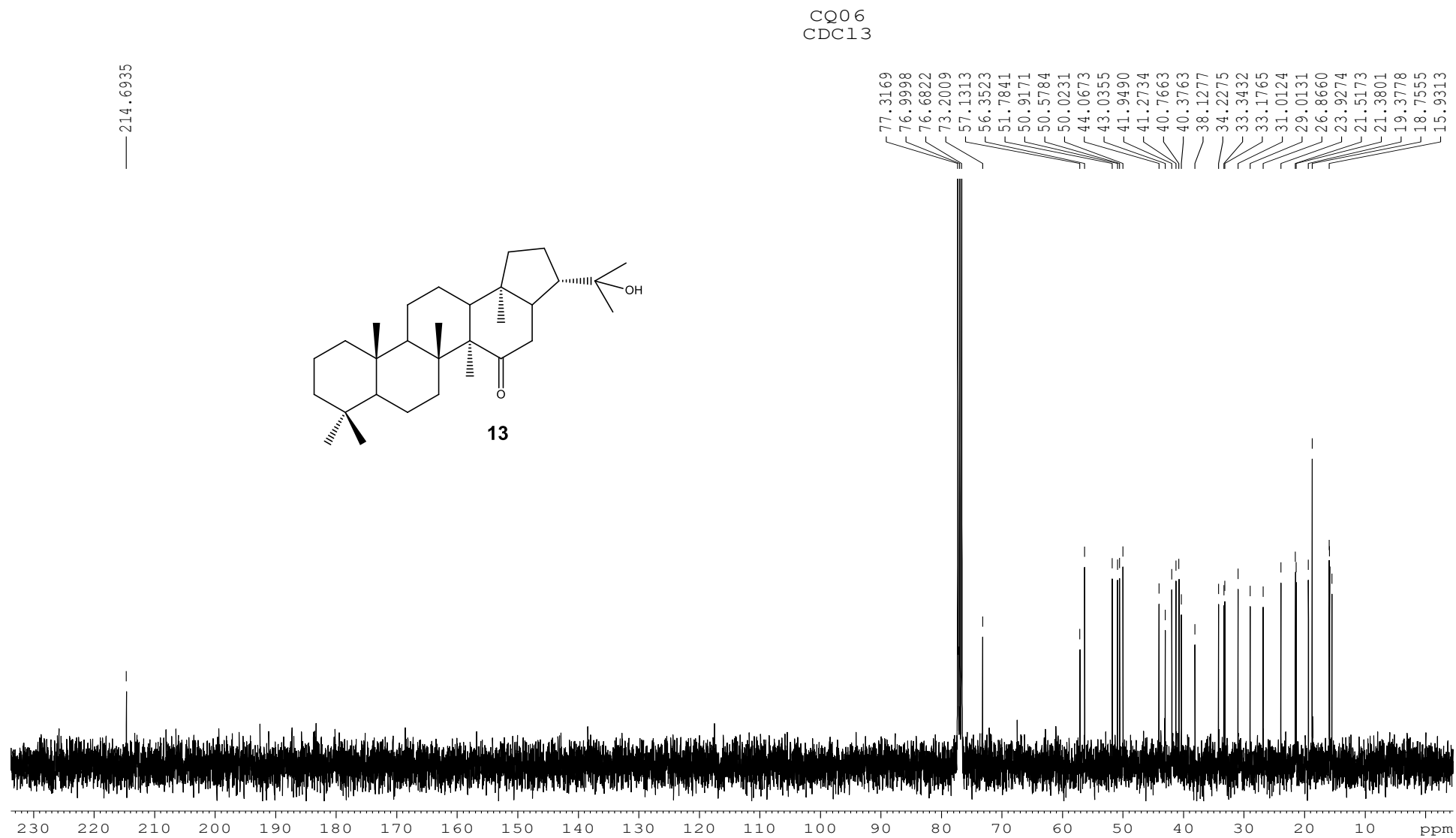


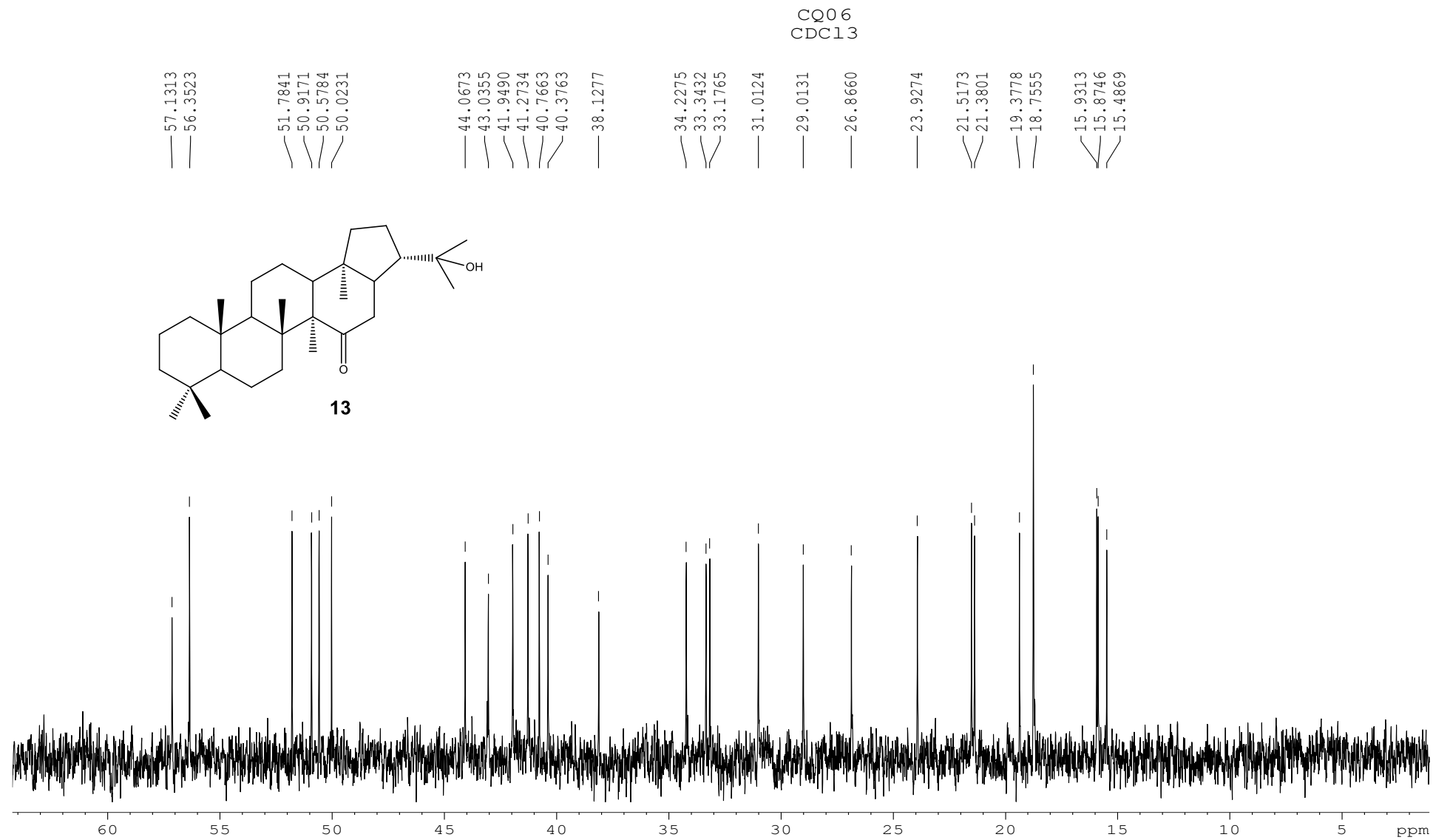
Espectro DEPT-135 compuesto 12

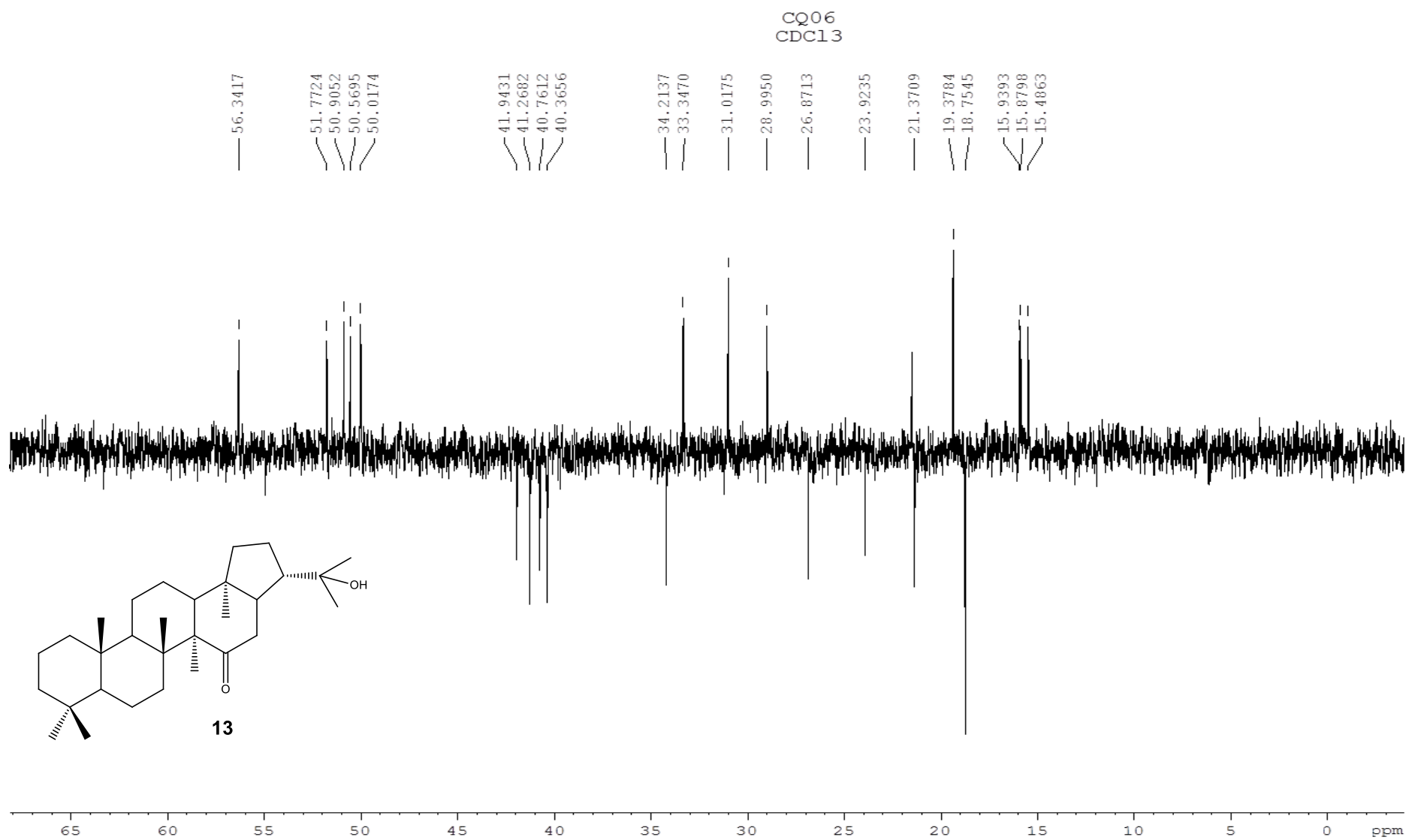


Espectro IR compuesto 12

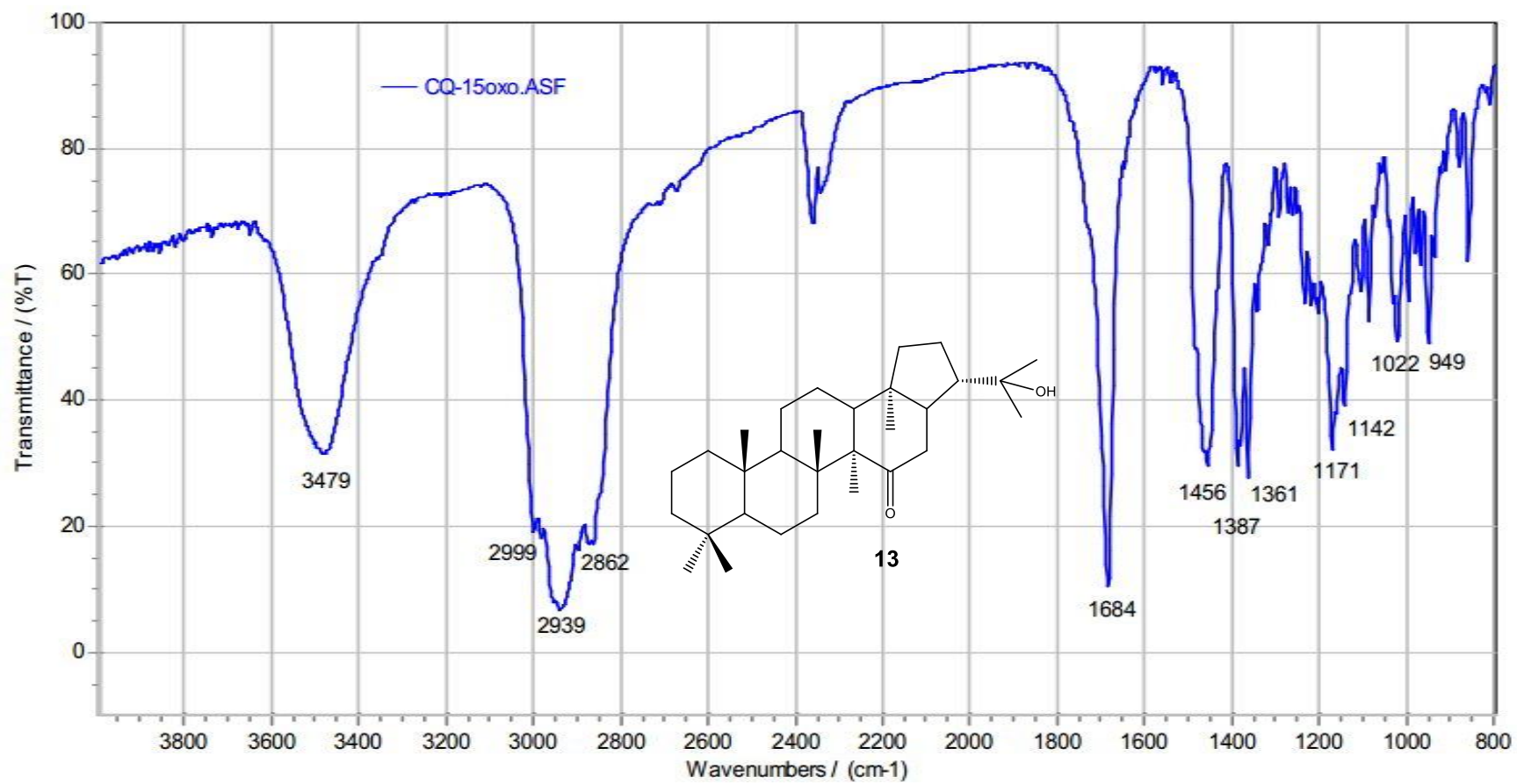
CQ06
CDC13Espectro ¹H-RMN compuesto **13**

Espectro ^{13}C -RMN compuesto 13

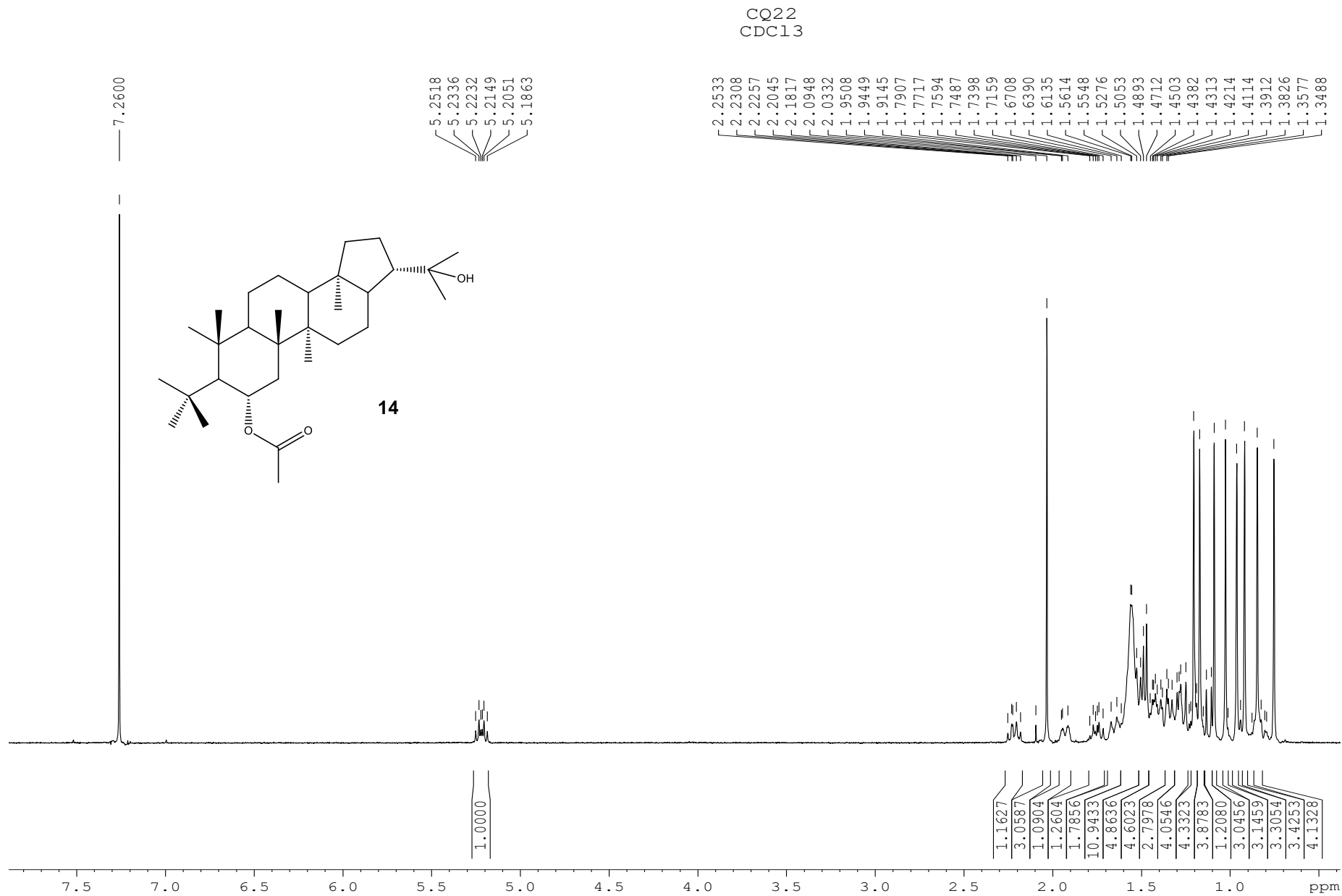
Ampliación espectro ^{13}C -RMN compuesto **13**

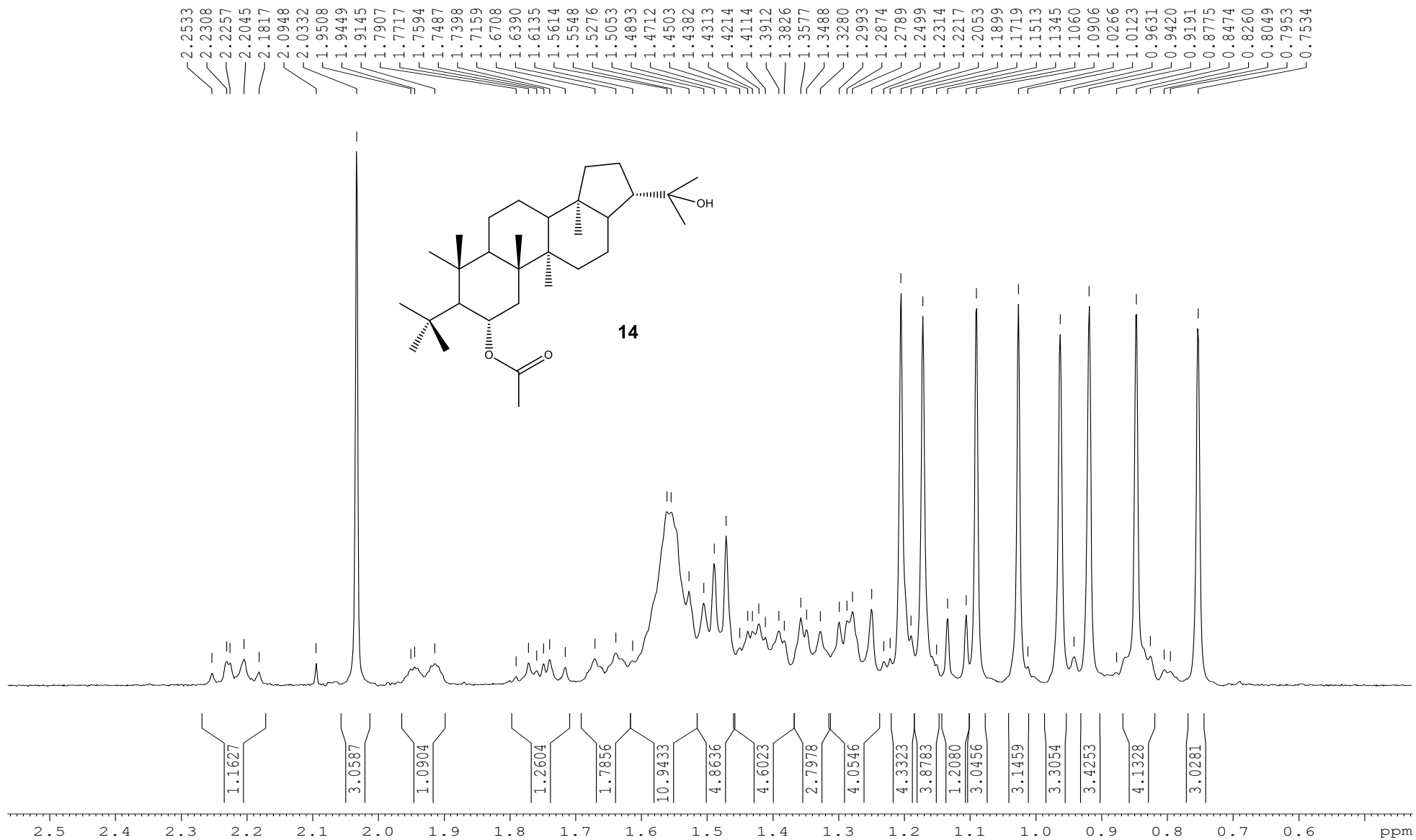


Espectro DEPT-135 compuesto 13



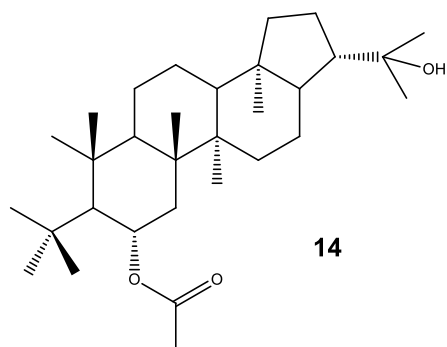
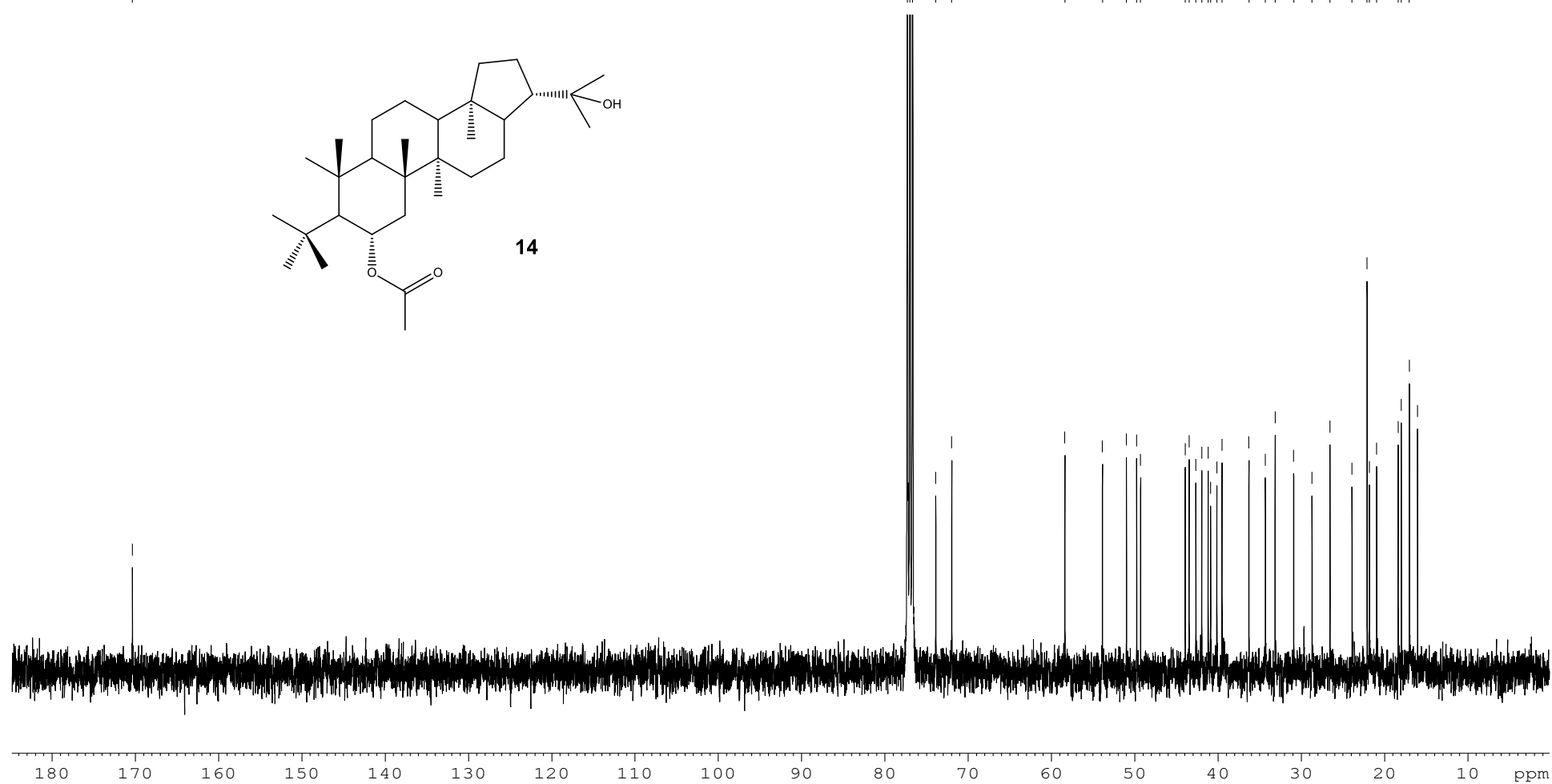
Espectro IR compuesto 13

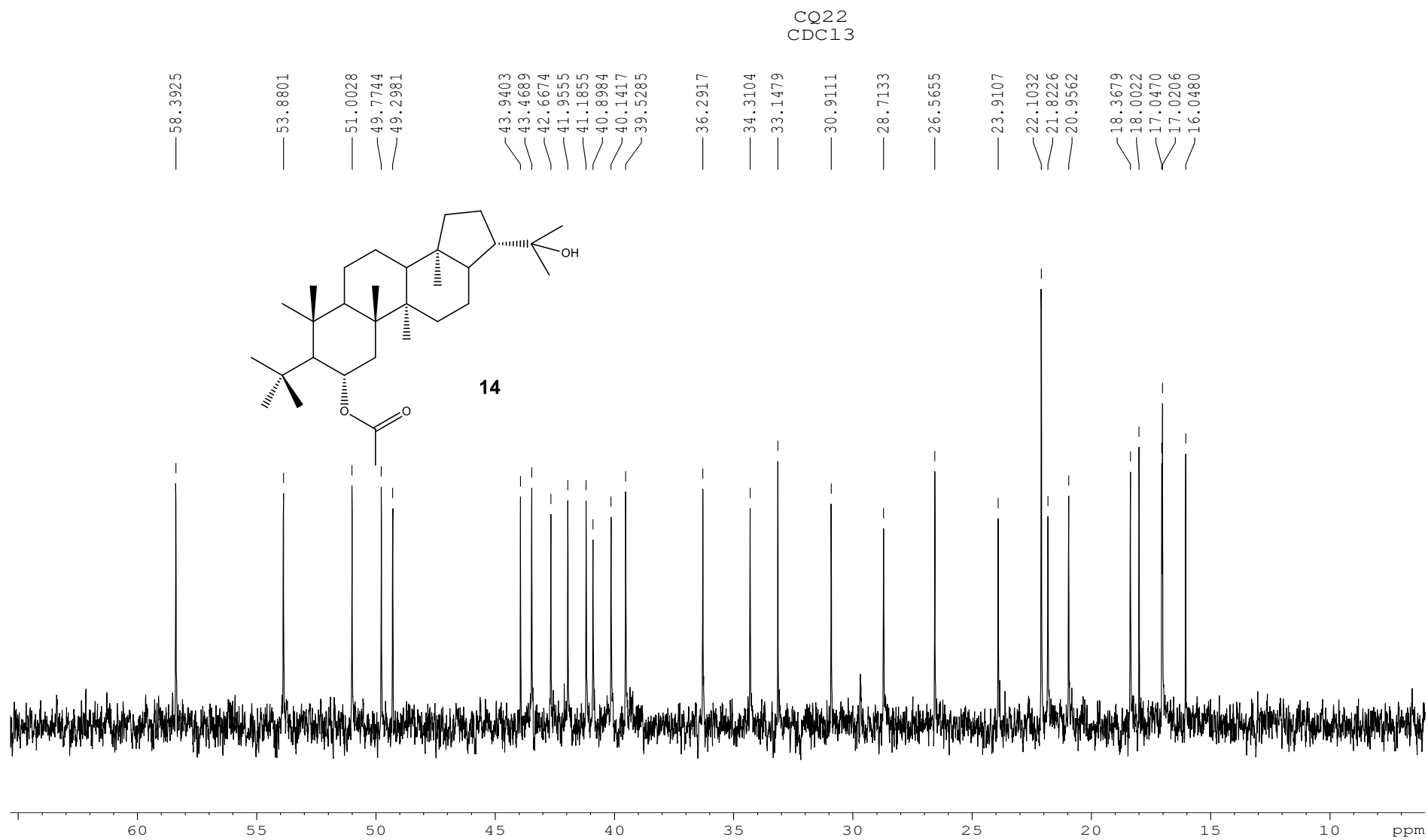
Espectro ¹H-RMN compuesto **14**

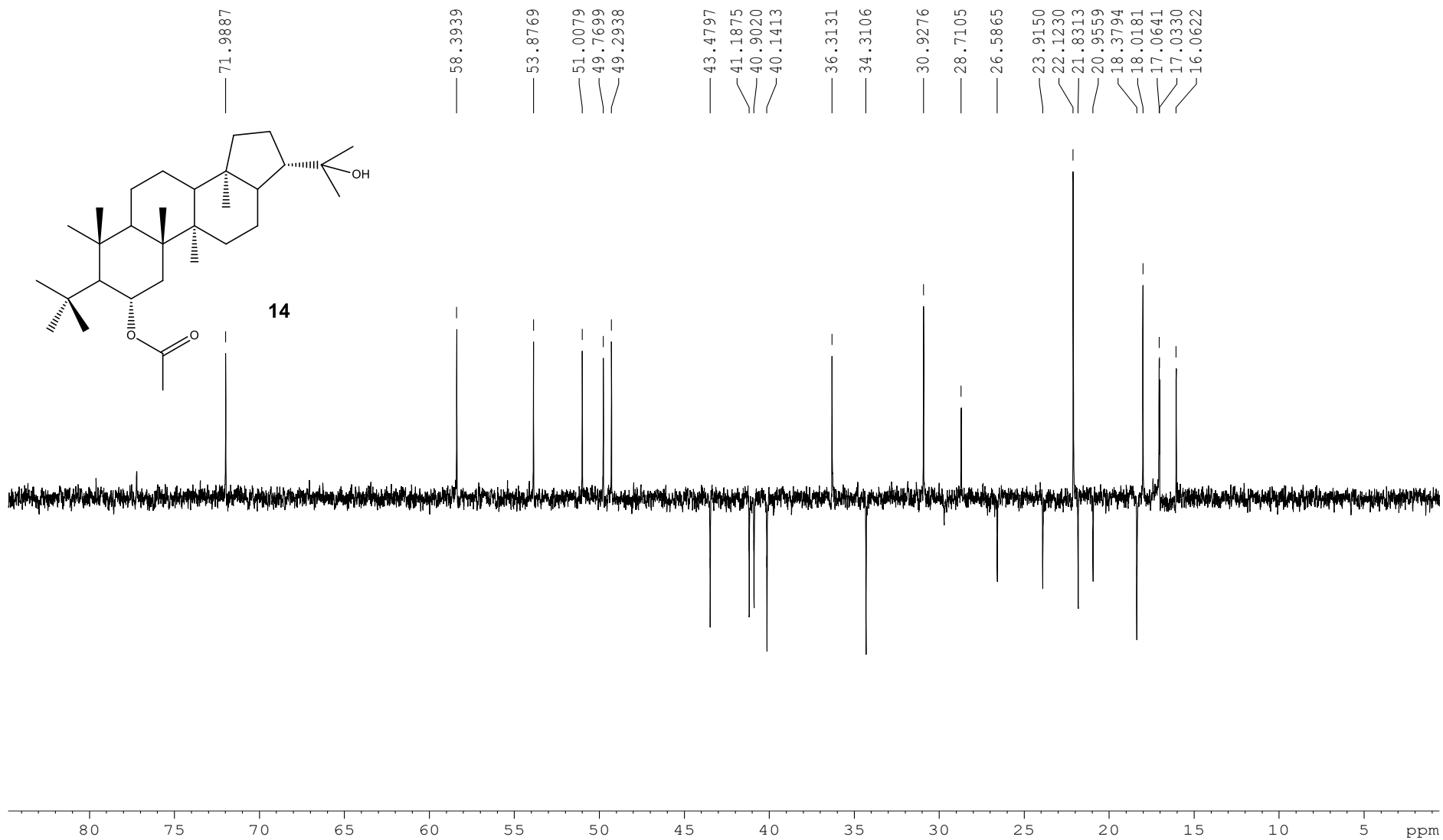
CQ22
CDC13Ampliación espectro ¹H-RMN compuesto **14**

CQ22
CDC13

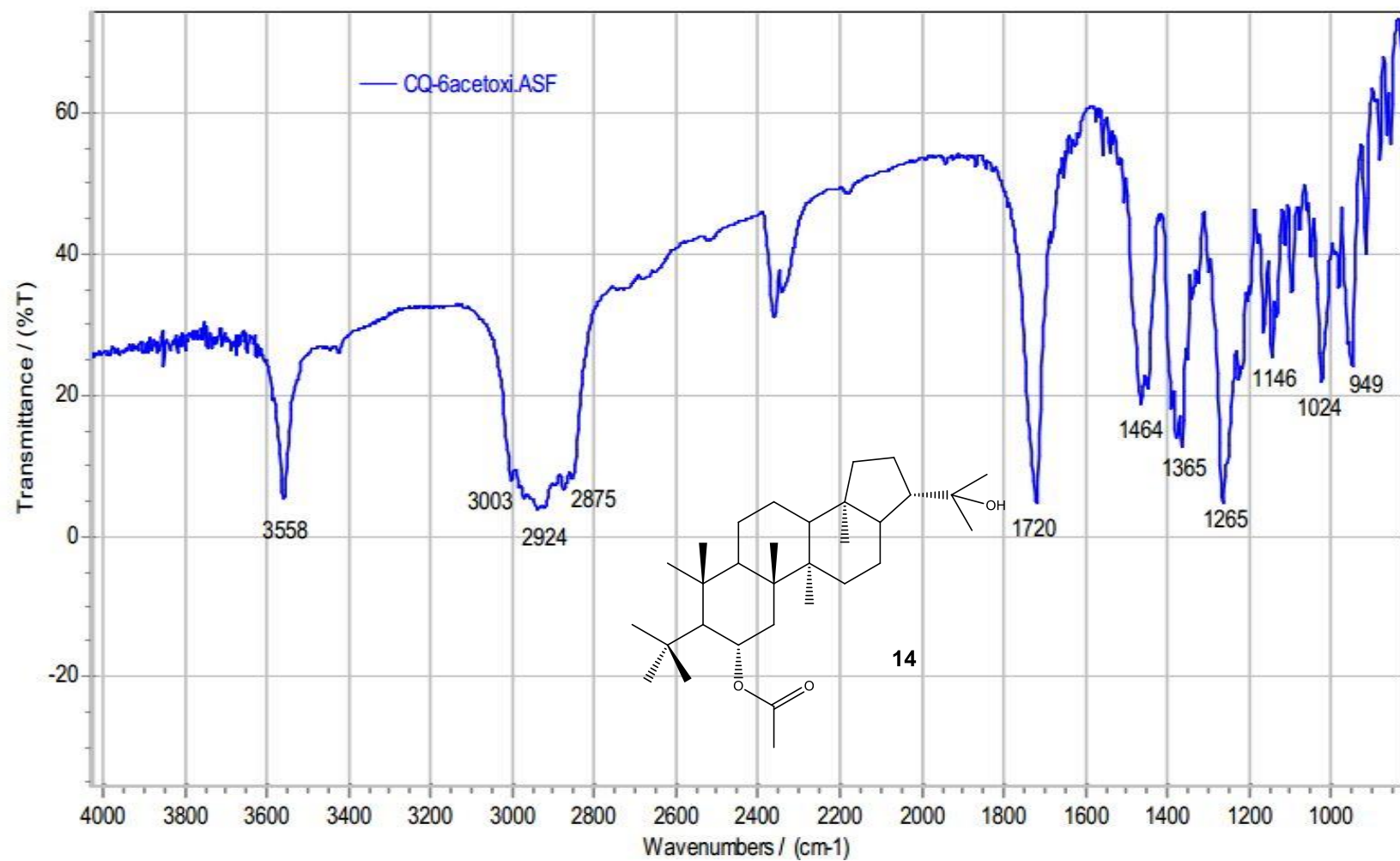
— 170.3704

77.3166
76.9995
76.6817
73.8939
71.9745
58.3925
53.8801
51.0028
49.7744
49.2981
43.9403
43.4689
42.6674
41.9555
41.1855
40.8984
40.1417
39.5285
36.2917
34.3104
33.1479
30.9111
28.7133
26.5655
23.9107
22.1032
21.8226
20.9562
18.3679
18.0022
17.0470Espectro ^{13}C -RMN compuesto **14**

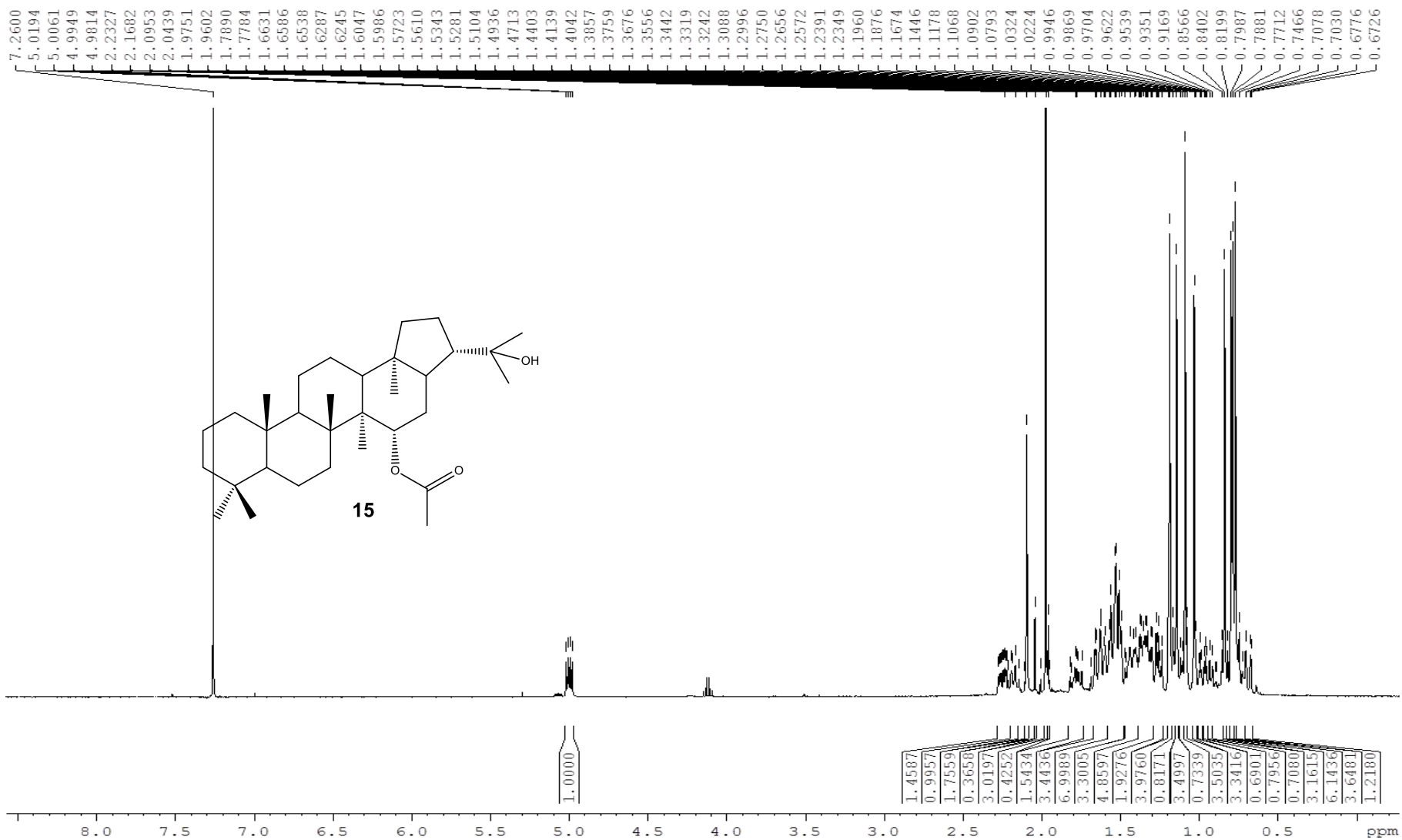
Ampliación espectro ^{13}C -RMN compuesto **14**

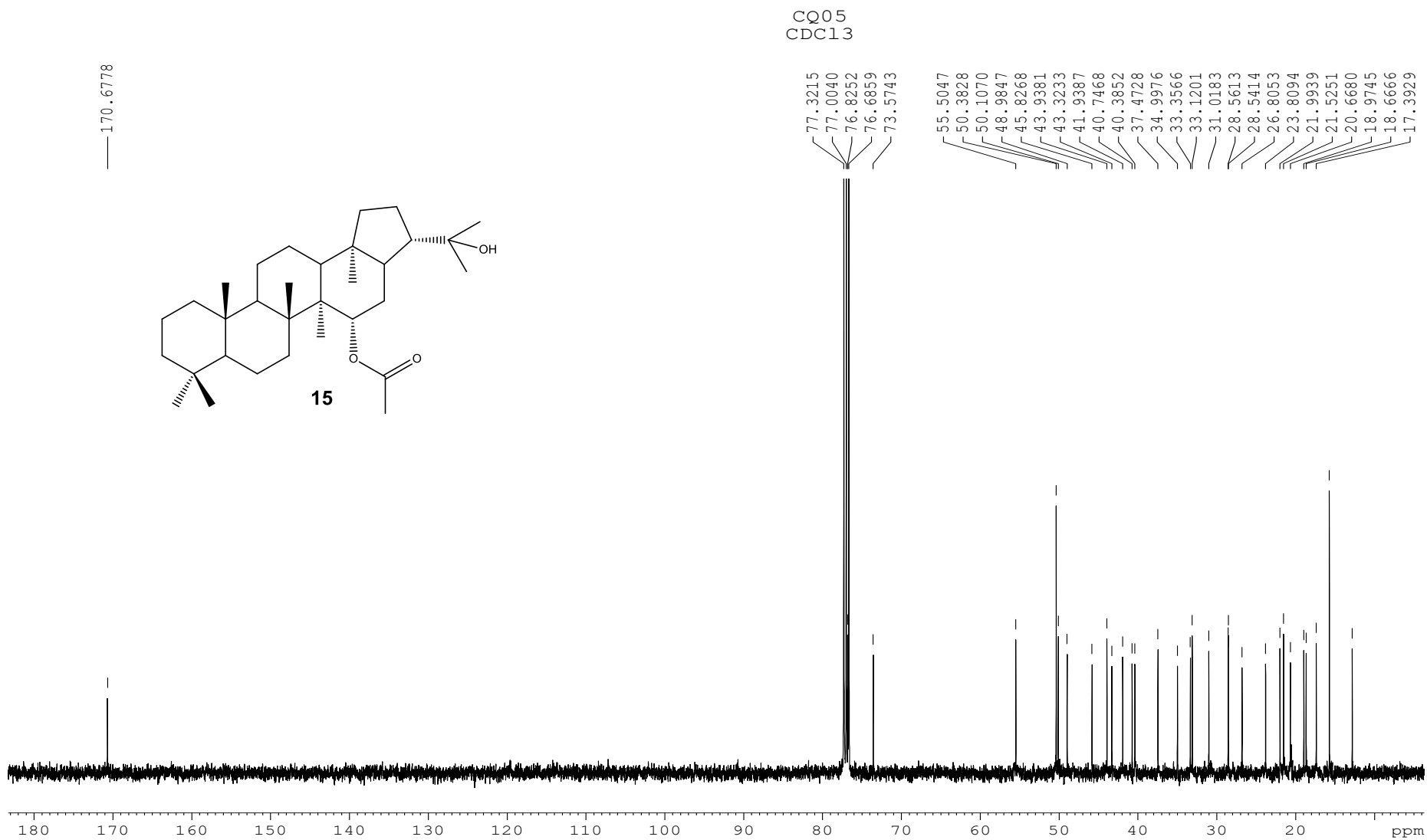
CQ22
CDC13

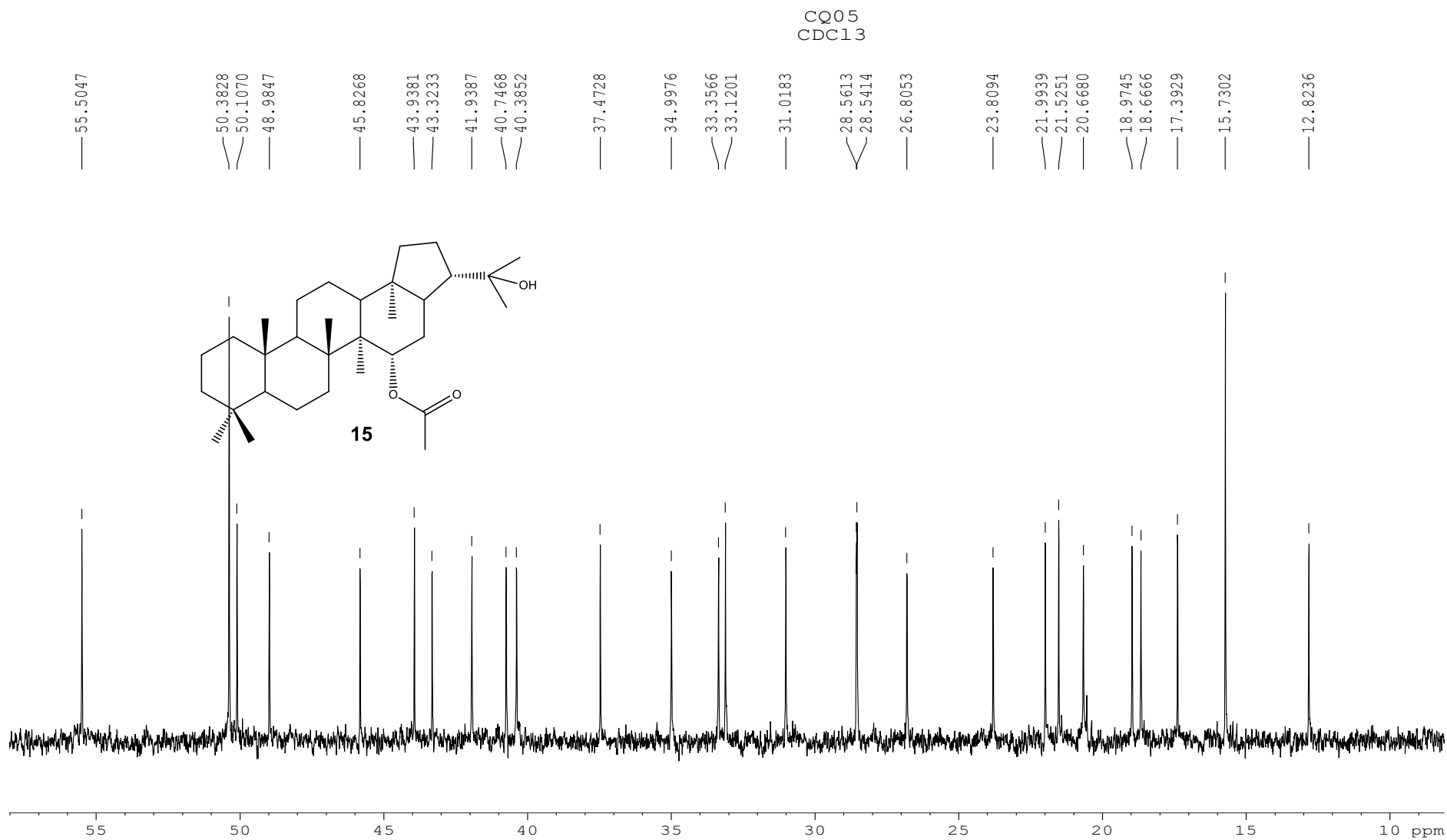
Espectro DEPT-135 compuesto 14

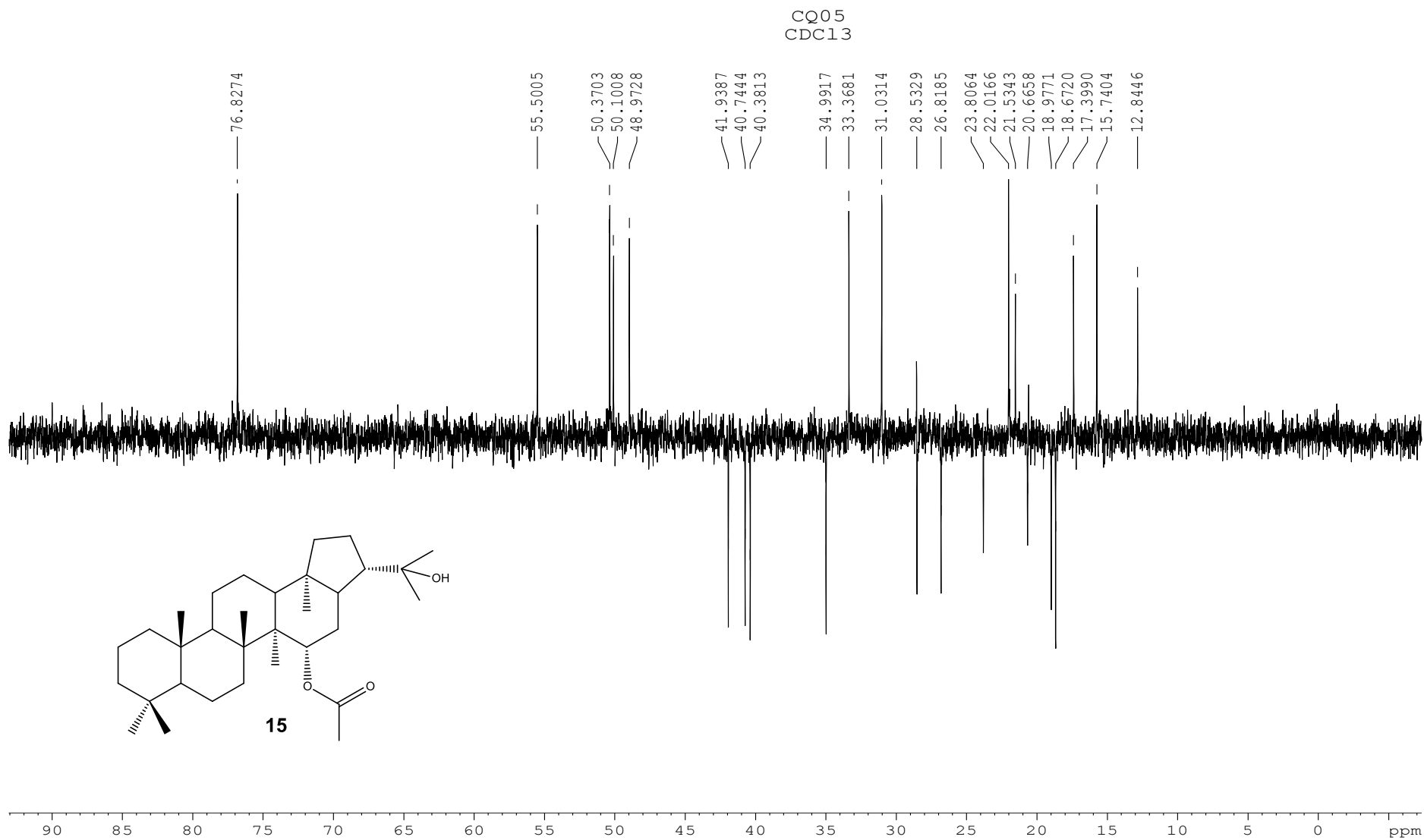


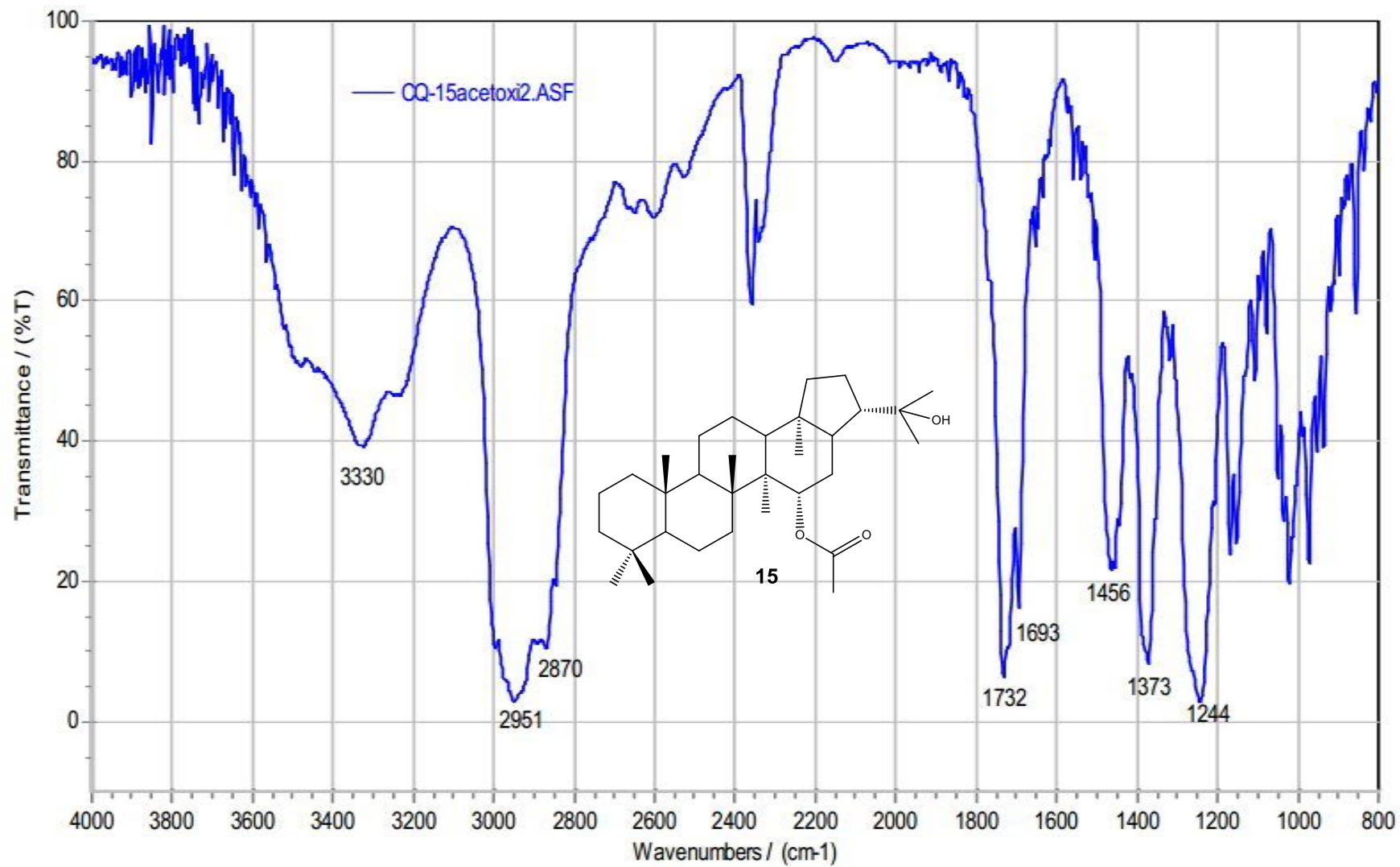
Espectro IR compuesto 14

CQ05
CDC13Espectro ¹H-RMN compuesto 15

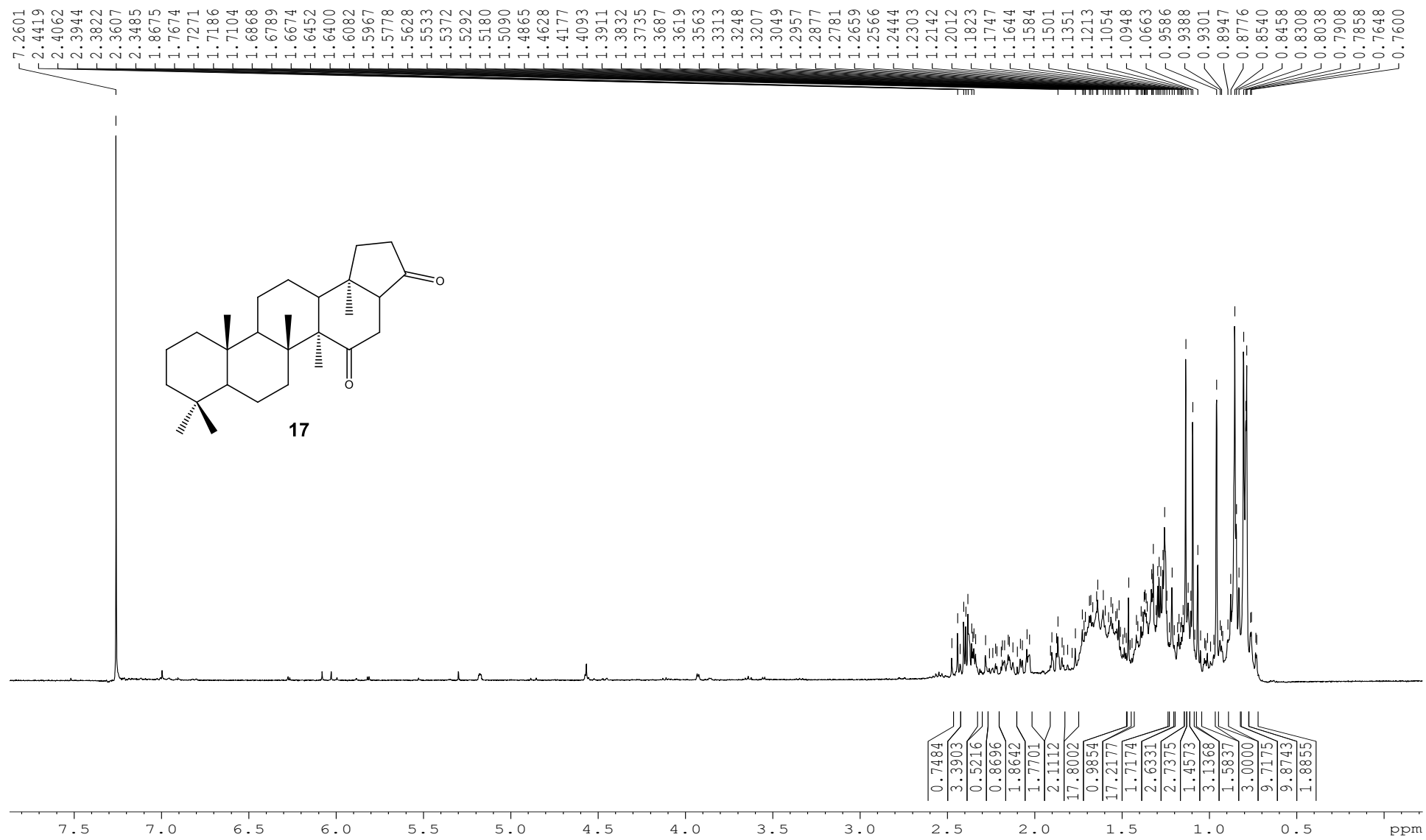
Espectro ^{13}C -RMN compuesto 15

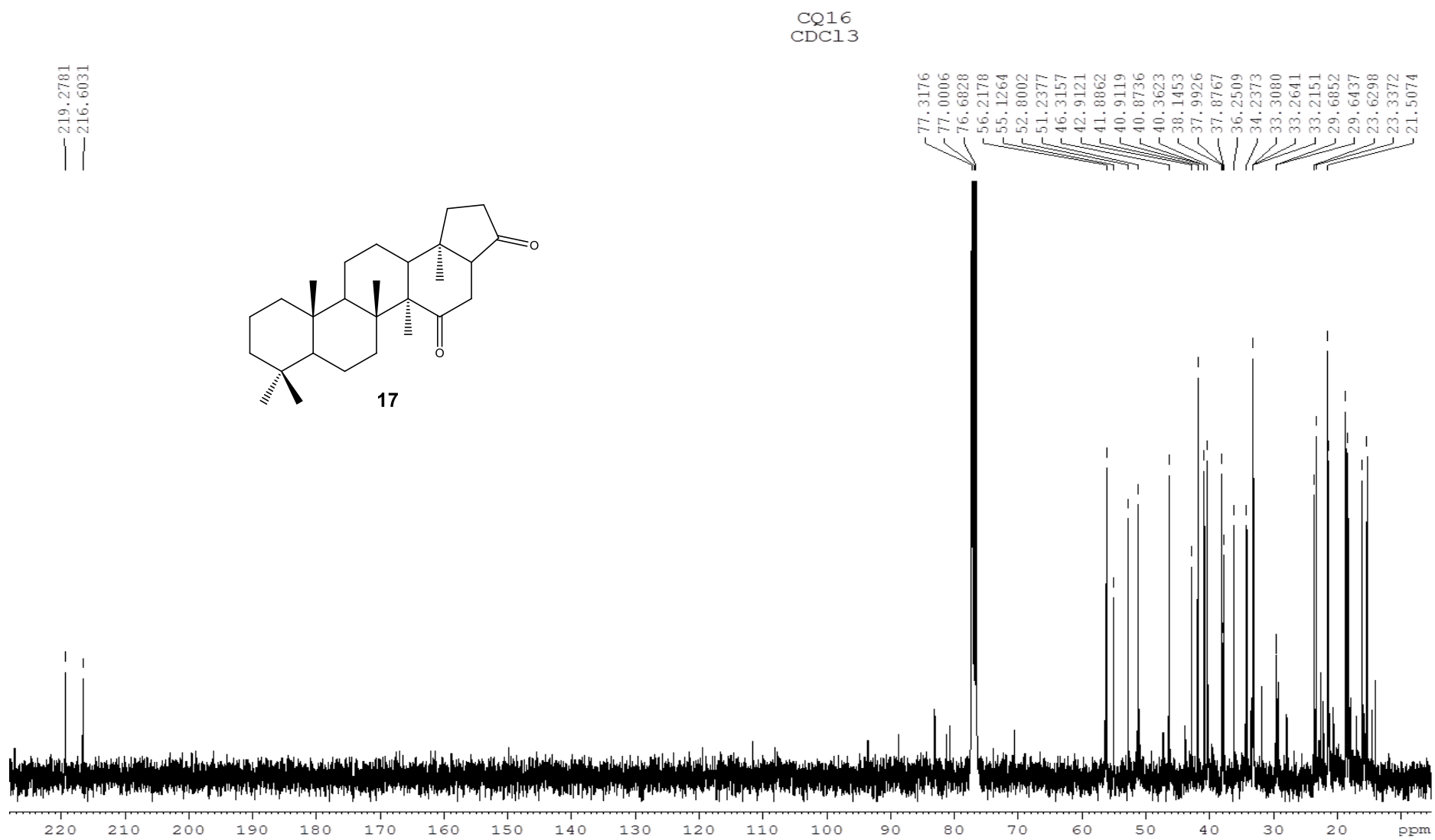


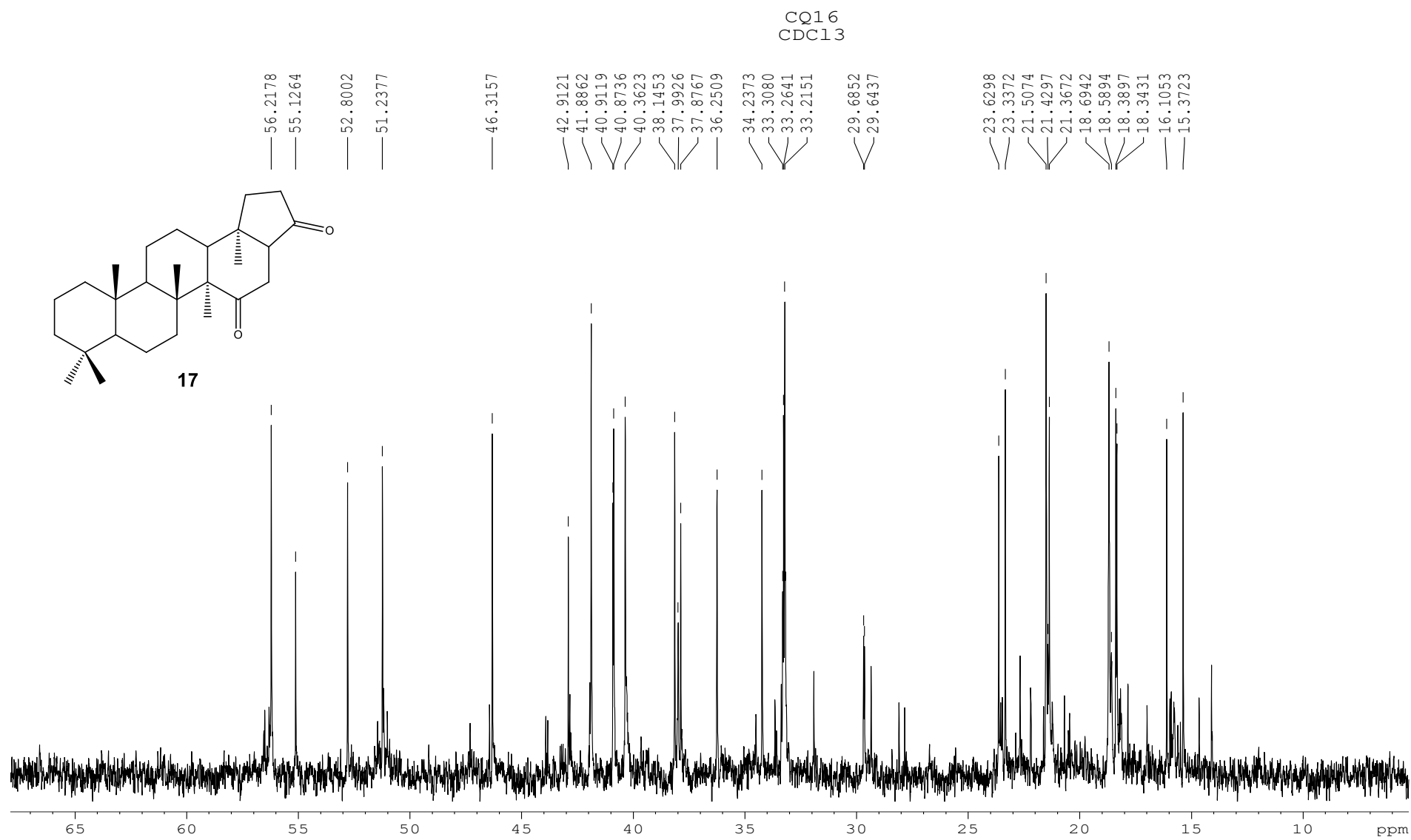
Espectro DEPT-135 compuesto **15**

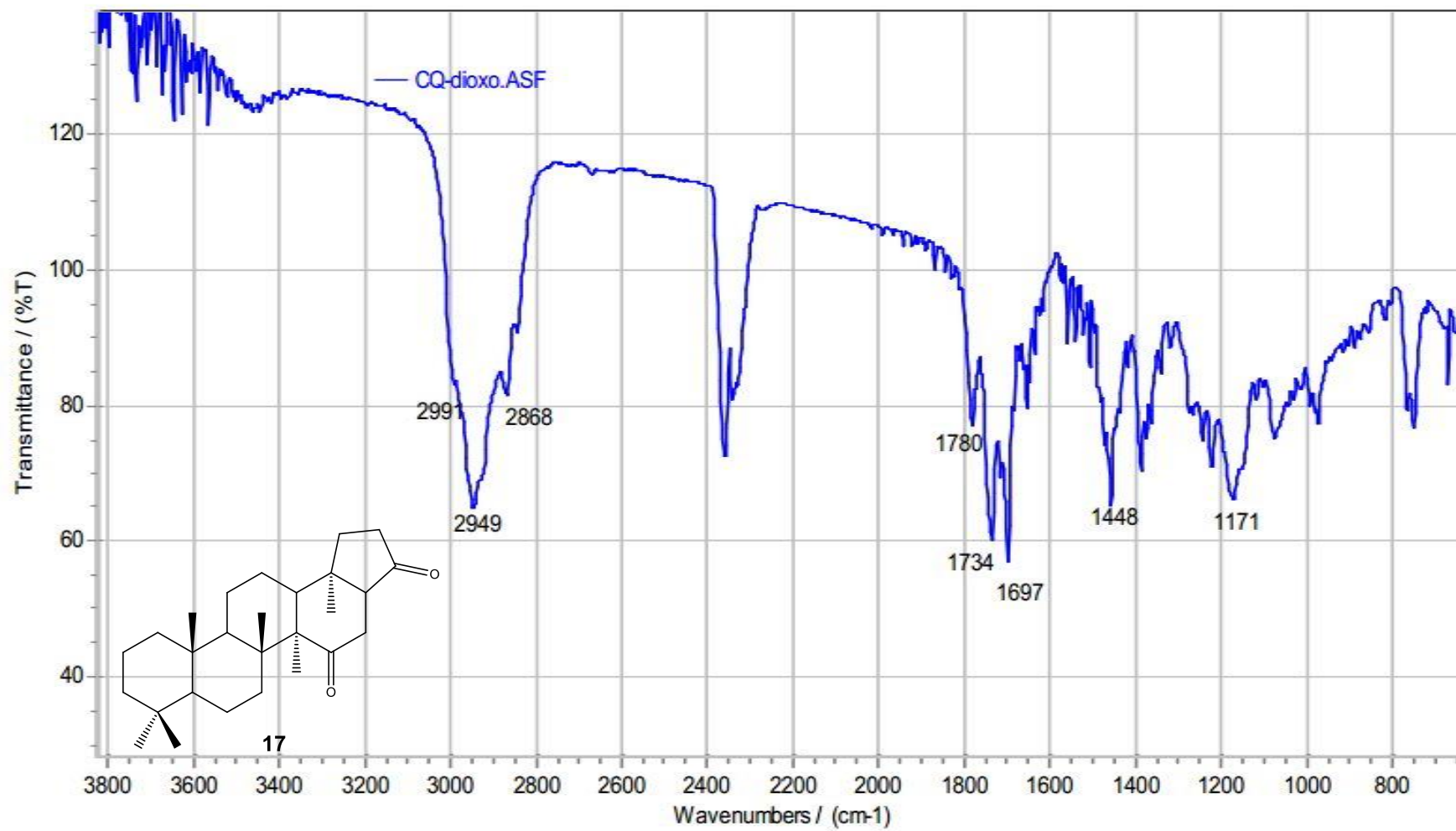


Espectro IR compuesto 15

CQ-16
CDC13Espectro ¹H-RMN compuesto 17

Espectro ^{13}C -RMN compuesto 17

Ampliación espectro ^{13}C -RMN compuesto 17



Espectro IR compuesto 17