Benemérita Universidad
Autónoma de Puebla
Posgrado en Ciencias Químicas

EXTRACCIÓN DE DICETOPIPERAZINAS A PARTIR DE UNA CEPA DE *Bacillus endophyticus* Y SU SÍNTESIS ORGÁNICA

Tesis presentada para obtener el título de:

Maestría en Ciencias Químicas
En el área de Química Orgánica

PRESENTA

Q.F.B. FRANCISCO FIDEL SALAZAR DE LA LUZ

DIRECTORES DE TESIS
DRA. ESTIBALIZ SANSINENEA ROYANO
DR. J. AURELIO ORTÍZ MARQUÉZ

ABRIL 2016

Índice

Abreviaturas 3

Resumen 5

Abstract 6

1.- Introducción 7

2.- Antecedentes 9

2.1 Metabolitos secundarios 9

2.2 Bacterias del género *Bacillus* 12

2.3 *Bacillus endophyticus* y su relación con el crecimiento vegetal 14

2.4 Los ciclodipéptidos y sus actividades biológicas 16

2.5 Los ciclodipéptidos y su síntesis orgánica 19

3.- Objetivos 21

3.1 Objetivo general 21

3.2 Objetivos particulares 21

4.- Discusión de resultados 22

4.1 Extracción 23

4.2 Purificación 25

4.3 Caracterización 26

4.3.1 Compuesto 1 26

4.3.2 Compuesto 2 36

4.4 Pruebas biológicas 46

4.5 Síntesis orgánica de dicetopiperazinas 51

5.- Conclusiones 63

6.- Desarrollo experimental 65

7.- Bibliografía 76

Abreviaturas

2D	Dos dimensiones
µL	Microlitro
AcCl	Cloruro de Acetilo
AcOEt	Acetato de etilo
AIA	Ácido indol-3-acético
Boc	*tert*-butoxicarbonilo
COSY	Correlación espectroscópica homonuclear
d	Señal doble
dd	Señal doble de dobles
septd	Señal séptuple de dobles
DCC	N,N'-diciclohexilcarboimida
DIPEA	N,N-diisopropiletilamina
DCM	Diclorometano
DMAP	4-(dimetilamino)piridina
DMF	Dimetilformamida
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carboimida
EI-MS	Espectrometría de masas por Impacto Electrónico
HBTU	2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3,-tetrametiluranio hexa-fluorofosfonato

HR-MS	Espectrometría de Masas de Alta Resolución
HSQC	Correlación Quantum Simple Heteronluclear
IR	Espectroscopía Infrarroja
J	Constante de acoplamiento
LB	Medio de cultivo bacteriano Luria Bertani
M	Concentración Molar
NIC	Número de insaturaciones y/o ciclos
PDA	Medio de cultivo fúngico agar papa-dextrosa
p.f	Punto de Fusión
QS	Relación planta-bacteria quorum-sensing
R	Resistente
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
rpm	Revoluciones por minuto
s	Señal simple
t	Señal triple
TLC	Cromatografía en capa fina
t.a	Temperatura ambiente
TSB	Medio de cultivo bacteriano caldo tripticaseína de soya

Resumen

La presente tesis de Química Orgánica está desarrollada específicamente en el área de Productos Naturales, la cual comprende el estudio de las moléculas de la naturaleza que se encuentran en organismos vivos.

En este proyecto se utilizó la bacteria *Bacillus endophyticus* que en un medio de cultivo apropiado le aporten nutrientes (azúcares y péptidos) y en condiciones de temperatura y agitación idóneas para su crecimiento bacteriano produzca compuestos orgánicos de interés biológico y/o industrial.

Mediante una extracción del medio de cultivo sin células con acetato de etilo se obtendrá un extracto crudo y a partir de este se lograron aislar, purificar e identificar dos dicetopiperazinas: ciclo (L-Pro–L-Val) y ciclo (L-Pro–L-Try) utilizando técnicas cromatográficas en columna, TLC y placa preparativa. Las estructuras de estos compuestos se establecieron por métodos espectroscópicos como RMN ^{1}H, RMN ^{13}C, COSY, HSQC, IR y HR-MS. Para obtener mayor cantidad de estos compuestos se realizó de manera fácil su síntesis orgánica y finalmente se probó su actividad antibacteriana y antifúngica con microorganismos de interés médico e industrial.

Abstract

This thesis of Organic Chemistry is developed specifically in the area of Natural Products, which includes the study of nature molecules found in living organisms.

It endophyticus that the bacteria Bacillus in a suitable culture medium will provide nutrients (sugars and peptides) and suitable conditions of temperature and stir for bacterial growth industry produces organic compounds of biological interest and/or used in this project.

By extraction of the culture medium without cells with ethyl acetate crude extract you are obtained and from this is able to isolate, purify and identify two diketopiperazines: cycle(L-Pro–L-Val) y cycleL-Pro–L-Try) using chromatographic techniques column and preparative TLC plate. The structures of these compounds were established by spectroscopic methods as ^{1}H NMR, ^{13}C NMR, COSY, HSQC, IR and HR-MS. For more of these compounds was performed easily its organic synthesis and finally its antibacterial and antifungal activity was tested with microorganisms of medical and industrial interest.

Introducción

El desarrollo alcanzado por las ciencias de la vida en los últimos 50 años ha dado paso a la Biotecnología que implica, no solo conocimiento de los seres vivos, sino la posibilidad de intervención genética en los procesos biosintéticos con los que modifican características y funcionamiento de manera radical de algún ser vivo. El hecho de utilizar a los organismos vivos sin modificar genéticamente y que éstos nos ayuden a mejorar algún proceso es parte de la biotecnología o que incluyan a los microorganismos (bacterias u hongos), utilizando sus metabolitos secundarios para el beneficio de la humanidad. Una de las aplicaciones de la Biotecnología es la utilización de los metabolitos secundarios extraídos de diferentes fuentes naturales como son los ecosistemas terrestres y marinos. En el primero tenemos plantas con sus diferentes partes de la misma y en el segundo tenemos a los corales, algas, esponjas, sin embargo en ambos ecosistemas encontramos a los microorganismos tales como bacterias y hongos que son de importancia para esta ciencia. De esta manera la producción de importantes compuestos por parte de los organismos vivos es muy interesante ya que en ellos pueden encontrarse moléculas con diferentes actividades biológicas como antibióticos, antitumorales etc. A estas moléculas se les llaman también **Productos Naturales**.

El conjunto de reacciones específicas mediante el cual los organismos fabrican sus propias sustancias y mantiene la vida se conoce como metabolismo. Por definición, los metabolitos primarios son aquellos que se producen en la fase exponencial y son necesarios para la sobrevivencia del microorganismo. Mientras que los metabolitos secundarios son moléculas sintetizadas por determinados microorganismos, que se producen en la fase estacionaria y aunque no son imprescindibles para el microorganismo, juegan papeles como la protección y supervivencia propia en el ambiente que lo rodea.

La exploración de la diversidad microbiana y la cantidad de metabolitos secundarios producidos por bacterias ha llevado a considerarlos como una fuente importante de productos naturales con propiedades biológicas como antibacterianos, antifúngicos, antitumorales, etc. Las especies de *Bacillus* son capaces de producir un amplio rango de metabolitos secundarios de estructura muy diferente mostrando un amplio espectro de actividades. Estos metabolitos incluyen antibióticos, pigmentos, toxinas, promotores de crecimiento y otros compuestos bioactivos que están diseñados para capacitar a la bacteria para sobrevivir en su ambiente natural. En general estos metabolitos sirven como: armas competitivas usadas contra otras bacterias, hongos, amebas, plantas e insectos, agentes transportadores de metales, efectores de simbiosis, hormonas sexuales y factores de diferenciación. En trabajos previos del laboratorio se había identificado una cepa con alto poder inhibitorio contra varias bacterias y hongos. Esto dio pauta a pensar en que era una cepa productora de metabolitos secundarios con diferentes actividades biológicas.

Por lo que en este trabajo, se propuso la extracción de metabolitos secundarios y su purificación a partir de un extracto crudo de un cultivo celular de una cepa de *Bacillus endophyticus*. A partir del extracto crudo se lograron separar, purificar e identificar dos dicetopiperazinas: ciclo(L-Pro-L-Tyr) y ciclo(L-Pro-L-Val) utilizando técnicas cromatográficas en columna, TLC y placa preparativa. Las estructuras de estos compuestos se lograron establecer por métodos espectróscopicos tales como RMN ^{1}H, RMN ^{13}C, COSY, HMQC, y HR-MS. Con el objetivo de tener mayor cantidad de los compuestos, se propuso la síntesis de estos obteniéndolos en dos pasos con un rendimiento moderado. Se probaron las actividades antibacterianas y antifúngicas de estos compuestos, contra varias bacterias Grampositivas y Gramnegativas de interés médico como son *Escherichia coli, Pseudomonas sp, Salmonella cholerasuis, Serratia marcescens* y *Staphylococcus aureus* y contra varios hongos fitopatógenos causantes de plagas en cultivos agrícolas, como son *Mucor sp, Penicillium sp* y *Fusarium oxysporium*.

Antecedentes

La Biotecnología es la aplicación de diferentes métodos para manipular características genéticas y bioquímicas de un organismo, de manera que el organismo mismo o sus metabolitos puedan producirse económicamente para nuestro beneficio. Por tal motivo, la Biotecnología ha emergido como una ciencia aplicada a la agricultura, medicina, ciencias ambientales y la industria. La Biotecnología es multidisciplinaria y se fundamenta en la formación básica de diferentes áreas como la Microbiología, Biología Molecular, Química, entre otras ciencias. Una de las sub-disciplinas de la Biotecnología es la utilización en beneficio del hombre de los metabolitos secundarios extraídos de diferentes fuentes naturales como son microorganismos, plantas, corales, algas,…etc.[1]

2.1 Metabolitos secundarios

Bacillus sp. secreta muchos metabolitos secundarios, incluyendo antibióticos, y/o antifúngicos como la zwittermicina A y sideróforos petrobactina (ver figura 1). Los metabolitos producidos por *Bacillus* sp. pueden también afectar la microflora en la rizósfera generando un ambiente antagónico hacia organismos patógenos que lo rodean. La gran diversidad y la variabilidad genética de las especies de *Bacillus*, hace que este microorganismo genere una gran cantidad de metabolitos de diferente estructura química con variadas aplicaciones en el ambiente, la agricultura y la biotecnología industrial.[1]

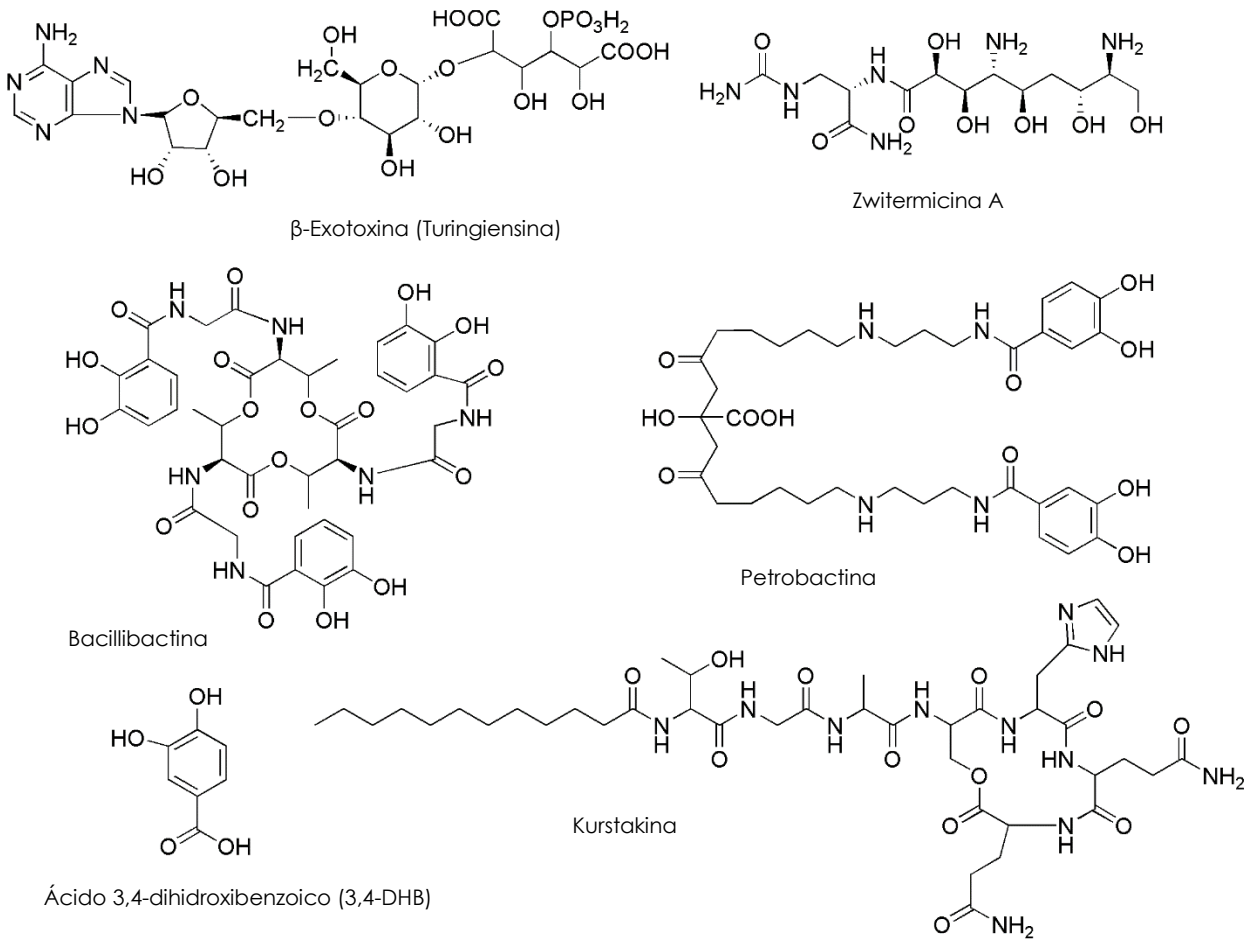


Figura 1: Metabolitos secundarios encontrados en *B. thuringiensis*

Por definición, los metabolitos primarios son aquellos que se producen en la fase exponencial y son necesarios para la sobrevivencia del microorganismo. Mientras que los metabolitos secundarios son moléculas sintetizadas por determinados microorganismos, que se producen en la fase estacionaria y aunque no son imprescindibles para el microorganismo, tienen funciones como la protección y supervivencia propia en el ambiente que lo rodea. Sus características son:

- No son necesarios para el crecimiento del microorganismo que los produce. En estado natural, sus funciones se hallan ordenadas a la supervivencia de la especie, pero cuando los microorganismos que los producen se desarrollan en cultivo puro, los metabolitos secundarios no desempeñan esa misión.
- Generalmente se producen como mezclas de productos muy relacionados químicamente entre sí.
- Cada uno de estos productos es producido por un grupo muy reducido de organismos.
- La producción puede perderse fácilmente por mutación espontánea (degeneración de la raza), por lo que son muy importantes las técnicas de conservación de estos microorganismos.

De todos los productos tradicionales obtenidos por fermentación, los más importantes para la salud humana son los metabolitos secundarios. Donde se incluyen, los antibióticos como es la penicilina o la estreptomicina, toxinas, alcaloides, factores de crecimiento vegetal y pigmentos como se observa en la figura 2.[3]

Figura 2: Aplicaciones de los metabolitos secundarios

La amplia variabilidad de estructuras y actividades de los compuestos secundarios expande el potencial de la importancia industrial y biotecnológica del género *Bacillus* con sus especies relacionadas.[4]

2.2 Bacterias del género *Bacillus*

Las bacterias pertenecientes al género *Bacillus* tienen una larga y distinguida historia en los ámbitos de la biotecnología. En este género se incluyen muchas bacterias versátiles, tales como los agentes de control biológico, estas bacterias son muy eficaces para tratar diversas plagas de insectos. *Bacillus thuringiensis* es una Grampositiva, aeróbica facultativa, formadora de esporas y puede ser aislada fácilmente de heces de insectos muertos en medios de cultivos simples, tal como el agar nutritivo aunque también se encuentra en una variedad de fuentes naturales incluyendo suelo, agua, superficie de plantas e insectos muertos.

Figura 3: *Bacillus thuringiensis* visto morfológicamente y microscópicamente

El ciclo de vida del género *Bacillus* es simple, ya que cuando los nutrientes y las condiciones ambientales son suficientes para el crecimiento, la espora germina produciendo una célula vegetativa que crece (ver figura 3) y se reproduce por fusión binaria. Las células continúan multiplicándose hasta que uno o más nutrientes, tales como azúcares, aminoácidos, u oxígeno, llega a ser insuficiente para continuar el crecimiento vegetativo. En estas condiciones, la célula vegetativa produce una espora y en el caso de *B. thuringiensis* junto con la

espora además produce un cuerpo paraesporal. Este último está compuesto principalmente de una o más proteínas insecticidas en forma de inclusiones cristalinas, estas son una valiosa alternativa a los pesticidas químicos para el control de plagas de insectos en la agricultura y la salud.[5]

La diversidad y la variabilidad genética de las especies de *Bacillus* y de los géneros relacionados, es bastante alta haciendo de este reservorio natural, una fuente enorme para el desarrollo de nuevas cepas o enzimas para nuevas aplicaciones en el ambiente, la agricultura y la biotecnología industrial.[6]

Hay especies de *Bacillus* que son residentes de los tejidos internos de varias plantas, incluido el algodón, uvas, chícharos y maíz, donde estos microorganismos juegan un papel importante en la protección de las plantas y la promoción del crecimiento como se muestra en la figura 4. Se piensa comúnmente que la actividad antagonista es un factor importante en su capacidad para proteger la planta de hongos y bacterias fito-patógenas. De hecho la producción de antibióticos y enzimas hidrolíticas es una característica de muchos bacilos endófitos incluyendo a *B. cereus*, *B. pumilus* y *B. subtilis*. Sin embargo, es cada vez más evidente que las relaciones entre plantas y su flora endófita son más complejos y estas bacterias pueden estar involucradas en la producción de factores de promoción de crecimiento y mediadores que inducen resistencia natural de la planta.

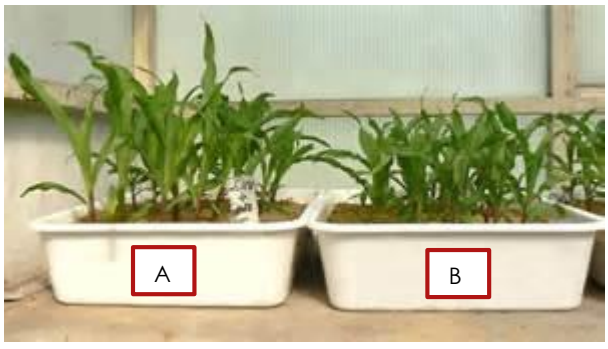


Figura 4: Ejemplo de la actividad de un promotor de crecimiento vegetal (A)

Toda rizobacteria, aeróbica formadora de esporas descritas hasta la fecha pertenecen a especies como organismos de vida libre encontrados en el suelo, incluyendo a distintas especies de *Bacillus* como son: *B. cereus*, *B. insolitus*, *B. megaterium*, *B. pumilus*, *B. subtilis* y *Paenibacillus polymyxa*, aunque en muchos casos hay bacterias que no han sido identificados más allá del nivel de género.

El grupo de investigación de Reva en 2002, realizaron una caracterización fenotípica de 76 cepas aisladas de los tejidos internos de las plantas de algodón sanas (*Gossypium* sp, Dushande, Tayikistán), en la cual se identificó exitosamente una nueva especie del género *Bacillus*, a la cual nombraron *Bacillus endophyticus* sp.[7]

2.3 *Bacillus endophyticus* y su relación con el crecimiento vegetal

Bacillus endophyticus (su nombre proviene del término "aislado de dentro de la planta", debido al aislamiento original a partir de tejidos vegetales) es un bacilo Grampositivo, de un tamaño de 0.5-1.4 x 2.5-3.5 µm que se producen por separado y en cadenas como cortas o largas que parecen del tipo filamentoso. Es no móvil. Produce endosporas elipsoidales que se encuentran en posición subterminal o terminales en un esporangio no hinchado. En cuanto a la morfología macroscópica se pueden observar como colonias que son circulares de color opaco de tipo sicosa con bordes enteros o ligeramente dentados alrededor de 1-3 mm de diámetro. El crecimiento se produce de 10-45 °C, siendo la temperatura óptima de crecimiento de aproximadamente 28 °C. El crecimiento se produce en la presencia de 10% de NaCl, siendo su hábitat asociado a plantas y aislado principalmente de tejidos internos de las plantas. Múltiples especies de *Bacillus* han sido identificadas como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal además de la producción de antibióticos, la inhibición de síntesis de etileno de la planta y la inducción de la resistencia sistémica de las plantas.[8]

Respecto a las especies que pueden favorecer el crecimiento vegetal, un campo reciente y fundamental de la biología es el estudio de los procesos que regulan la interacción entre las bacterias y los eucariontes, ya que las bacterias pueden comunicarse a través de señales moleculares, en un proceso conocido como quorum-sensing (QS). Las bacterias, tanto patógenas como simbiontes de las plantas, requieren del QS para comunicarse satisfactoriamente con sus huéspedes. Las plantas por otra parte han desarrollado múltiples mecanismos para percibir estas señales químicas. Las bacterias que habitan la rizósfera pueden influir sobre el crecimiento vegetal mediante la producción de fitohormonas, tales como el ácido indol-3-acético (AIA, ver figura 5), auxinas naturales u otros metabolitos secundarios.[9]

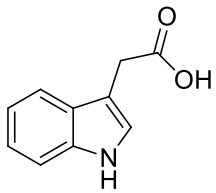


Figura 5: AIA principal auxina natural

La aplicación de estos metabolitos relacionados estimula la formación de raíces laterales y pelos radiculares, los cuales participan en la captación de agua y nutrientes y esto permite un incremento en la producción de biomasa.

2.4 Los ciclodipéptidos y sus actividades biológicas

La comunicación planta-bacteria puede ocurrir por medio de diferentes compuestos, algunos de los cuales mimetizan la actividad de fitohormonas endógenas. Los ciclodipéptidos y sus derivados las dicetopiperazinas constituyen una clase novedosa de moléculas pequeñas sintetizadas por microorganismos a las cuales se les ha encontrado diversas funciones biológicas tal como ser promotoras del crecimiento vegetal, antibacterial o antifúngica. Por ejemplo, como se observa en la figura 6, el compuesto ciclo (L-Phe-L-Pro) actúa como antifúngico.

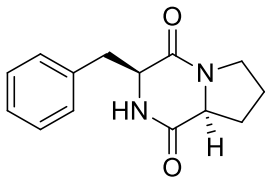


Figura 6: ciclo(L-Pro–L-Phe) con actividad antifúngica

Aunque las dicetopiperazinas son moléculas bioactivas notables, existe poca información concerniente a su biosíntesis en bacterias y su papel en la comunicación con las plantas, todo este estudio dio como resultado el análisis de 3 dicetopiperazinas como promotores de crecimiento vegetal.[9]

En 2012 Arachchilage investigaron la estructura de tres ciclodipéptidos mostraados en la figura 7, compuestos cíclicos que son biológicamente activos.

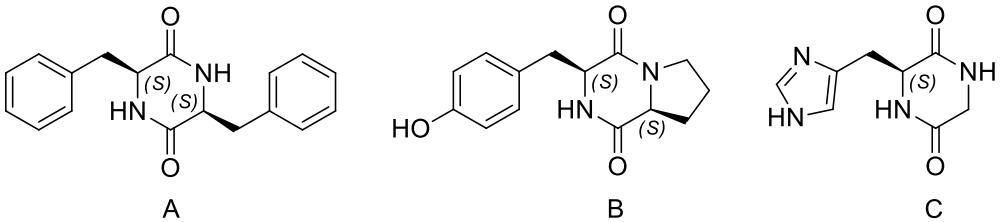


Figura 7: A) ciclo(L-Phe–L-Phe), B) ciclo(L-Pro–L-Tyr) C) ciclo(L-His–L-Gly)

Estos ciclodipéptidos consisten en un anillo que contiene dos enlaces peptídicos y esta estructura cíclica confiere una gran estabilidad y resistencia a la digestión humana. Esta última propiedad permite que los dipéptidos sean utilizados como andamios para medicamentos, además de poseer una serie de propiedades biológicas interesantes, incluyendo propiedades antivirales, antibióticas y actividad antitumoral. Muchos organismos tanto marinos como terrestres forman algunos de estos compuestos y estos han demostrado ser prometedores para varias rutas en la industria farmacéutica y con múltiples funciones.[10]

Nakagawa en 2013 describió una dicetopiperazina, ciclo(L-Pro–L-Tyr), también llamado macusolin. Varios informes también han descrito a macusolin por tener varias bioactividades, incluso como una citotoxina de la hierba anual *Centaurea maculosa*. (Figura 8)

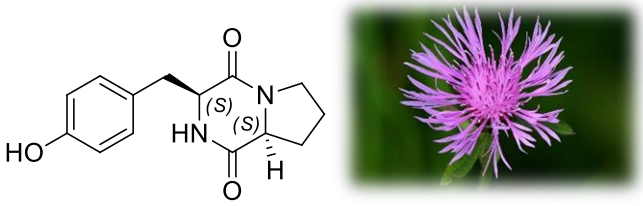


Figura 8: Macusolin o ciclo(L-Pro–L-Tyr) y *Centaurea maculosa*

Las actividades antimicrobianas de macusolin son débiles. Este compuestos mostró una débil actividad contra *Escherichia coli*. El grupo hidroxilo del residuo de tirosina en esta molécula es la única posición en la que un enlace covalente con biotina se puede formar en su forma natural. Para determinar si este grupo hidroxilo es importante para la bioactividad de macusolin, se sintetizó (L-Phe-L-Pro), un análogo que carece de este grupo hidroxilo, ver figura 9).

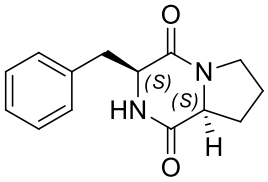


Figura 9: Análogo del Macusolin, ciclo(L-Pro–L-Phe)

El análogo macusolin sintetizado no exhibió actividad contra *E. coli*. El grupo de hidroxilo del residuo tirosina, por lo tanto, parecía ser importante para su bioactividad.[11]

Kumar y col. en 2012 presentaron un estudio con el objetivo de determinar los efectos sinérgicos de tres dicetopiperazinas, ciclo(L-Pro–L-Leu), ciclo(D-Pro–L-Leu), y ciclo(D-Pro–L-Tyr) (Figura 10) purificándolas a partir de un cultivo de *Bacillus* sp. La concentración inhibitoria mínima y la concentración bactericida mínima de las dicetopiperazinas se comparó con la de los antibióticos estándar. Los resultados de ese estudio mostraron que los efectos combinados de dicetopiperazinas eran predominantemente sinérgico. Estos resultados sugirieron que la combinación de dicetopiperazinas puede ser microbiológicamente benéfica. Estos hallazgos tienen potenciales implicaciones en retrasar la resistencia bacteriana, ya que la inhibición se logra con bajas concentraciones de ambos fármacos.[12]

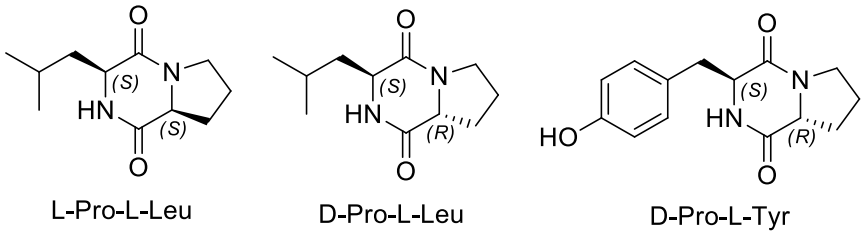
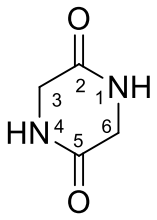


Figura 10: Ciclodipéptidos o dicetopiperazinas.

2.5 Los ciclodipéptidos y su síntesis orgánica

Como ya se ha comentado anteriormente los ciclodipéptidos han sido aislados de varios microorganismos. Sin embargo un problema de su extracción radica en la poca cantidad que se obtiene. Por ello los químicos se han dado a la tarea de realizar su síntesis.[13]

En su estructura resalta la 2,5-dicetopiperazina (Figura 11) que está presente en numerosos productos naturales y esta subunidad se encuentra a menudo sola o integrada en moléculas más complejas en una variedad de productos naturales que tienen la capacidad de unirse a una amplia gama de receptores. Son estructuras pequeñas y se encuentran conformacionalmente restringidas.



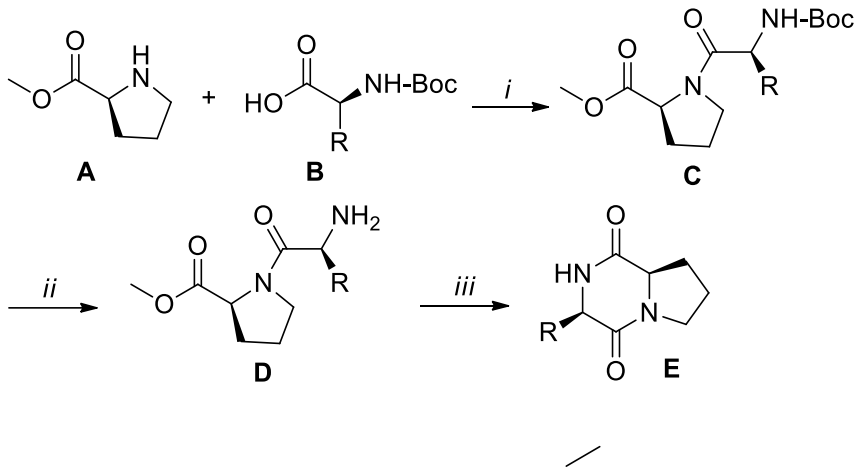
2,5-dicetopiperazina

Figura 11: Estructura general dicetopiperazina

Estos esqueletos moleculares, tienen diversos grupos sustituyentes, superan una de las limitaciones de agentes químicos medicinales convencionales, como es la característica típica que se encuentra en la mayoría de las sustancias farmacéuticas conocidas descubiertas a través de la síntesis orgánica.[13]

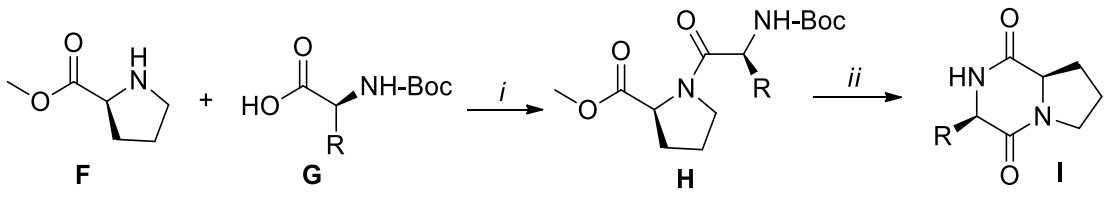
Los ciclodipéptidos más comunes son aquellos que se basan en la prolina y una síntesis general para ellos fue propuesta por Campbel y su grupo de investigación en 2009. En esta síntesis, el reactivo metil éster de la L-prolina **A** se acopló al aminoácido protegido *N*-Boc **B**, en presencia de carbodiimida para obtener **C**. Posteriormente ocurre la remoción del grupo Boc en condiciones ácidas para obtener aducto **D** el cual sufre una ciclación intramolecular en presencia de piperidina a temperatura ambiente para generar las

dicetopiperazinas **E** en un rendimiento global del 38%, como se muestra en el esquema 1.[14]



Esquema 1: Reactivos y condiciones: *i*) EDC-HCl, Et_3N, CH_2Cl_2, 4 °C, 16 h, *ii*) AcCl, MeOH, 0 °C, 180 min; *iii*) piperidina, DMF, 25 °C, 60 min.

Un año más tarde Thajudeen y col. proponen una síntesis verde en condiciones libres de catalizador y utilizando agua como disolvente. La reacción se basa en la misma primera etapa, acoplando los aminoácidos N-Boc protegidos **G** con el metil éster de la L-prolina **F** en DMF utilizando N,N-diisopropiletilamina (DIPEA) y hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3,-tetrametiluronio (HBTU) como un agente acoplante a temperatura ambiente, para dar el compuesto **H**. Posteriormente este compuesto **H** se desprotegió y cicló en un solo paso con el uso de agua para dar el compuesto **I**.[15]



Esquema 2: Reactivos y condiciones: *i*) HBTU, DIPEA, DMF, ta, *ii*) H_2O, 4 h, 130 °C, autoclave

Objetivos

Objetivo General

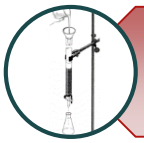
Búsqueda de compuestos orgánicos producidos por la bacteria *Bacillus endophyticus* crecida en un cultivo nutritivo de triticaseína de soya.

Objetivos Particulares

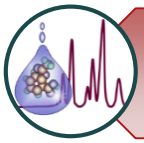
- Obtener un extracto crudo del cultivo bacteriano de *B. endophyticus* sin células, mediante la extracción con diferentes disolventes orgánicos.
- Tratar de aislar del extracto crudo compuestos orgánicos y purificar estos compuestos mediante cromatografía en columna.
- Realizar la caracterización por medio de diferentes técnicas espectroscópicas (RMN, IR, Espectrometría de Masas, etc) de cada uno de los compuestos obtenidos.
- Llevar a cabo las pruebas de actividad biológica; antibiogramas con bacterias y hongos.
- En base a las estructuras obtenidas proponer la síntesis orgánica de los compuestos naturales obtenidos de la bacteria *B. endophyticus*.

Discusión de Resultados

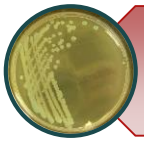
Extracción



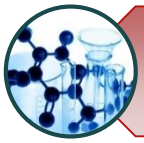
Purificación



Caracterización



Pruebas Biológicas



Síntesis Orgánica

4.1 Extracción

Para realizar la extracción se utiliza la cepa ELI 149 la cual es identificada como *Bacillus endophyticus* (Figura 12). En trabajos previos del laboratorio se había observado un alto poder de inhibición de esta cepa contra varias bacterias tanto grampositivas como gramnegativas y también contra varios hongos. Esto dio pauta a pensar que esta cepa secretaba metabolitos con diversas actividades biológicas.

Figura 12: Placa de la cepa ELI 149 donde se observa su morfología macroscópica, colonias de borde irregular color beige de aspecto mucoide.

Para el crecimiento de esta cepa, se inoculó una colonia crecida en placa, en medio líquido TSB (caldo de tripticaseína de soya), incubando por 7 días a 29 °C en una agitación constante de 175 rpm. Pasado el tiempo se procedió a centrifugar 15 min a 6000 rpm para obtener el cultivo sin células para su posterior extracción.

Para realizar la extracción del cultivo primeramente se utilizó el disolvente diclorometano (DCM), en una relación de volumen 1:1. Este disolvente no dio un buen resultado ya que se formaba una emulsión muy difícil de romper y el rendimiento por litro de cultivo era bajo, como se puede observar en la tabla 1.

Por ello se decidió utilizar acetato de etilo (AcOEt) en una relación de volumen 1:1, el cual dio un excelente resultado, ya que la formación de la emulsión fue menor y ésta se rompía al agitar vigorosamente. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio y se concentró a presión reducida obteniendo así un extracto crudo viscoso de color amarillo-marrón, de olor penetrante, como se muestra en la figura 13. Los rendimientos de la extracción con ambos disolventes se observan en la Tabla 1.

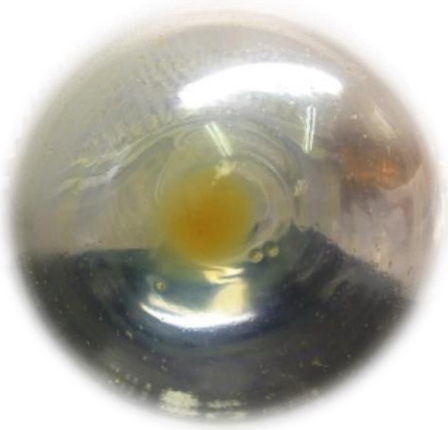


Figura 13: *Extracto crudo de la cepa ELI 149 de aspecto viscoso.*

Tabla 1: Disolventes utilizados para la extracción.

Disolvente	Rendimiento
Diclorometano	50 mg/L
Acetato de Etilo	400 mg/L

Como se puede ver en la tabla 1, el acetato de etilo produjo mejor rendimiento puesto que se obtiene mayor cantidad del extracto a diferencia del diclorometano.

4.2 PURIFICACIÓN

La purificación se realizó mediante cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando eluyentes los cuales fueron variando desde baja polaridad a una polaridad mayor. Se intentaron varios sistemas y después de una búsqueda con diferentes sistemas y probando la separación que ofrecía cada sistema en cromatografía en capa fina en diferentes proporciones, se encontró el sistema adecuado para obtener una buena separación, como se muestra en la tabla 2.

Tabla 2: Eluyentes utilizados para la purificación.

Eluyente	Proporción
Hexano	100
Hexano : Acetato de etilo	70 : 30
	50 : 50
Acetato de Etilo	100
Acetato de Etilo : Acetona	90 : 10
	85 : 15
	80 : 20
	50 : 50

Se fueron recolectando fracciones de todos los sistemas mostrados en la tabla 2 y se fueron monitoreando por cromatografía en placa fina obteniéndose un resultado favorable con el sistema de acetato de etilo:acetona el cual mostraba que existían dos fracciones de interés que parecían estar con mayor pureza. A estas fracciones se les evaporó el disolvente y se observó la formación de un sólido en las paredes del matraz, por lo que se siguió con la caracterización de estos dos compuestos de interés.

Compuesto **1**

La primera fracción se le denominó compuesto **1** y se prosiguió a caracterizarlo con diferentes técnicas espectroscópicas para elucidar la estructura. A continuación se presenta su espectro de infrarrojo el cual proporciona información sobre los posibles grupos funcionales del compuesto **1**.

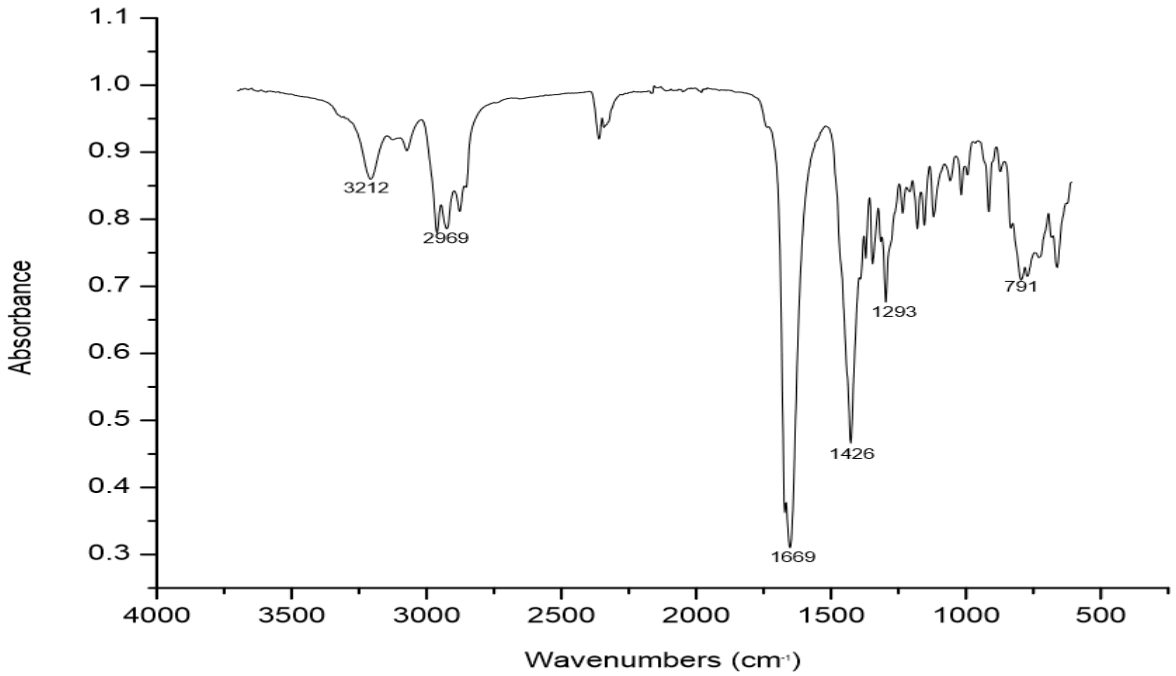


Figura 14: Espectro de IR del compuesto **1**.

Como se observa en la figura 14 aparecen bandas en 3212 cm^{-1}que pueden pertenecer a grupos NH de aminas, así también en un valor de 2969 cm^{-1} que pueden pertenecer a enlaces C-H. Por otro lado en 1669 cm^{-1} aparece una banda característica de grupo carbonilo, y en 1426 cm^{-1} se observa una banda que corresponde a una vibración del enlace C-N.

Después de este análisis también se procedió a estudiar el espectro obtenido de la espectrometría de masas, el cual se muestra a continuación:

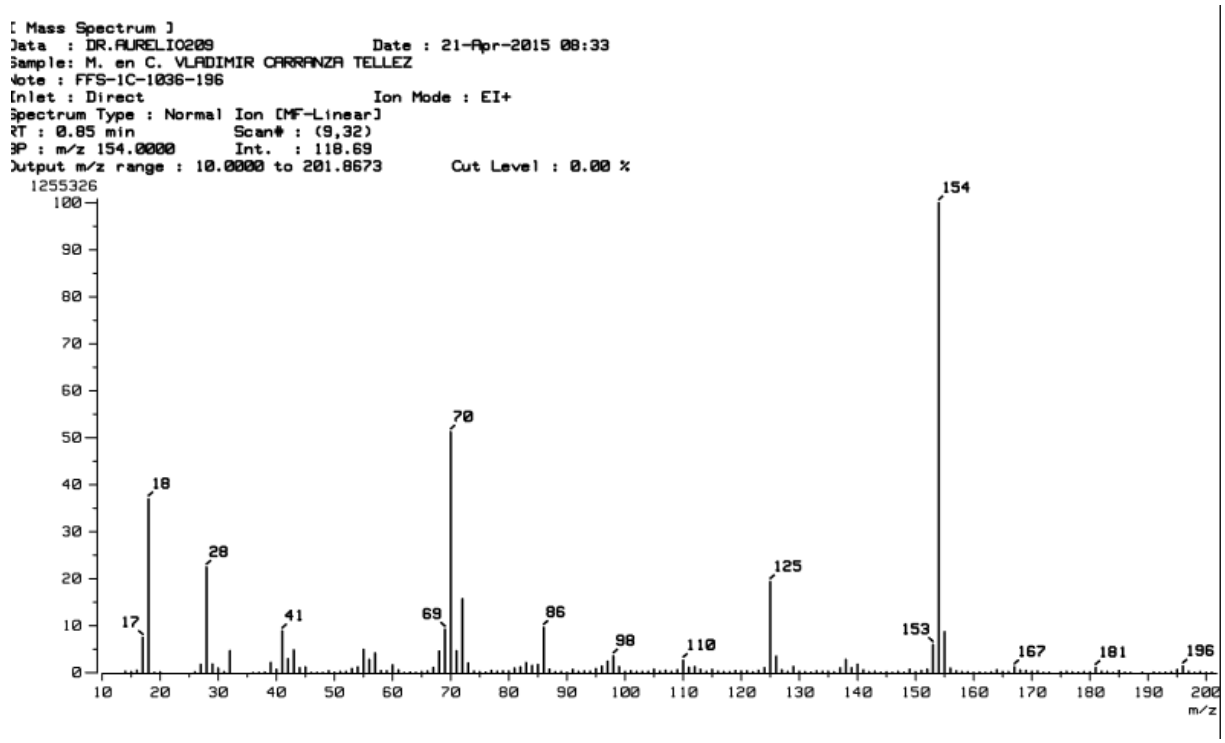


Figura 15: Espectrometría de masas por impacto electrónico (EI-MS) del compuesto **1**

En el espectro (Figura 15) se pueden observar los diferentes picos de la fragmentación del compuesto **1**, se observa el ion molecular que corresponde a 196 *m/z*, así como el pico base que corresponde a 154 *m/z*. Con ayuda de este espectro se obtiene el peso molecular, así mismo se le realizó un análisis de alta resolución (HR-MS) obteniendo la siguiente fórmula molecular $C_{10}H_{16}N_2O_2$ para el compuesto **1**.

Con la fórmula molecular se puede calcular el número de insaturaciones o ciclos (NIC) que se encuentra en la molécula por lo tanto tenemos que:

$$NIC = \left\{\frac{[(2\ x\ n°\ átomos\ de\ C)] - n°\ átomos\ de\ H + n°\ átomos\ de\ N}{2}\right\} + 1$$

Dónde: C = carbonos, H = hidrógenos y N = nitrógenos.

Por lo tanto sustituyendo ahora en la fórmula se obtiene el siguiente resultado:

$$NIC = \left\{\frac{[(2\ x\ 10)] - 16 + 2}{2}\right\} + 1$$

$$Número\ de\ insaturaciones = 4$$

Se procedió a realizar el análisis de los espectros obtenidos por resonancia magnética nuclear de ^1H de 500 MHz en $CDCl_3$ como se muestra en la figura 16.

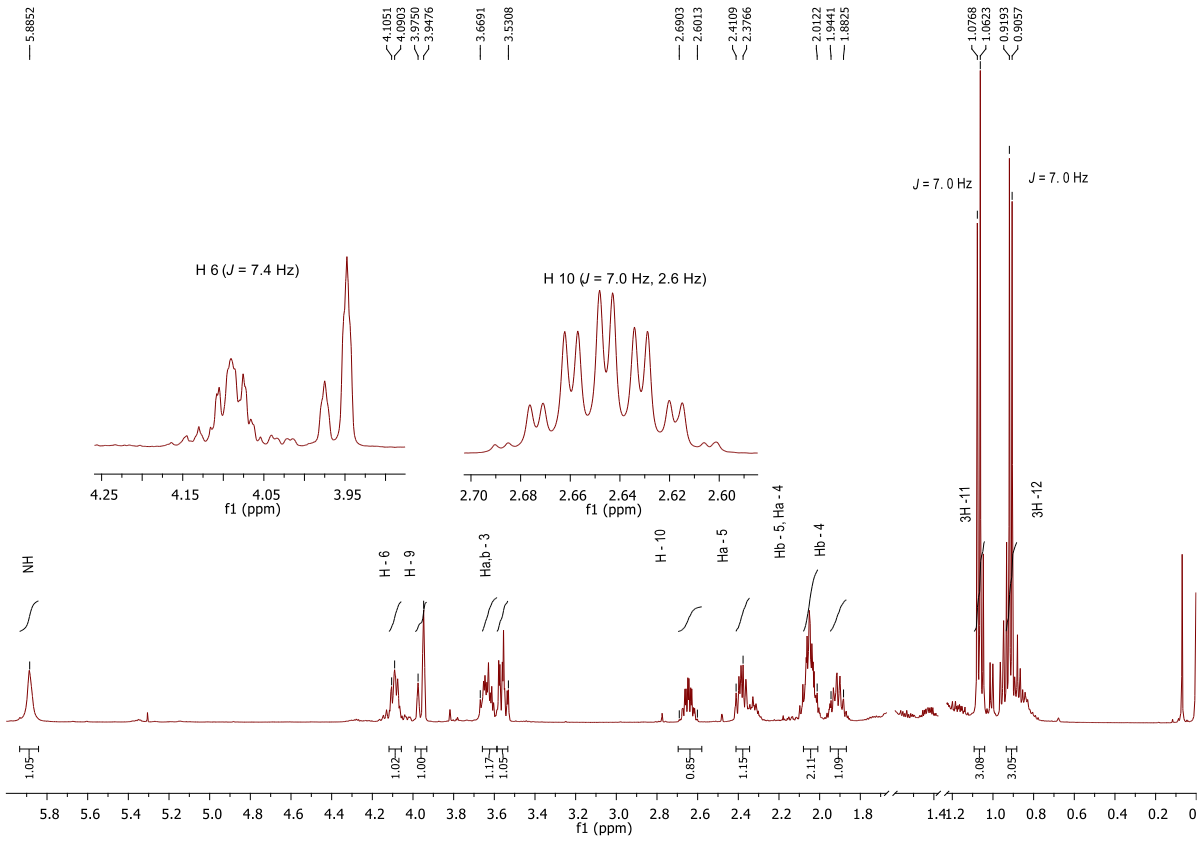


Figura 16: Espectro de ^1H a 500 MHz en $CDCl_3$ del compuesto **1**

En el espectro de ^1H se observan diferentes señales con sus multiplicidades para los diferentes hidrógenos, primeramente se asignó a las integraciones de las señales de los hidrógenos que contiene la molécula y la integración del espectro coinciden con el número de hidrógenos que se obtuvo por el análisis elemental.

Se puede apreciar una señal simple ancha en 5.88 ppm que integra para un hidrógeno que posiblemente pertenece a un hidrógeno de amida, también se puede destacar a un sistema séptuple de dobles en 2.64 ppm que integra para un hidrógeno, el cual se observa en una expansión con sus respectivas constantes de acoplamiento (*J*). Así mismo se pueden observar en 1.07 y 0.91 dos señales dobles que integran cada una para tres hidrógenos lo cual sugiere que son de grupos metilos y con una constante de acoplamiento igual de *J*=7.0 Hz que nos indica que ambos metilos están acoplados cada uno a un mismo hidrógeno y debido a ello tiene una señal doble, lo cual da idea de un grupo isopropilo. Debido a esta nueva información se procedió a obtener un espectro 2D COSY con el fin de poder asignar los hidrógenos del compuesto, como se observa en la figura 17.

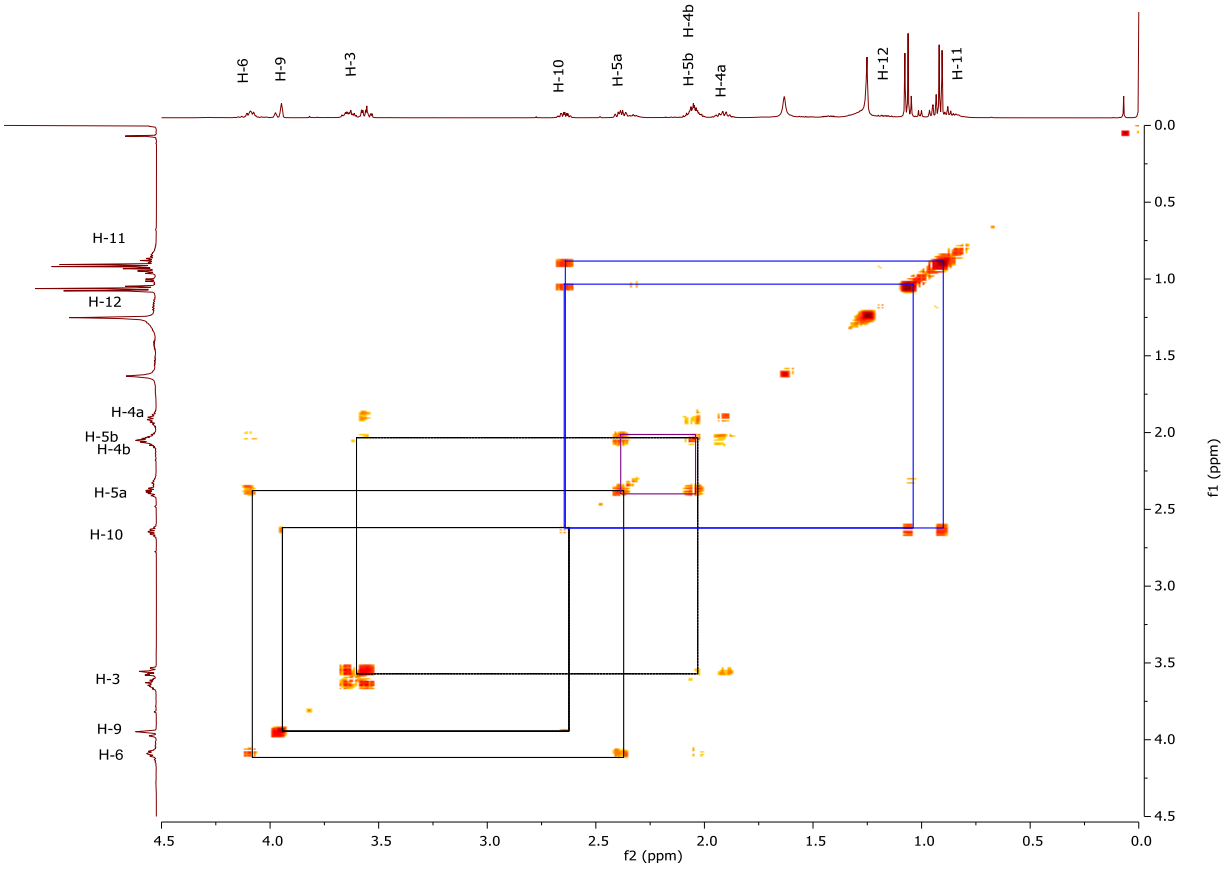


Figura 17: Espectro 2D COSY del compuesto **1**.

En el espectro se observa en 4.10 ppm una señal doble de dobles con una *J* de 7.4 Hz, que se correlaciona con las señales múltiples que se encuentran en 2.38 ppm y en 1.91 ppm que integran para un hidrógeno cada una de ellas. La señal que se encuentra en 3.95 ppm sólo correlaciona con la señal doble de septuplete que se encuentra en 2.65 ppm que además correlaciona con la señal doble correspondiente a los hidrógenos que se encuentran en 1.07 y 0.91 ppm. Estos últimos se asignaron como dos metilos por su integración de tres hidrógenos y se encuentran acoplados a un CH debido a la señal doble que presentan. La señal múltiple que se encuentra en 3.66-3.53 ppm que integra para 2H correlaciona con la señales múltiples que se encuentran en 2.05 ppm y 1.91 ppm. Por último se observa en 2.38 ppm una señal múltiple que integra para 1H que se correlaciona con la siguientes señales múltiples de 2.05 ppm y 1.91 ppm. La información obtenida por el espectro COSY permite asignar de manera inequívoca cada señal de hidrógeno que se encuentra en el compuesto.

También se obtuvo un espectro de ^{13}C (Figura 18) y se realizó una asignación primaria así como el conteo de los carbonos presentes en el compuesto, los cuales fueron 10 coincidiendo con la fórmula molecular obtenida del análisis elemental.

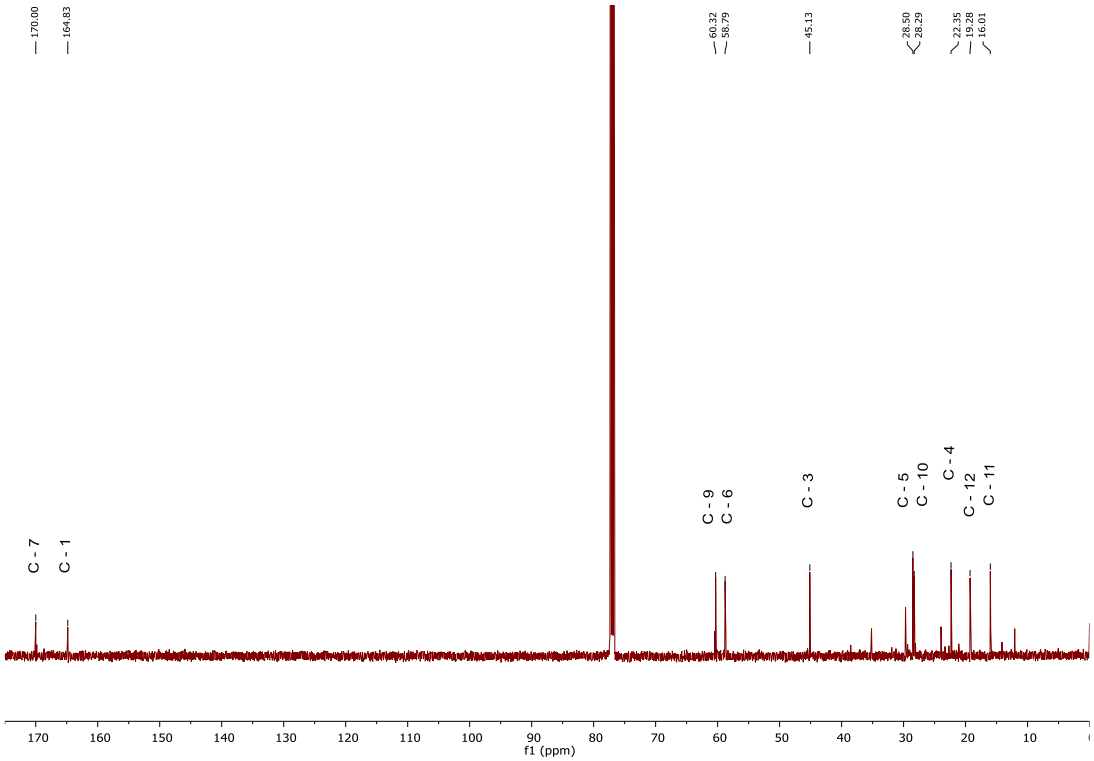


Figura 18: Espectro de 125 MHz de ^{13}C en $CDCl_3$ del compuesto 1.

Para una correcta asignación de los carbonos correlacionándolos con los hidrógenos, se procedió a la obtención del espectro 2D HSQC (Figura 19).

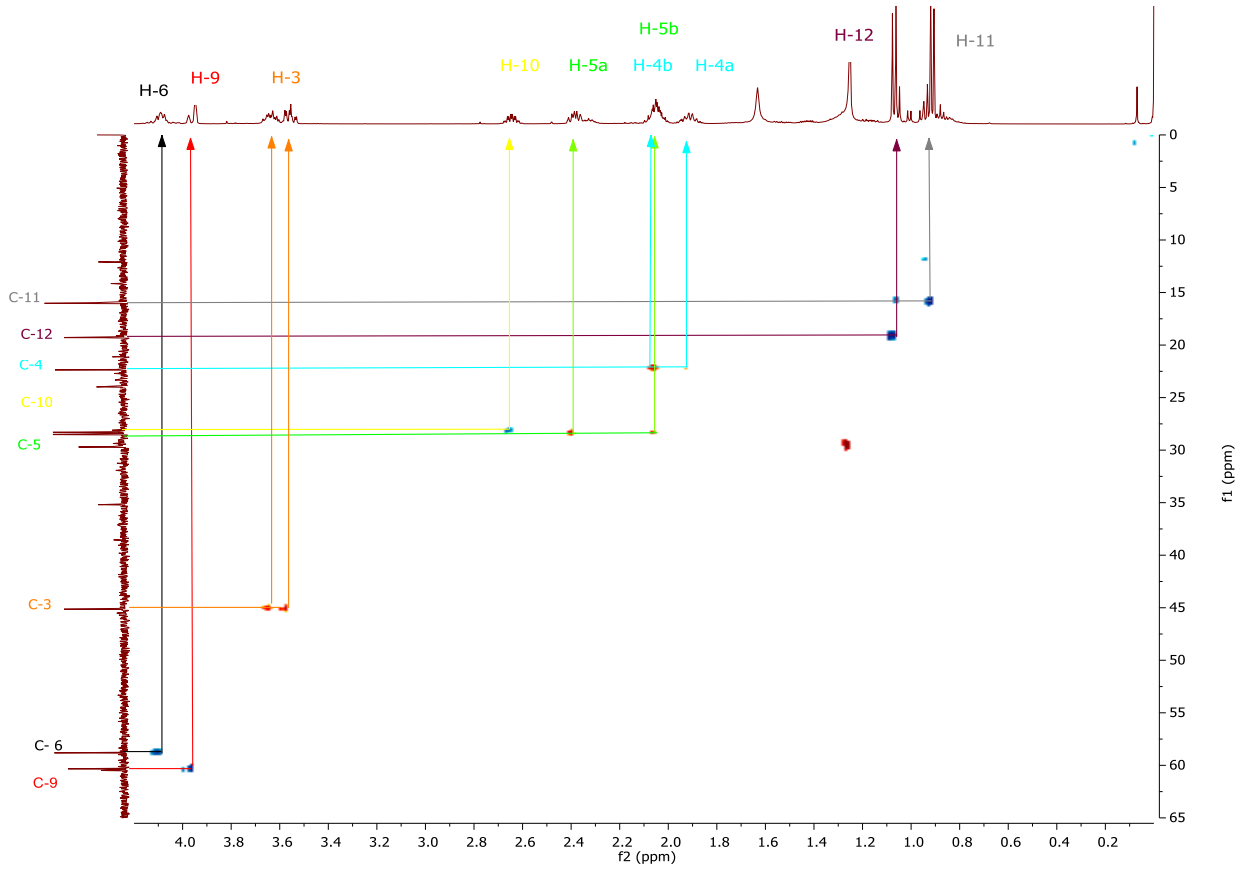


Figura 19: Espectro 2D HSQC del compuesto **1**.

Las señales que se observan en el espectro de ^{13}C en 170.0 ppm y 164.8 ppm no tienen ninguna correlación con hidrógenos pudiendo decir que son carbonos cuaternarios y además su desplazamiento sugiere que son carbonos de grupo carbonilo confirmando la información obtenida mediante el espectro IR, por lo que se puede decir que el compuesto tiene dos carbonilos.

En la siguiente tabla se resumen las señales de RMN ^{1}H y ^{13}C.

Tabla 3: *Señales de los espectros.*

Correlación	
Señal ^{1}H ppm	Señal ^{13}C ppm
4.10	60.3
3.95	58.8
3.66 – 3.53	45.1
2.65	28.3
2.38	28.5
2.05	22.3 y 28.5
1.91	22.3
1.07	19.3
0.91	16.0

Como último dato se obtuvo un último análisis de RMN, un espectro DEPT, para poder establecer qué señales correspondían a CH_3, CH_2 y CH (Figura 20).

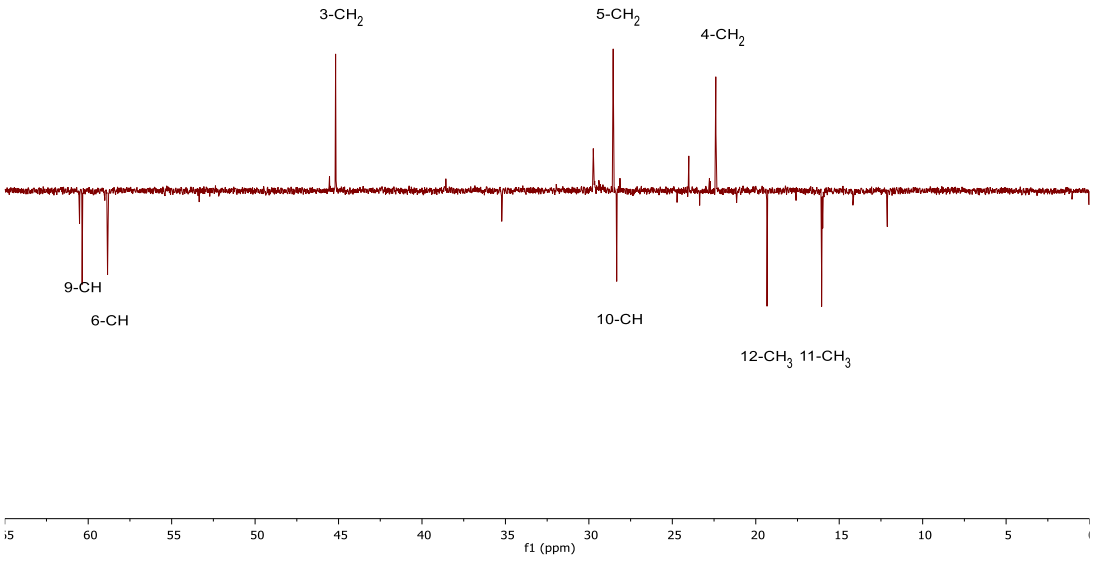


Figura 20: Espectro DEPT del compuesto **1**.

Como se puede observar en el espectro DEPT, éste da una idea de qué carbonos son los CH y CH_3 los cuales tendrán una señal negativa (señal hacia abajo); en cambio los CH_2 tendrán una señal positiva (señal hacía arriba).

Con toda la información obtenida se elucida la estructura del compuesto **1**, para la cual se propuso la mostrada en la figura 21 faltando esclarecer la estereoquímica de los dos centros estereogénicos.

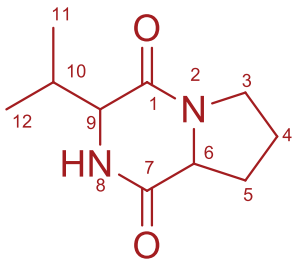


Figura 21: Estructura propuesta para el compuesto **1**.

Como se observa la estructura propuesta concuerda con los datos obtenidos del IR y con la fórmula obtenida de espectrometría de masas $C_{10}H_{16}O_2N_2$. También concuerda el número de insaturaciones.

El compuesto **1** siempre mostró un estado físico sólido por lo que se procedió a la búsqueda de diferentes sistemas (Tabla 4) para poder cristalizar de manera óptima para poder realizar un estudio de difracción de rayos X, como se muestra en la siguiente tabla 4.

***Tabla 4*:** Sistemas para cristalizar el compuesto **1**.

Sistema	**Solubilidad y Características Físicas**
AcOEt	Soluble, sólido blanco
DCM	Soluble, sólido blanco y pocos cristales muy pequeños
Acetona	Soluble, cristales muy pequeños
Etanol	Soluble, sólido blanco
Metanol	Soluble, sólido blanco

Hexano : AcOEt	Soluble, cristales pequeños amorfos
Hexano : DCM	Soluble, Cristales grandes y en forma de aguja
AcOEt : Acetona	Soluble, cristales pequeños.

De los sistemas utilizados el sistema hexano:DCM, fue el que permitió una adecuada cristalización por lo que al compuesto cristalino **1** se le realizó exitosamente su estudio de difracción de rayos X, corroborando la estructura propuesta, además permitió conocer de manera inequívoca la estereoquímica de la molécula pudiendo asignar de manera correcta la configuración absoluta de los dos centros estereogénicos de la molécula siendo (6*S*), (9*S*).(Figura 22)

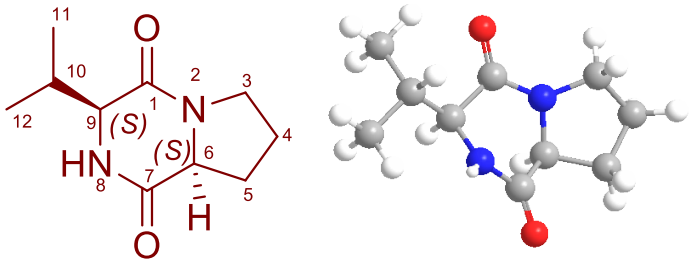


Figura 22: *Estructura correcta del compuesto* ***1***.

El compuesto **ciclo(L-Pro–L-Val) 1**, coincide en un porcentaje con lo reportado de Ortiz Castro en 2011 el cual solo tiene una asignación por RMN de ^{1}H y ^{13}C por lo que hay una ambigüedad en la asignación de las señales de hidrogeno en cambio con la información recabada en este proyecto se asignó de manera inequívoca la estructura.

Compuesto **2**

Se procedió a realizar de manera similar todas las pruebas al compuesto **2** para elucidar su estructura. A continuación se presenta el espectro de infrarrojo del compuesto **2** el cual proporciona información sobre los grupos funcionales que se pueden encontrar en este compuesto.

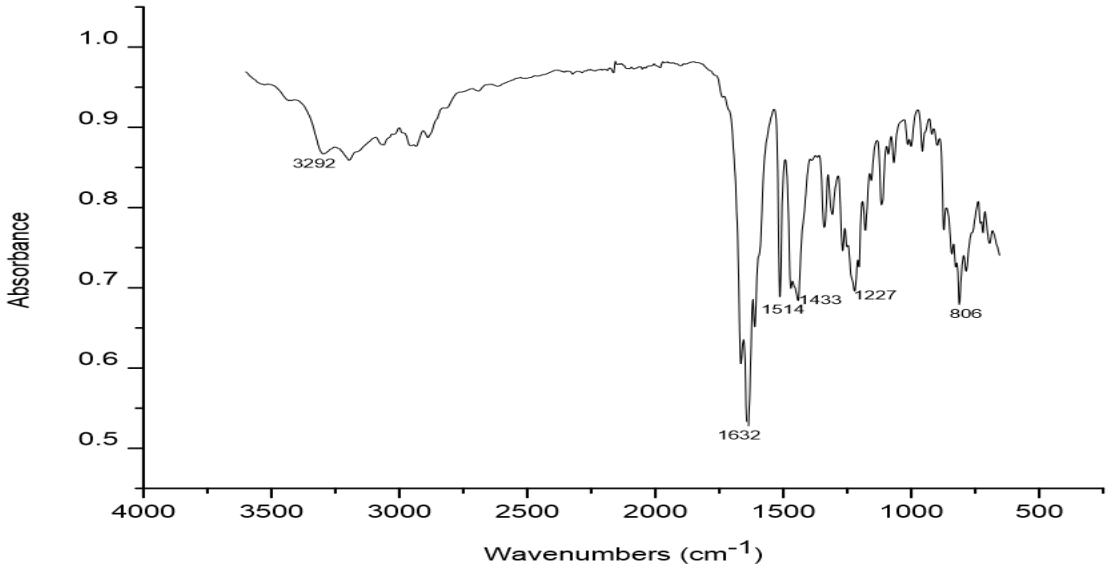


Figura 23: Espectro de IR del compuesto **2**.

En la figura 23 se observan bandas anchas en 3282 cm^{-1} que al igual que para el compuesto **1** pueden pertenecer a grupos NH de amidas así como también de OH de alcoholes. Por otro lado en 1632 cm^{-1} se encuentra una banda característica de grupo carbonilo. En 1433 cm^{-1} una banda que corresponde a una vibración de enlace C-N.

Posteriormente se presenta el análisis del espectro obtenido de la espectrometría de masas (Figura 18).

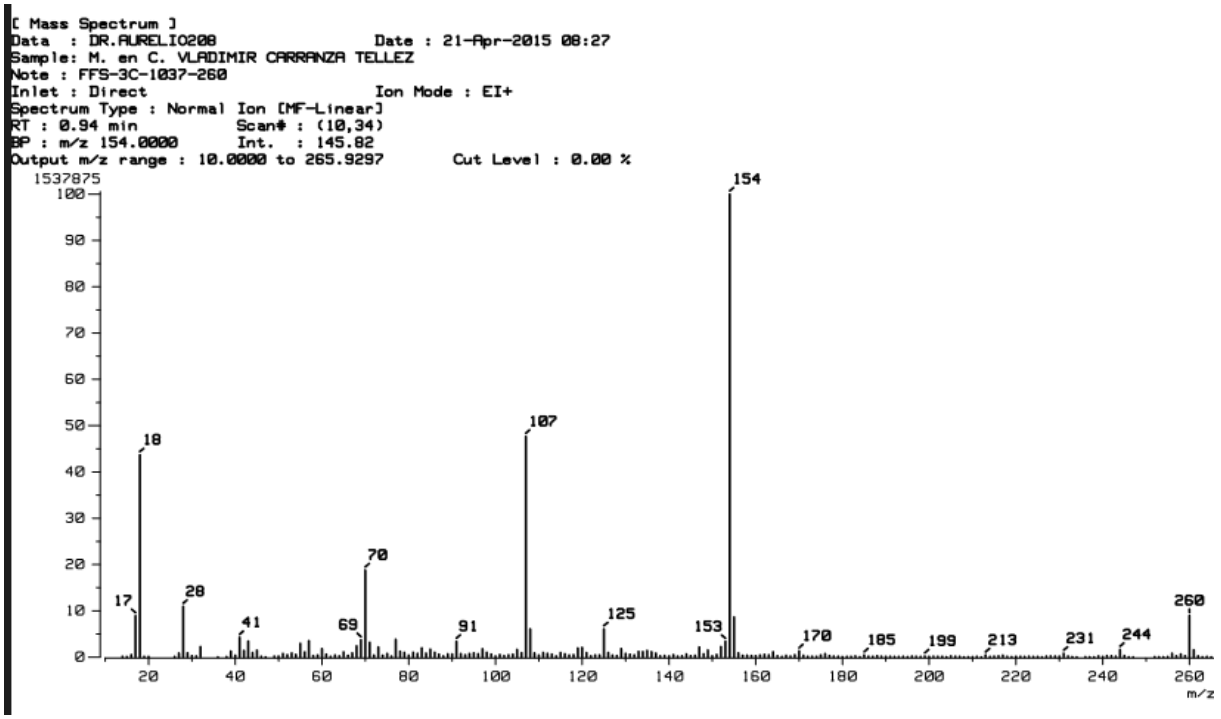


Figura 24: Espectrometría de masas por impacto electrónico (EI-MS) del compuesto **2**.

En el espectro (figura 24) se pueden ver los diferentes picos que corresponden a la fragmentación del compuesto **2**, donde se observa el ion molecular que corresponde a 260 *m*/z, así como el pico base que corresponde a 154 *m*/z. Con ayuda de este espectro se obtiene el peso molecular del compuesto **2**. Asimismo se le realizó un análisis de alta resolución (HR-MS) obteniendo la fórmula molecular $C_{14}H_{16}N_2O_3$, así se puede calcular mediante una fórmula el número de insaturaciones que se encuentra en la molécula:

$$NIC = \left\{\frac{[(2\ x\ n°\ átomos\ de\ C)] - n°\ átomos\ de\ H + n°\ átomos\ de\ N}{2}\right\} + 1$$

Por lo tanto sustituyendo ahora en la fórmula:

$$NIC = \left\{\frac{[(2\ x\ 16)] - 18\ + 2}{2}\right\} + 1$$

$$NIC = 8$$

Se procedió a realizar el análisis de los espectros obtenidos por RMN de ^{1}H de 500 MHz en $CDCl_3$ como se muestra en la figura 25.

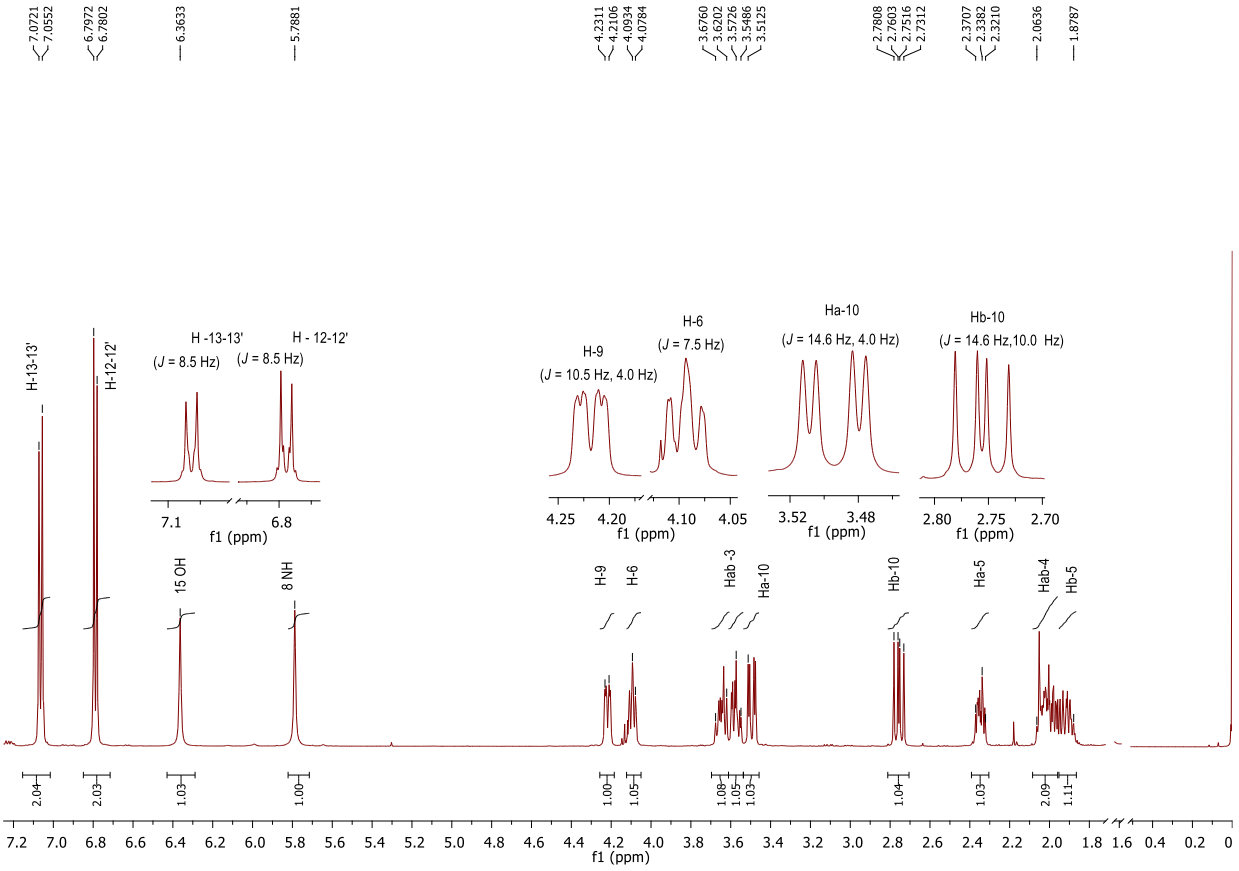


Figura 25: Espectro de ^{1}H a 500 MHz en $CDCl_3$ del compuesto **2**

En el espectro de ^{1}H, primeramente se asignó y la integración del espectro coincide con el número de hidrógenos que reporta la espectrometría de masas.

Se observa en 7.07 ppm una señal doble que integra para dos hidrógenos, enseguida en 6.80 ppm se observa otra señal doble similar a la antes descrita con una constante de acoplamiento para ambas de *J*= 8.5 Hz, que por el valor de su desplazamiento correspondería a hidrógenos aromáticos. En 6.36 y 5.79 ppm se encuentran dos señales simples que integran para un hidrógeno cada una que pueden ser NH y OH. En 4.21 ppm se ve una señal doble de dobles con una *J* = 10.5 Hz y 4.0 Hz que integra para 1H y en 4.11 ppm una señal triple que integra para 1H con una *J* = 7.5 Hz. Aproximadamente en 3.60 ppm se ve una

señal múltiple que integra para 2H, seguida en 3.50 ppm por una señal doble de dobles con constantes de acoplamiento de *J* =14.6 Hz y 4.0 Hz. En 2.75 ppm una señal doble de dobles con constantes de acoplamiento de *J* = 14.6 Hz y 10.0 Hz, pudiendo decir que esta señal dd se está acoplando con la anteriormente señalada por el valor de la constante de acoplamiento *J* = 14.6 Hz. En 2.36 ppm, se observa una señal múltiple que integra para un hidrógeno y por último se observa una señal múltiple que va de 2.05 ppm a 1.07 ppm que integran para 3H.

Para poder asignar correctamente el espectro de RMN ^{1}H se realizó un espectro 2D COSY con el fin de poder asignar los hidrógenos del compuesto **2** (Figura 26).

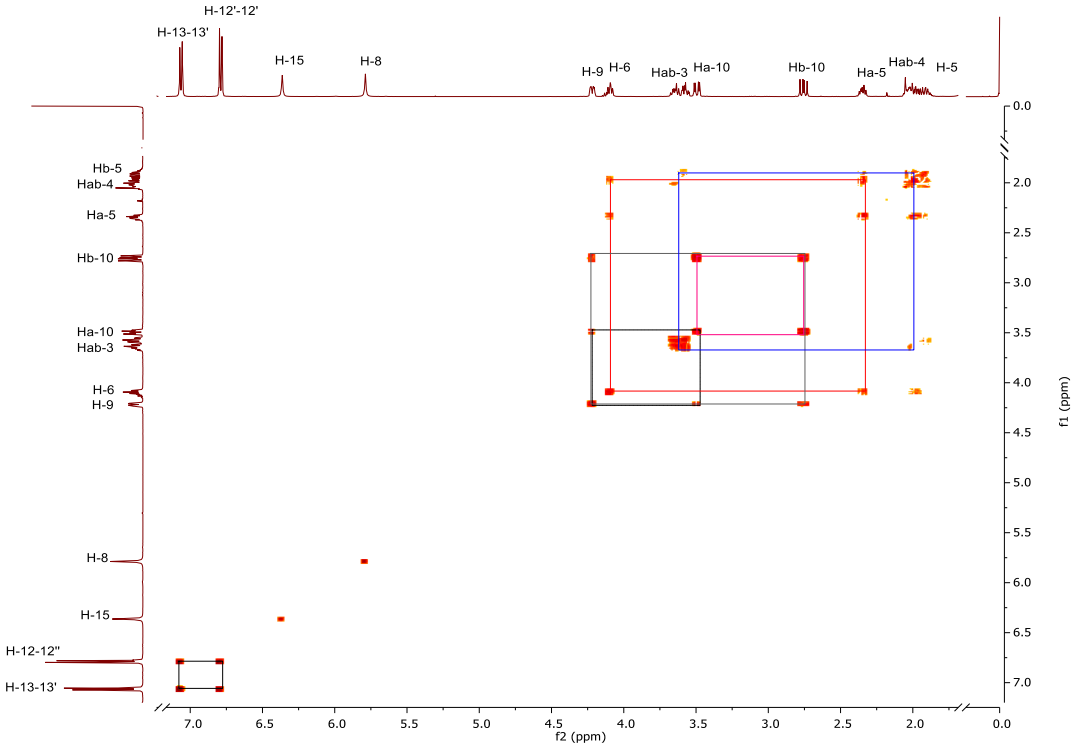


Figura 26: Espectro 2D COSY del compuesto **2**.

En el espectro 2D COSY se observa una señal doble en 7.07 ppm que correlaciona con una señal similar en 6.80 ppm. En 6.36 y 5.79 ppm se observan dos señales simples que no tienen una correlación con ningún hidrógeno. La señal doble de dobles que se encuentra en 4.23 ppm se correlaciona con las

señales doble de dobles que se encuentran en 3.50 ppm y 2.75 ppm. La señal triple en 4.11 ppm se encuentra correlacionada con la señal múltiple en 2.35 ppm del mismo modo con la señal múltiple encontrada en 2.05–1.07 ppm. En 3.60 ppm se ve la señal múltiple que integra para 2H que se correlaciona con la señal múltiple que se encuentra en el rango de 2.05-1.07 ppm. La señal doble de dobles ubicada en 3.50 ppm se correlaciona con la siguiente señal doble de dobles en 2.75 ppm. La señal múltiple que se ubica en 2.36 ppm se está correlacionando con la señal múltiple ubicada en el rango de 2.05–1.07 ppm.

Este análisis permite asignar de manera inequívoca cada señal de hidrógeno que se encuentra en el compuesto y su correlación con los hidrógenos adyacentes.

Se obtuvo el espectro de RMN ^{13}C y una asignación primaria así como el conteo de los carbonos presentes en el compuesto **2** (Figura 27).

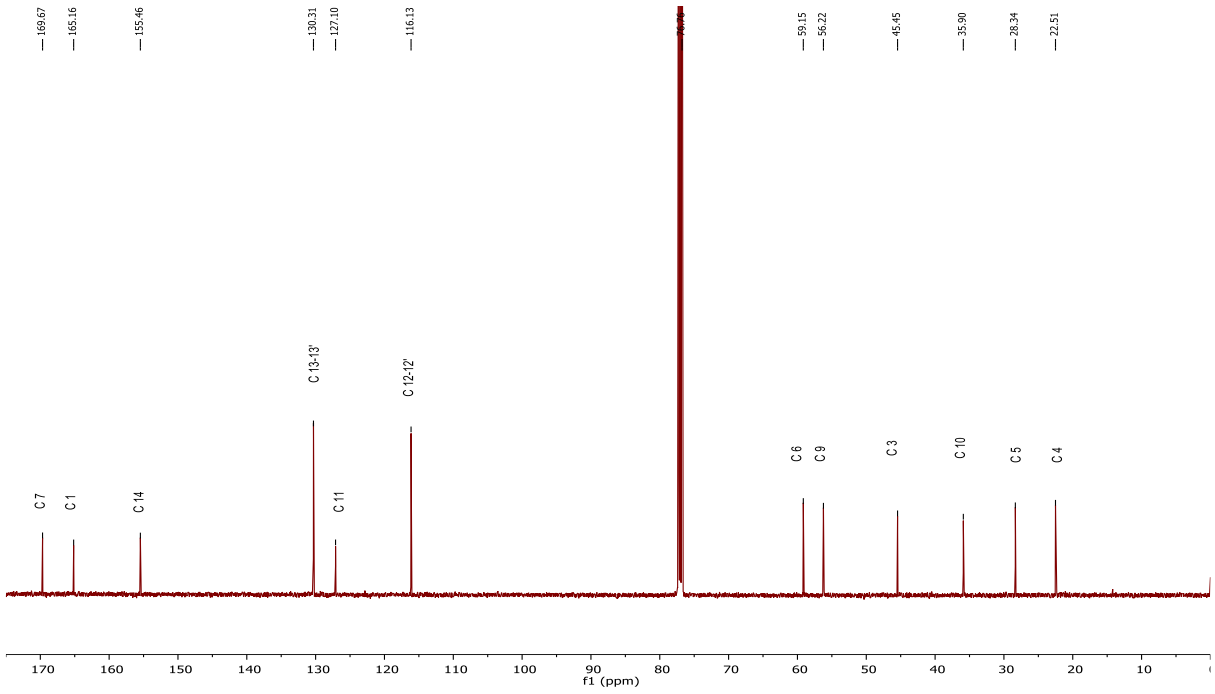


Figura 27: Espectro de125 MHz de ^{13}C en $CDCl_3$ del compuesto **2**.

Con la información de la fórmula molecular se procedió a la búsqueda de los 14 carbonos que posee la molécula, sin embargo se encontraron sólo 12 señales. En el espectro de RMN de ^{1}H se observaban dos señales dobles con la misma constante de acoplamiento y que integraban para dos hidrógenos. Esto da idea de que en el espectro de RMN de ^{13}C pueden caer en la misma señal dos carbonos debido a que son equivalentes de un anillo aromático *para*-sustituido.

Siguiendo la misma metodología del compuesto **1** se procedió a la obtención del espectro 2D HSQC para poder observar la correlaciones entre los carbonos con hidrógenos que se encuentran en compuesto **2** (Figura 28).

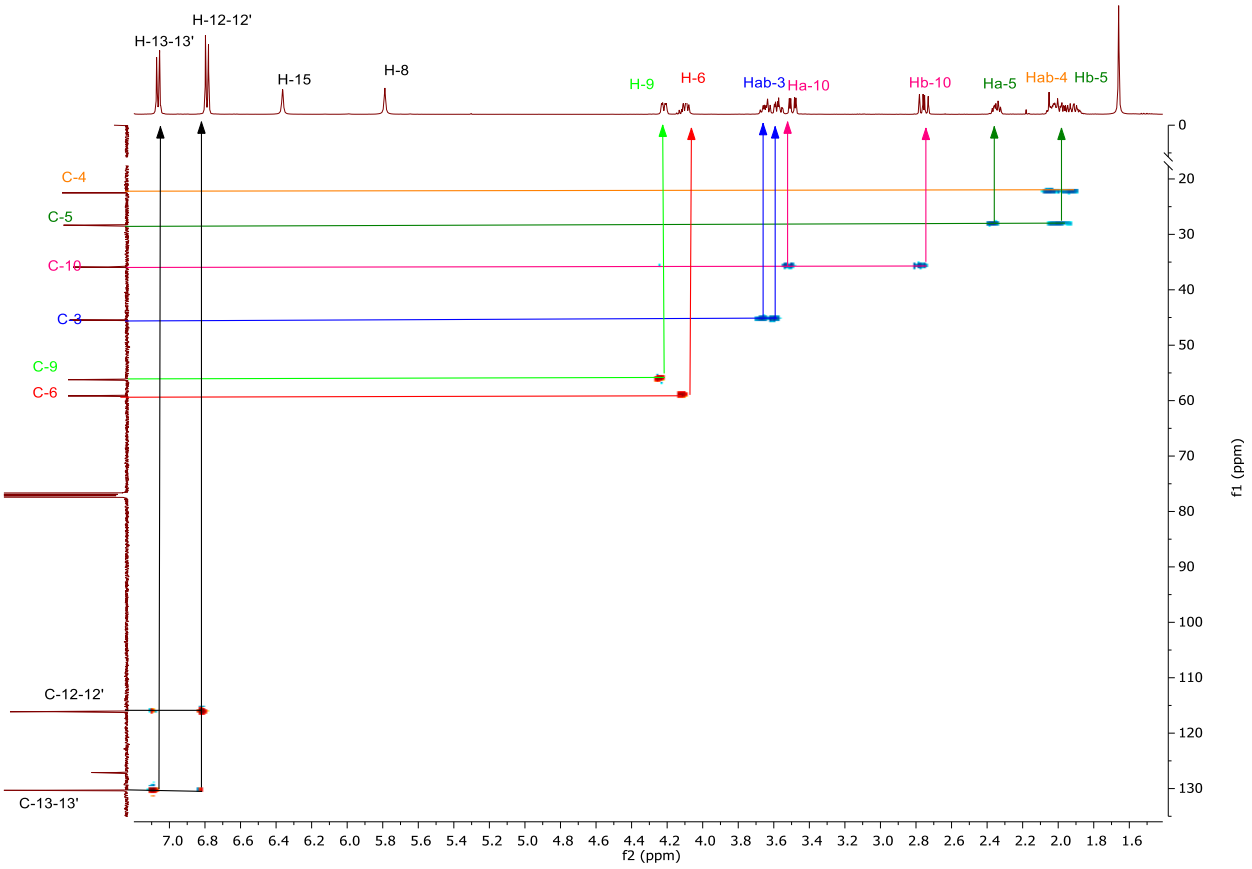


Figura 28: Espectro 2D HSQC del compuesto **2**.

En la tabla 5 se describen las correlaciones que se observan en los espectros de RMN de ^{1}H y ^{13}C por HSQC.

Tabla 5: *Correlación de las señales de los espectros*

Correlación de señales	
Señal ^{1}H ppm	Señal ^{13}C ppm
7.07	130.3
6.80	116.1
4.21	56.2
4.11	59.1
33.65 - 3.60	45.4
3.50	35.9
2.75	35.9
2.36	28.3
2.05 - 1.07	28.3 y 22.5

Como se observa en la tabla 5 no están presentes 4 señales encontradas en el espectro RMN de ^{13}C en 160.6, 165.1, 155.4 y 127.1 ppm, que no se observan en correlación con ningún hidrogeno en el espectro HSQC y esto es debido a que son carbonos cuaternarios. Dos de ellos por el desplazamiento parecen ser de grupos carbonilo apoyando este dato con la información obtenida por el espectro IR.

Además se realizó un espectro DEPT para poder recabar más información de ayuda (Figura 29).

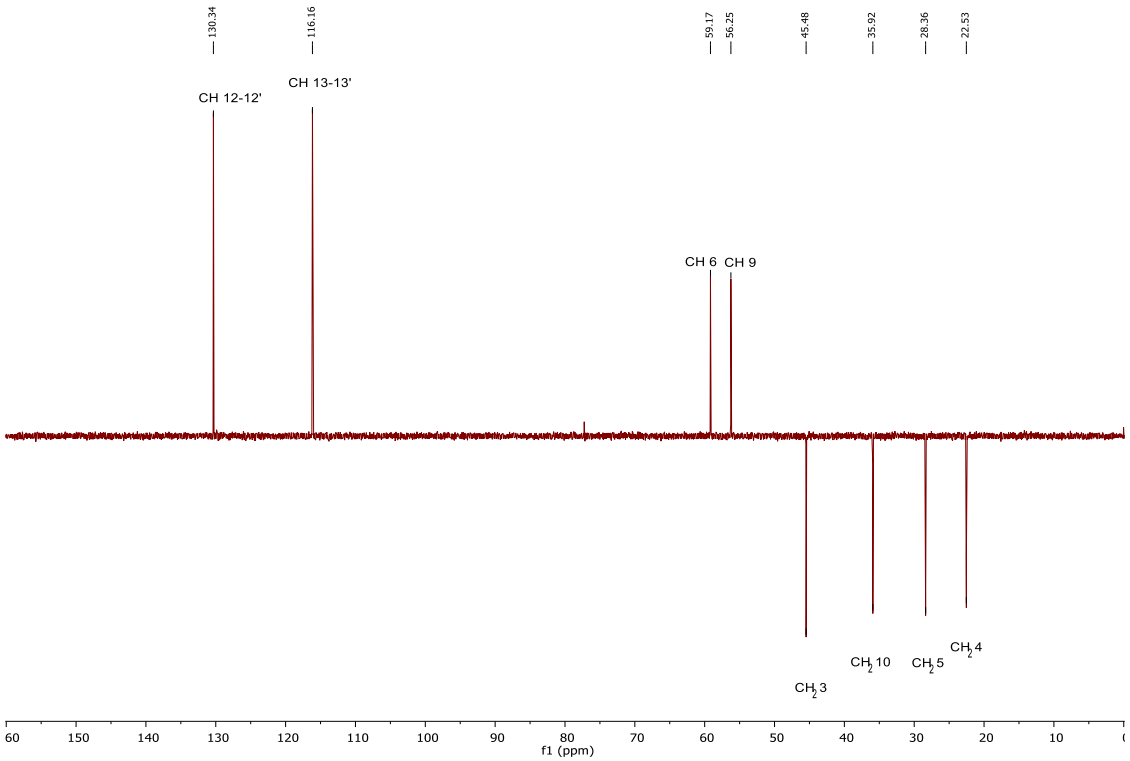


Figura 29: Espectro DEPT del compuesto **2**.

El espectro DEPT es de utilidad para determinar el tipo de carbonos que se obtienen ya que los CH, CH_3 tendrán una señal positiva (señal hacía arriba) en cambio los CH_2 tendrán una señal negativa (señal hacia abajo).

Con esta nueva información y con toda la anterior se puede elucidar la estructura del compuesto **2** la cual se propone en la figura 30 faltando esclarecer la estereoquímica de los dos centros estereogénicos.

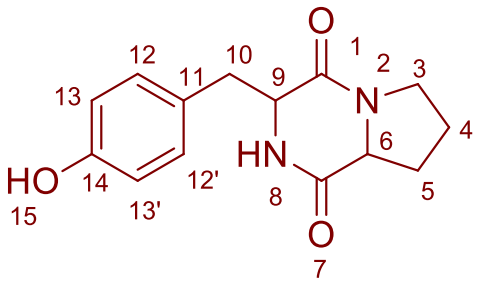


Figura 30: Estructura propuesta para el compuesto **2**.

Como se puede observar en la estructura propuesta de la figura 30, concuerda con los datos de IR por la presencia de grupos carbonilos que en este caso son del tipo amidas así como los NH que se observa en el espectro y flexiones correspondientes a C-H saturados y la señal ancha del OH. También concuerda con la fórmula molecular ($C_{14}H_{16}O_3N_2$) obtenida por espectrometría de masas. También concuerda con el número de insaturaciones.

El estado físico del compuesto **2** fue un sólido cristalino y se procedió a la búsqueda de diferentes sistemas para poder cristalizar de manera óptima, así que se probaron distintos sistemas para realizar un estudio de difracción de rayos X, en la siguiente tabla 6 se muestran los diferentes sistemas.

Tabla 6: Sistemas para cristalizar el compuesto **2**.

Sistema	**Solubilidad y Características Físicas**
Hexano	Poco soluble
AcOEt	Soluble, sólido blanco
DCM	Soluble, sólido blanco y pocos cristales muy pequeños
Acetona	Soluble, cristales muy pequeños
Etanol	Soluble, sólido blanco
Metanol	Soluble, sólido blanco
Hexano : AcOEt	Soluble, cristales pequeños amorfos
Hexano : DCM	Soluble, Cristales muy pequeños
AcOEt : Acetona	Soluble, cristales grandes en forma de cuadrados

De la tabla anterior se observa que el sistema AcOEt : Acetona fue óptimo para una adecuada cristalización y así se realizó exitosamente su estudio de difracción de rayos X, obteniendo así la estructura que corroboró con lo ya propuesto anteriormente en base a toda la espectroscopía analizada. Aunado a esto la difracción de rayos X permitió conocer de manera inequívoca la estereoquímica de la molécula pudiendo asignar de manera correcta la

configuración absoluta de los dos centros estereogénicos de la molécula como (6*S*), (9*S*). (Figura 31)

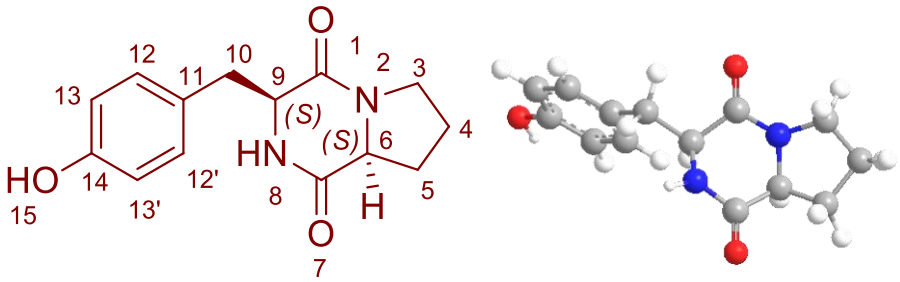
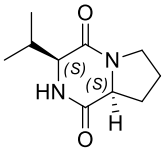
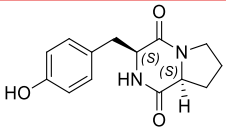


Figura 31: Estructura correcta del compuesto **2**.

El compuesto **ciclo(L-Pro–L-Tyr) 2**, coincide con lo reportado de Ortiz Castro en 2011 el cual solo tiene una asignación por RMN de ^{1}H y ^{13}C por lo que hay una ambigüedad en la asignación de las señales de hidrogeno en cambio con la información recabada en este proyecto se asignó de manera inequívoca la estructura.

De los dos compuestos por su estado sólido se obtuvieron sus puntos de fusión así como su rotación óptica y algunos datos más recabados en la siguiente tabla 7.

Tabla 7: *Caracterización de los compuestos* ***1*** *y* ***2***

Nombre	Rto %	Punto de Fusión	$[\alpha]^{25}_{D}$	Fórmula Molecular	Peso Molecular	Estado Físico	Estructura
Ciclo (L-Pro-L-Val) Compuesto **1**	4.6	165.2 ° C	*C* 1, MeOH -129°	$C_{10}H_{16}N_2O_2$	196.2462 g/mol	Sólido Blanco Cristalino	
Ciclo (L-Pro-L-Tyr) Compuesto **2**	5.8	147.2 ° C	*C* 1, EtOH -53.8°	$C_{14}H_{16}N_2O_3$	260.2884 g/mol	Sólido Blanco Cristalino	

4.4 PRUEBAS BIOLÓGICAS

En este apartado se realizó un estudio de inhibición llamado "antibiograma" en el cual primeramente se probó la actividad antibacteriana que tiene el **extracto crudo de acetato de etilo** contra bacterias de interés médico obteniendo los siguientes resultados en la siguiente tabla 8.

Tabla 8: Resultados del antibiograma del extracto crudo

Microorganismo	Halo de inhibición (mm)	Control positivo	Control negativo
Escherichia coli	8	18	R
Pseudomonas sp	8	7	R
Salmonella cholerasuis	9	22	R
Serratia marcescens	20	36	R
Staphylococcus aureus	12	31	R

R=Resistente, no hay inhibición por parte del compuesto hacia la bacteria.

Como se observa en la tabla 8 hay una clara inhibicion por parte del extracto crudo hacia las bacterias.

Depues de la purificacion de los dos compuestos; ciclo(L-Pro–L-Val) **1** y ciclo(L-Pro–L-Tyr) **2** se procedió a realizar nuevamente un antibiograma con los compuestos por separado así como juntos para determinar si estos compuestos son los resposables de la inhibicion de las bacterias antes mencionadas. Los resultados se presentan en la tabla 9.

Tabla 9: Resultados de antibiograma de los compuestos puros, (R= Resistente).

Microorganismo	ciclo(L-Pro–L-Val)	ciclo(L-Pro–L-Tyr)	ciclo(L-Pro–L-Val) + ciclo(L-Pro–L-Tyr)
Escherichia coli	R	R	R
Pseudomonas sp	R	R	R
Salmonella cholerasuis	R	R	R
Serratia marcescens	R	R	R
Staphylococcus aureus	R	R	R

R=Resistente, no hay inhibición por parte del compuesto hacia la bacteria.

En la tabla 9 da como resultados una resistencia de cada bacteria a los compuestos puros y juntos, pudiendo afirmar que estos compuestos no son los responsables por la actividad antibacteriana.

Se realizó un segundo antibiograma en el cual se utilizó el compuesto ciclo(L-Pro–L-Val) **1** en diferentes concentraciones para así observar si la concentración influye en la inhibición de las diferentes bacterias y así poder afirmar que este compuesto no tiene actividad antibacteriana. Para este segundo antibiograma se utilizaron las siguientes bacterias clasificadas en dos grupos; el primer grupo compuesto por bacterias Grampositivas: *Staphylococcus aureus, Staphylococcus saprophyticus, Listeria monocytogenes*, y el segundo grupo compuesto de bacterias Gramnegativas: *Escherichia coli, Salmonella choleraesuis, Vibrio cholerae*. Todas estas bacterias son responsables de enfermedades a humanos causando infecciones graves en tracto intestinal asi como enfermedades nosocomiales.

Tabla 10: Resultados de antibiograma del compuesto ciclo(L-Pro–L-Val) a diferentes concentraciones, (R= Resistente).

Microorganismo	Compuesto ciclo(L-Pro–L-Val)			
	25 mg/1mL	50 mg/1mL	75 mg/1mL	100 mg/1mL
Staphylococcus aureus	R	R	R	R
Staphylococcus saprophyticus	R	R	R	R
Listeria monocytogenes	R	R	R	R
Escherichia coli	R	R	R	R
Salmonella choleraesuis	R	R	R	R
Vibrio cholerae	R	R	R	R

R=Resistente, no hay inhibición por parte del compuesto hacia la bacteria.

Se puede observar en la tabla 10 las diferentes concentraciones del compuesto ciclo(L-Pro–L-Val) **1** para todas las bacterias de interés no hubo ninguna inhibición, como se muestra a continuación en las figuras 32 y 33.

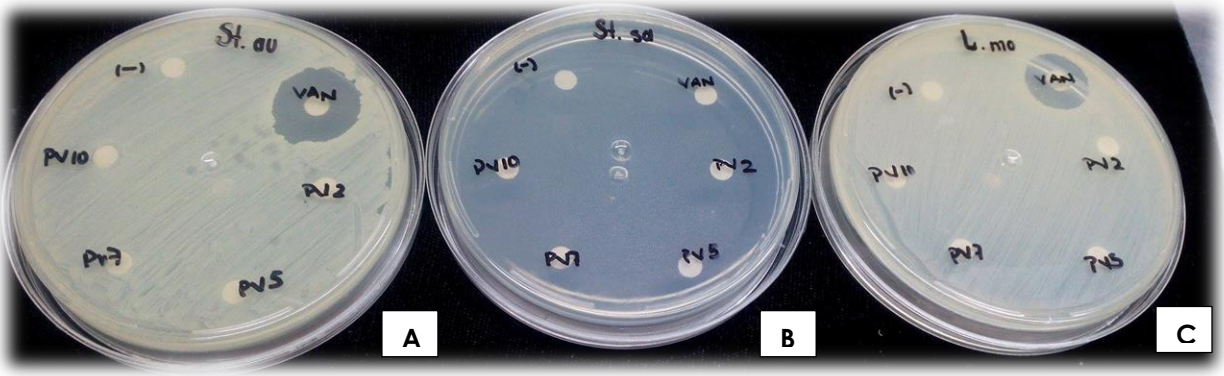


Figura 32: Antibiograma del grupo de bacterias Grampositivas. A) *Staphylococcus aureus, B) Staphylococcus saprophyticus, C) Listeria monocytogenes*.

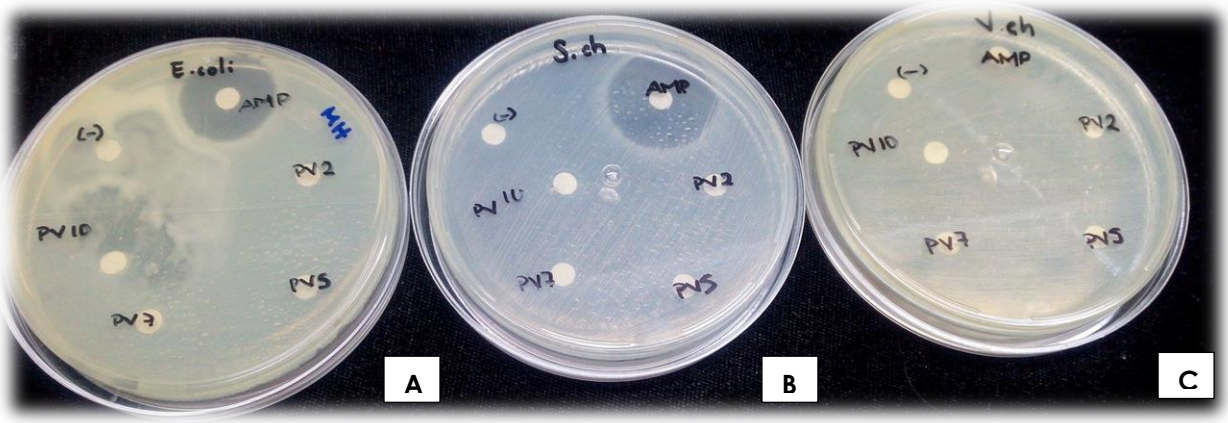


Figura 33: Antibiograma del grupo de bacterias Gramnegativas. A) *Escherichia coli, B) Salmonella choleraesuis, C) Vibrio cholerae*.

En las figuras de los antibiogramas a los diferentes grupos de bacterias se observa que los diferentes discos impregnados con las diferentes concentraciones del compuesto **1** no fueron capaces de inhibir el crecimiento bacteriano, pudiendo así afirmar que este compuesto no tiene actividad antibacteriana.

Otro de los objetivos era saber si el compuesto **1** tenían actividad antifúngica para ello se realizó un tercer antibiograma dirigido hacia hongos. Los hongos que se eligieron fueron los fitopatógenos *Fusarium oxysporum*, *Mucor sp, y Penicillium sp,* los cuales afectan a plantas y son causantes de pérdidas de cultivos y/o frutas.

Tabla 11: Antibiograma a hongos fitopatogenos. (R=Resistente).

Microorganismo	**Compuesto ciclo(L-Pro–Val)**				**C (+)**	**C(-)**
	25 mg/1mL	50 mg/1mL	75 mg/1mL	100 mg/1mL	Miconazol	Agua
Mucor sp	R	R	R	R	8 mm	R
Penicillium sp	R	6 mm	7 mm	8 mm	26 mm	R
Fusarium oxysporum	R	5 mm	8 mm	9 mm	9 mm	R

R=Resistente, no hay inhibición por parte del compuesto hacia el hongo.

Como muestra la tabla 11 el hongo *Mucor sp* fue resistente a las diferentes concentraciones del compuesto ciclo(L-Pro–L-Val) **1**, en cambio con el hongo *Penicillium sp* éste fue resistente solo a la concentración de 25 mg/mL puesto que en las siguientes mostró un pequeño halo de inhibición que va de 1 mm, 2 mm y 3 mm de acuerdo a la concentración de 50 mg/mL, 75 mg/mL y 100 mg/mL respectivamente. Para el hongo *Fusarium oxysporum* se observan halos de inhibición en la concentración de 50 mg/mL (2 mm), 75 mg/mL (3 mm) y 100 mg/mL (4 mm) como se muestra en la Figura 34.

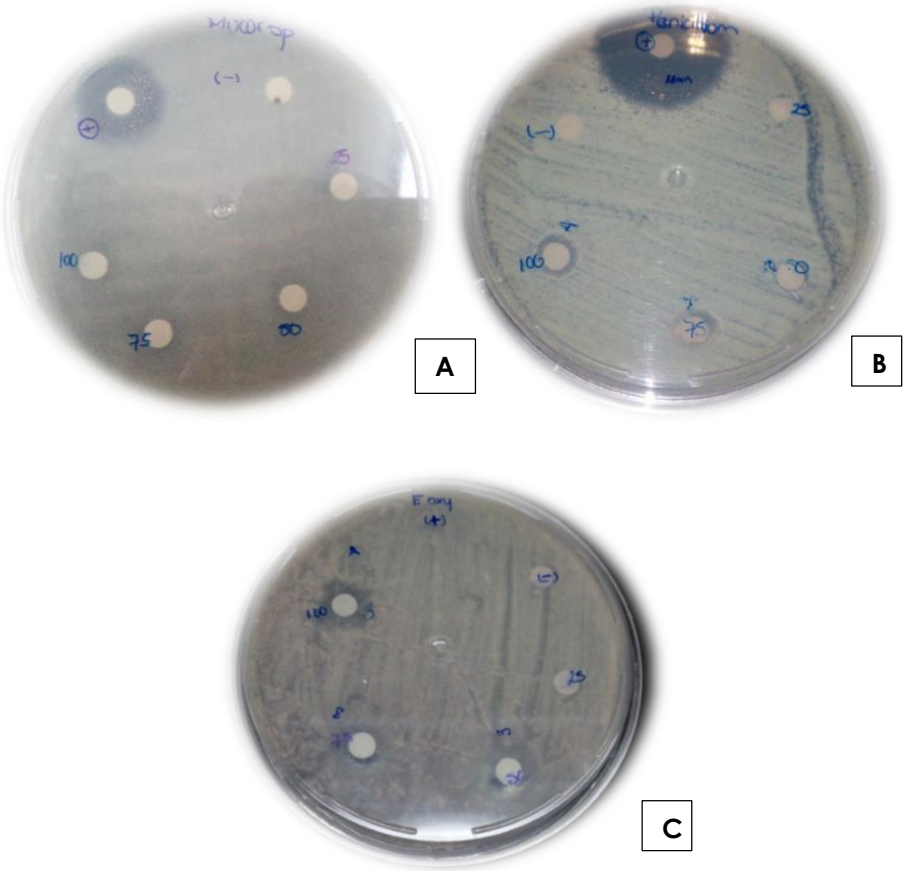


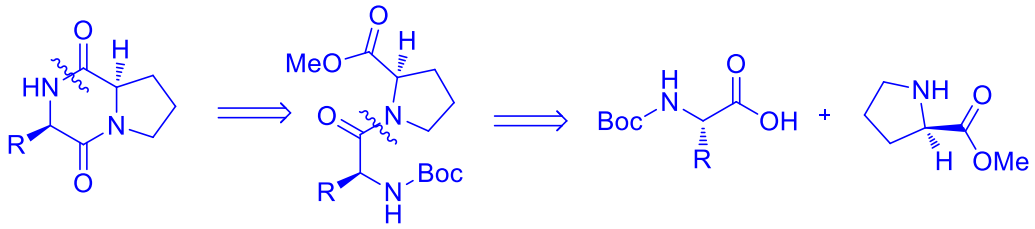
Figura 34: Antibiograma con hongos fitopatógenos. A) *Mucor sp,* B) *Penicillium sp, C) Fusarium oxysporum.*

Con esta nueva información se puede decir que el compuesto ciclo(L-Pro–L-Val) **1** posee una débil actividad antifúngica ya que mostró inhibición del crecimiento del hongo *Penicillium sp y Fusarium oxysporum.*

4.5 Síntesis orgánica de dicetopiperazinas

Debido a la mínima cantidad obtenida de los compuestos **1** y **2** extraídos de manera natural se planteó la síntesis orgánica de ciclo (L-Pro–L-Val) **1** y ciclo (L-Pro–L-Tyr) **2**.

Primeramente se procede a realizar un análisis retrosintético, como se muestra en el esquema 3.

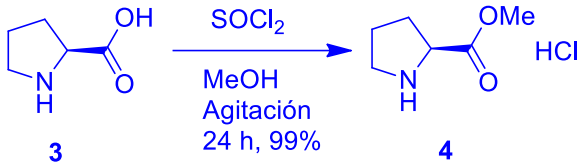


Esquema 3: Análisis retrosintético de las dicetopiperazinas

Analizando el esquema 3 se propone primeramente la desconexión de un grupo amida proponiendo que el grupo carbonilo provenga de un éster y el átomo de nitrógeno de una amina secundaria protegida, en seguida se propone una segunda desconexión del otro segundo grupo amida proponiendo que el grupo carbonilo provenga de un ácido carboxílico y el átomo de nitrógeno provenga de una amina secundaria por lo que se propone que las materias primas para la síntesis de las dicetopiperazinas deben de ser los correspondientes aminoácidos que en este caso son L-prolina, L-valina y L-tirosina. En el caso de los compuestos, ciclo(L-Pro–L-Val) **1** y ciclo(L-Pro–L-Tyr) **2**, el aminoácido constante es la L-prolina y cambia el segundo aminoácido el cual se puede cambiar por algún otro aminoácido para la obtención de alguna otra dicetopiperazina.

Primeramente se realizara la síntesis del éster metílico de la L-prolina **4** que se describe a continuación.

En un matraz de fondo redondo con barra magnética y atmósfera de argón se adiciona L-prolina **3** en seguida metanol anhidro, se coloca a 0 °C, posteriormente se adiciona cloruro de tionilo y se mantiene en agitación por 24 h, obteniendo el producto **4** con un rendimiento del 99%. (Esquema 4).[16]

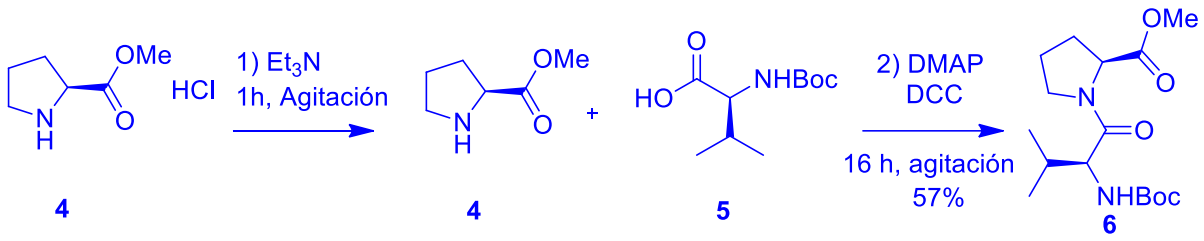


Esquema 4: Preparación del clorohidrato del éster metílico de la L-prolina.

Para la obtención del producto **4** se propone el siguiente mecanismo de reacción, Esquema 5.

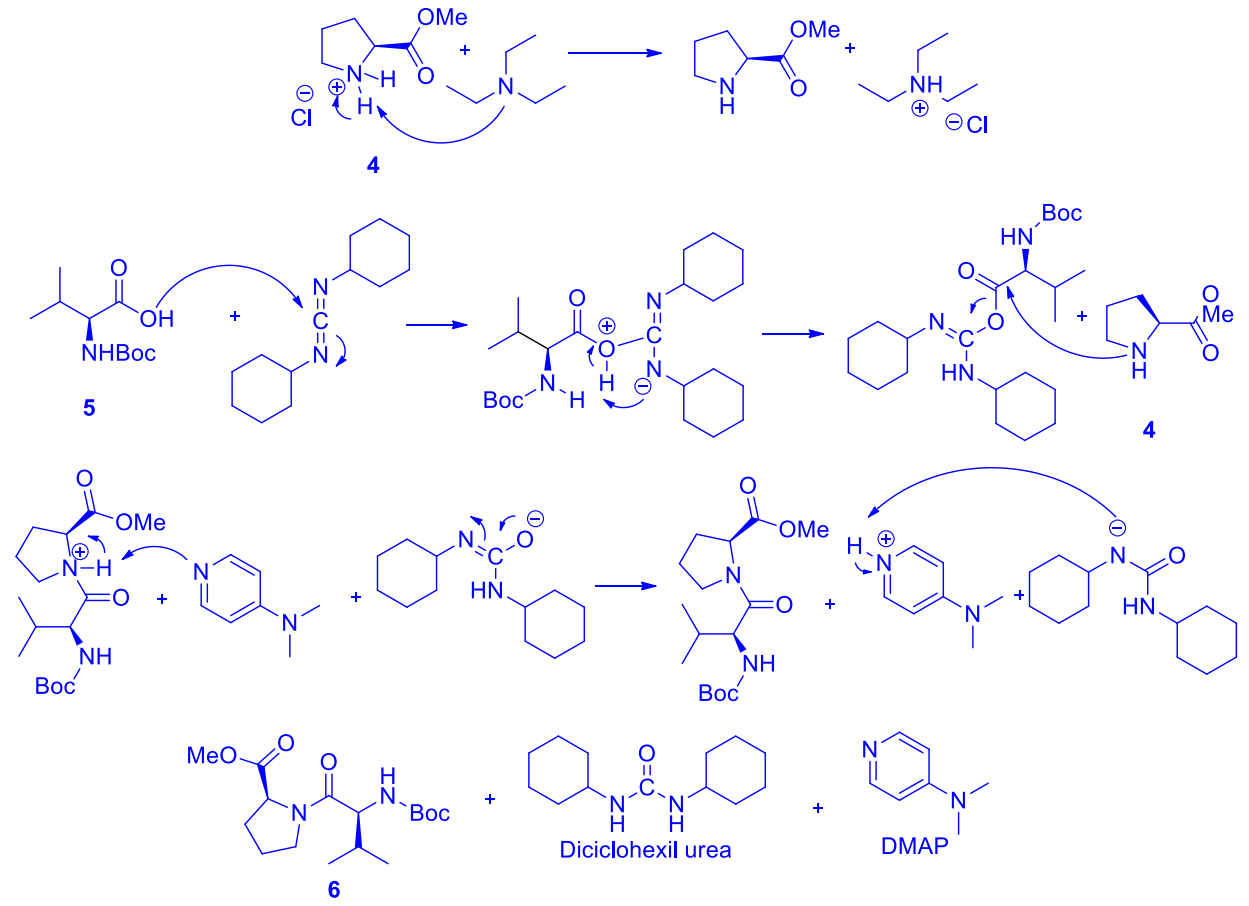
Esquema 5: Propuesta mecanística de la formación del éster metílico L-prolina

Ya teniendo el éster metílico de la L-prolina **4** se procede a realizar una acilación entre éste y el *N*-Boc L-valina **5** para obtener el compuesto acilado **6** en un rendimiento del 57%, como se muestra en el siguiente esquema 6.[17]



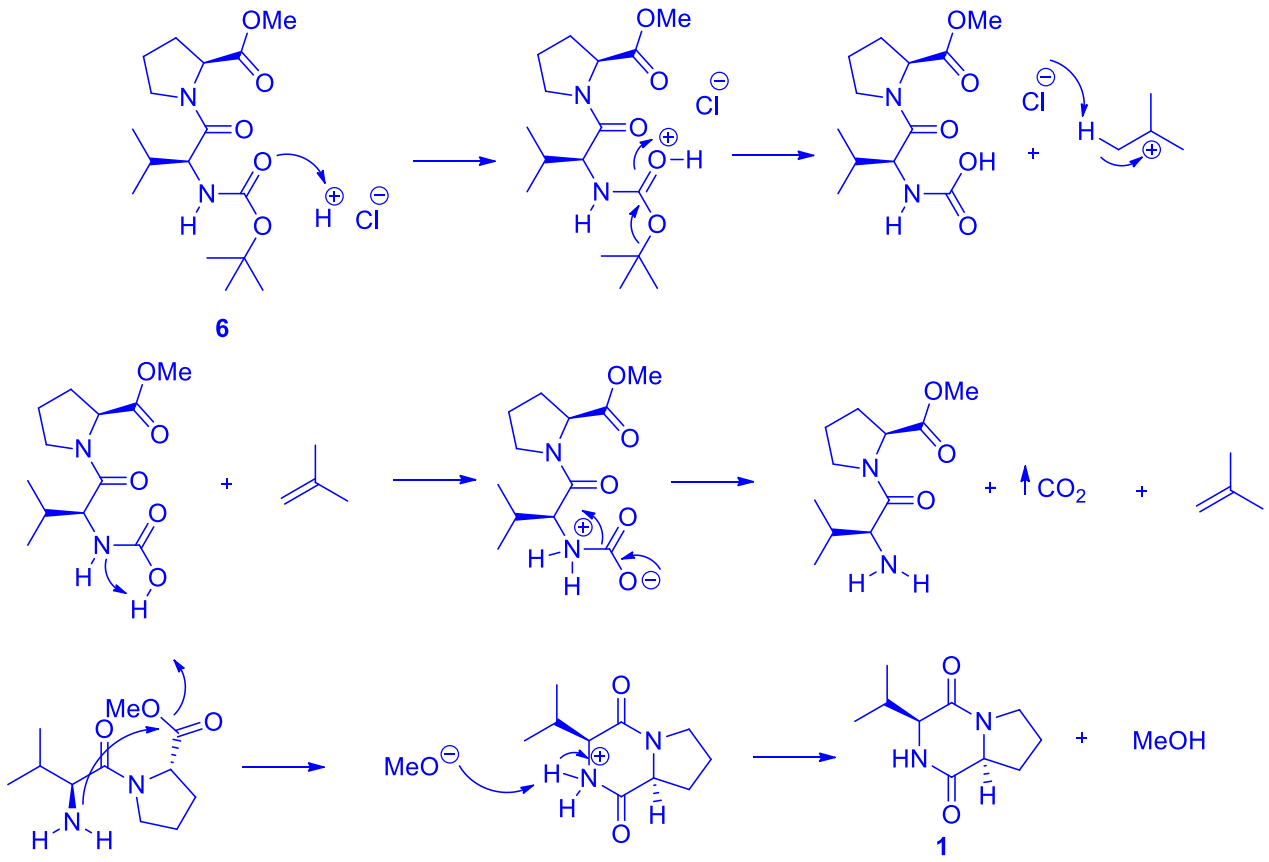
Esquema 6: Acoplamiento de aminoácidos.

Como primer paso de la reacción se realiza la liberación del clorohidrato del éster metílico de la L-prolina **4** se disuelve en DCM y se adiciona Et_3N y se mantiene en agitación por una hora, seguido se adiciona el *N*-Boc L-valina **5**, la DMAP y por último la DCC. Se propone el siguiente mecanismo de reacción para el acoplamiento de aminoácidos como se observa en el esquema 7.



Esquema 7: Propuesta mecanística del acoplamiento de aminoácidos.

Ya obteniendo el producto **6** se procede a la ciclación intramolecular, primeramente se procede a la desprotección de la amina **6** que tiene el Boc para que este átomo pudiese llevar a cabo el ataque nucleofílico hacia el carbonilo perteneciente a la L-prolina y liberar el grupo metoxi en forma de metanol, para obtener el producto ciclado **1** en un rendimiento del 78%, como se muestra en el esquema 8. Cabe destacar que los métodos reportados mencionan dos pasos para esta etapa en la desprotección con el ácido y después una ciclación con piperidina. Sin embargo el producto ciclado **1** se obtuvo en un paso y sin el empleo de piperidina, que consistió en la presencia de un exceso de NaOH.



Esquema 8: Desprotección de la amina y ciclación intramolecular.

Al finalizar la reacción de ciclación intramolecular se obtiene el producto final **1**. Se procedió a cristalizarlo con un sistema DCM:Hexano, obteniendo un producto cristalino similar al producto extraído.

Por último se procedió a realizar una comparación entre el producto natural extraído, ciclo(L-Pro–L-Val) **1** con el producto sintetizado.

Por lo cual se obtuvo la espectroscopia de RMN de ^{1}H similar al producto natural.

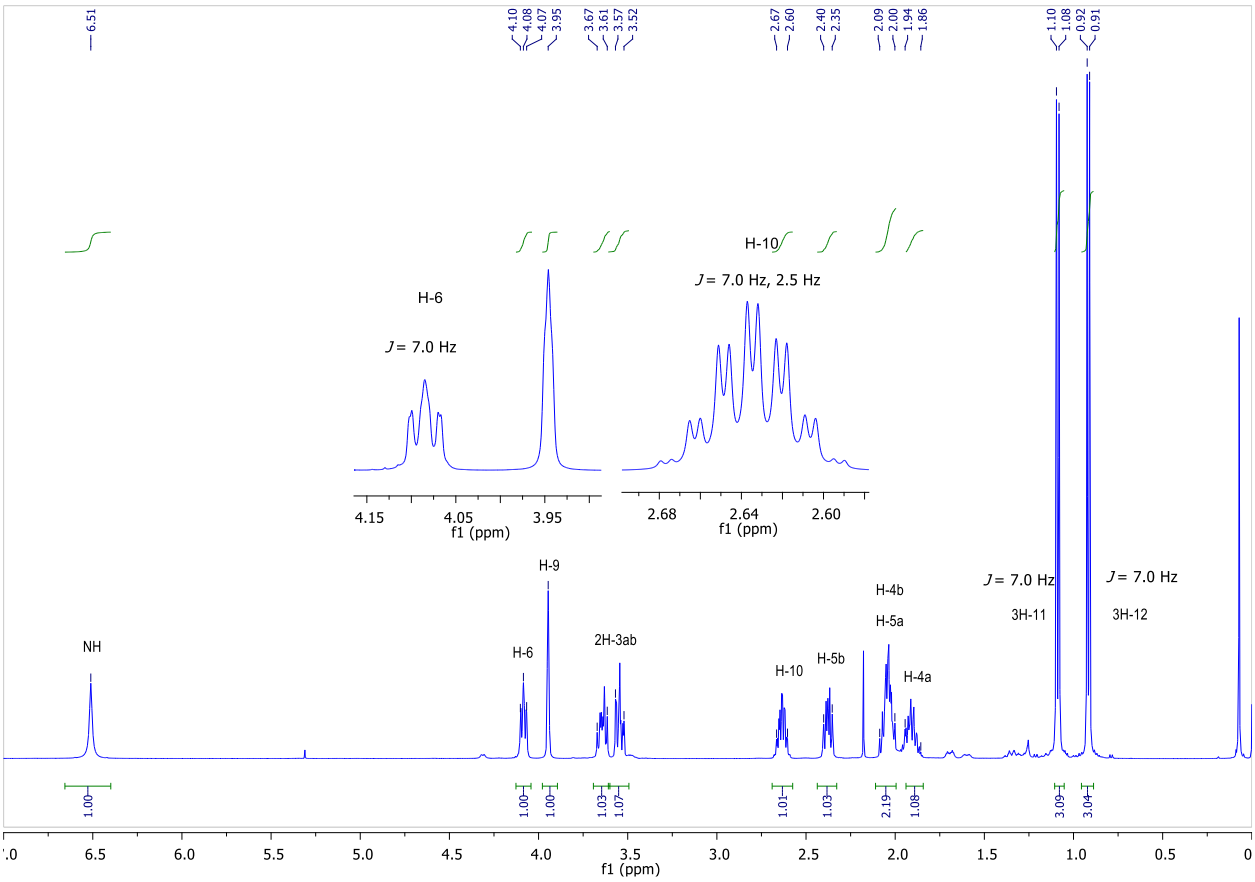


Figura 35: *Espectro de ^{1}H a 500 MHz en $CDCl_3$ del producto final **1** sintético.*

Como muestra la figura 35 su espectro es similar al del producto natural. A continuación se presenta la comparación de los dos espectros de RMN de ^{1}H de los compuestos natural y sintético.

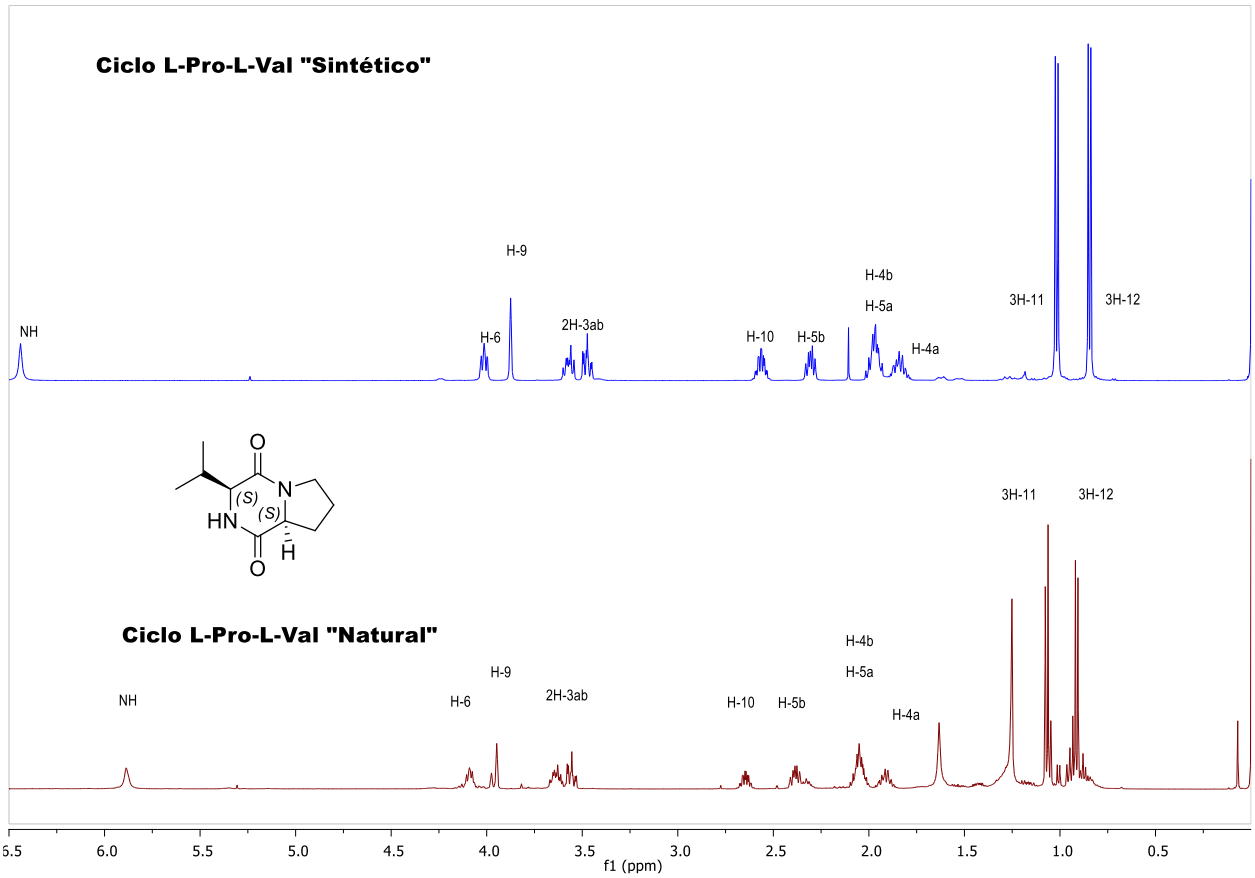


Figura 36: *Comparación de los espectros de ^{1}H de la (L-Pro-L-Val) natural y sintética*

Como se puede observar en la figura 36, las señales en ambos espectros son similares a excepción del NH ya que en la del compuesto natural **1** se encuentra en 5.88 ppm mientras que el compuesto sintético **1** está en 6.51 ppm.

Se obtuvo el espectro 2D COSY del producto sintético con el fin de asignar adecuadamente cada hidrógeno del compuesto sintético **1** (Figura 37).

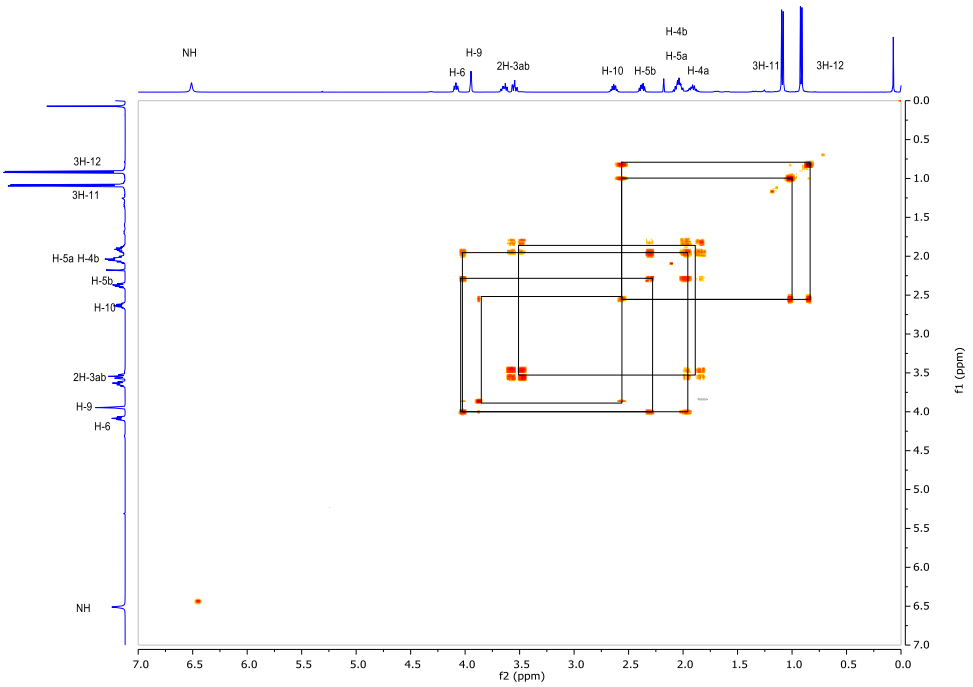


Figura 37: Espectro 2D COSY del ciclo(L-Pro–L-Val) sintético

Se realizó la correlación de las señales presentes en el producto sintético **1** asignando de manera adecuada los hidrógenos y observando así una similitud al espectro del compuesto natural **1**. En seguida se muestra en la figura 38 el espectro de RMN ^{13}C del producto sintético **1**.

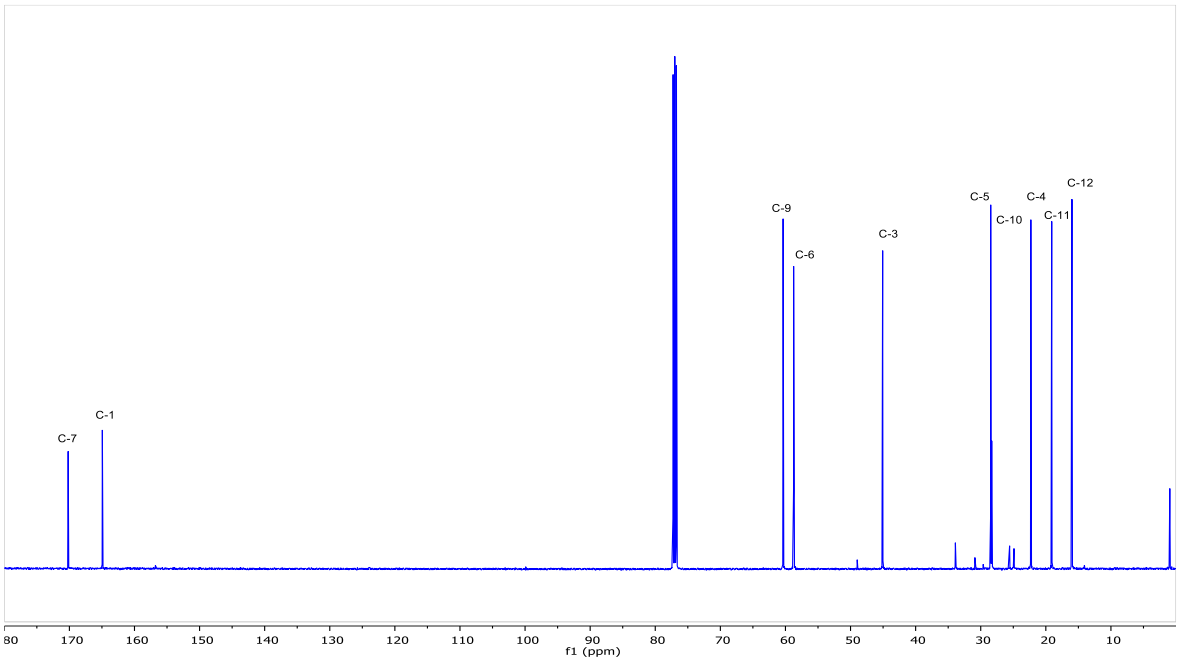


Figura 38: Espectro de 125 MHz de ^{13}C en $CDCl_3$ del compuesto **1**.

Se realizó la comparación del espectro de RMN ^{13}C de los productos natural **1** y sintético **1**, como se observa en la figura 39.

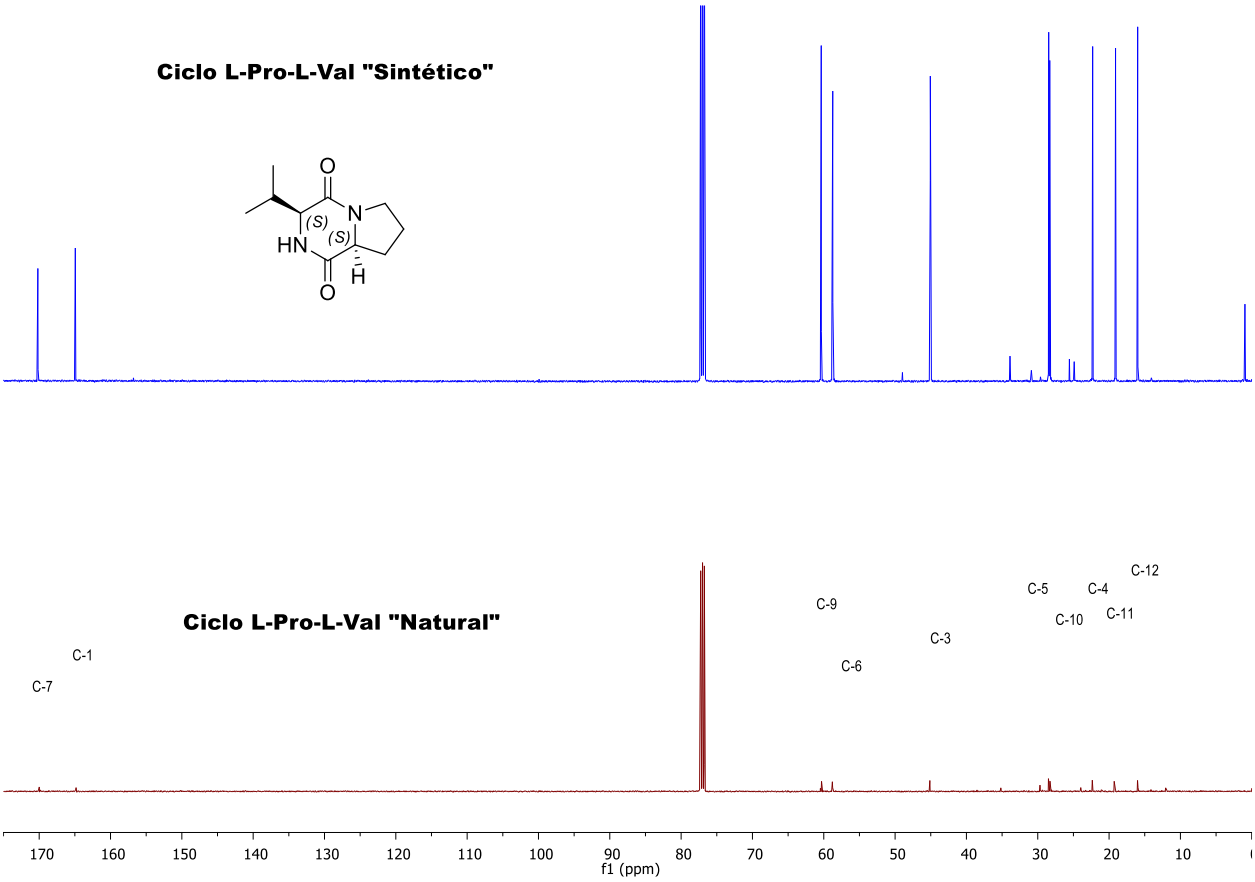


Figura 39: Comparación de los espectros de ^{13}C de los productos natural y sintético

En la figura 39 se puede observar gran similitud de las señales pertenecientes a los carbonos encontrados en los compuestos.

Siguiendo la secuencia de experimentos de RMN se obtuvo también el espectro 2D HSQC del compuesto sintético **1** para la correcta asignación de los carbonos.

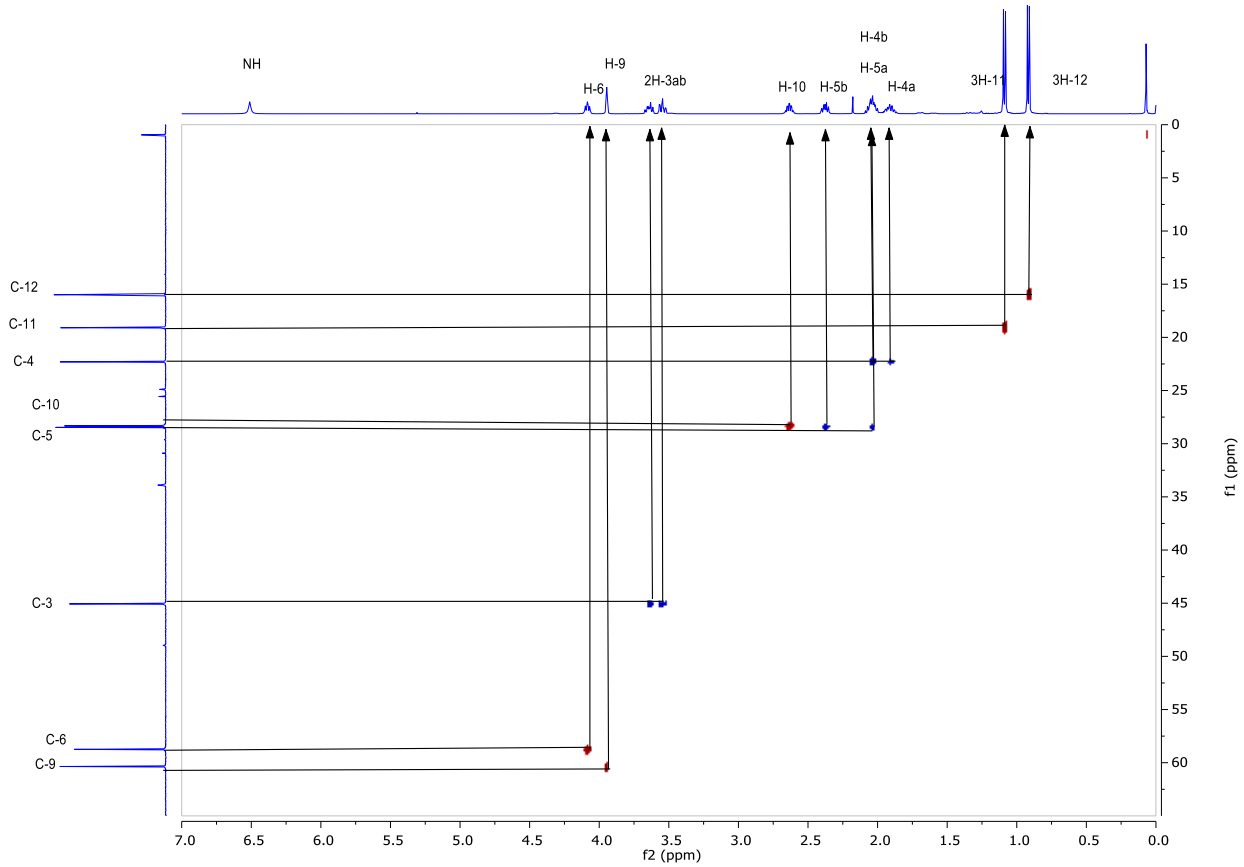
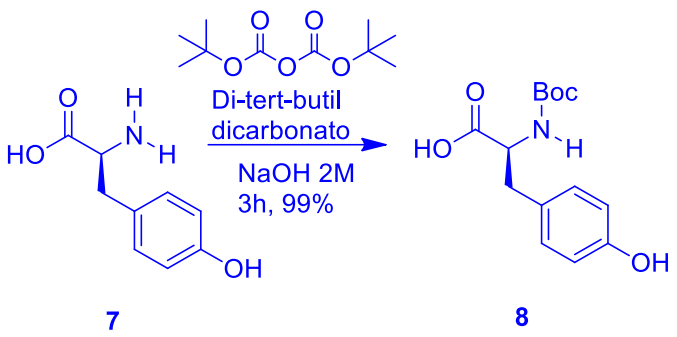


Figura 40: Espectro 2D HSQC del ciclo L-ProL-Val sintético.

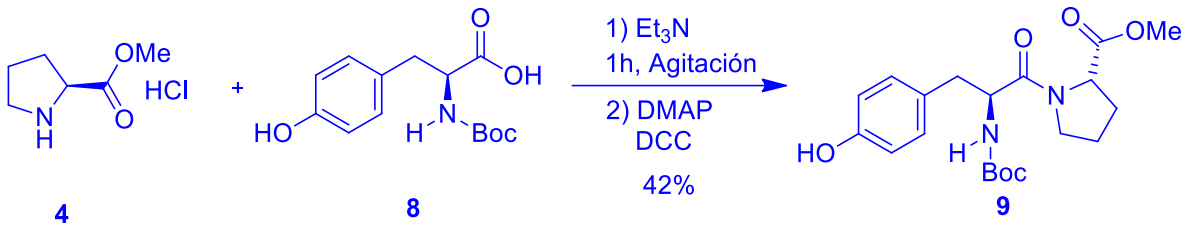
En la figura 40 se observa la correlación de los carbonos encontrados en nuestra molécula con los hidrógenos y asignando adecuadamente el espectro de RMN ^{13}C como se realizó en el producto natural **1**.

Se realizó la síntesis de la dicetopiperazina **2**. Para esta síntesis se procedió primeramente a la protección de la L-tirosina **7** la cual se coloca en un matraz con barra magnética y se disuelve con una solución de NaOH 2M. Posteriormente se adiciona lentamente el di-*tert*-butil dicarbonato y ya teniendo estos reactivos se coloca en agitación por 3 horas a temperatura ambiente, pasado el tiempo se acidifica la reacción a un pH neutro con una solución concentrada de HCl, finalmente se extrajo con AcOEt, la fase orgánica se seca con sulfato de sodio y se evapora a presión reducida obteniendo el producto **8** con un rendimiento del 99%. (Esquema 9).[18]



Esquema 9: Preparación del N-Boc-L-Tirosina.

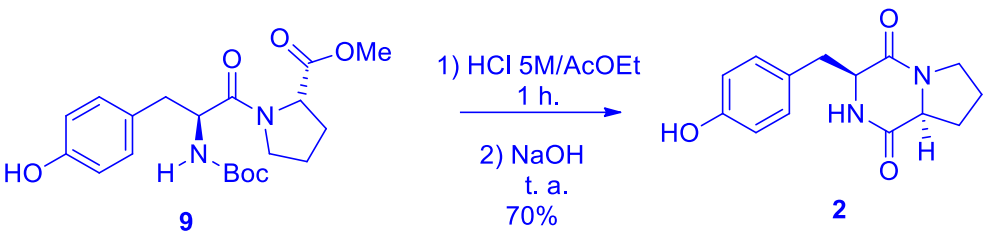
Ya teniendo el N-Boc L-Tirosina **8** y el éster metílico de la L-prolina **3** se procede a realizar un acoplamiento entre los dos aminoácidos. Para obtener el compuesto acilado **9** en un rendimiento del 42 %, como se muestra en el siguiente esquema 10.



Esquema 10: Acoplamiento de los aminoácidos.

Como primer paso de la reacción se realiza la liberación del clorohidrato del éster metílico de la L-prolina **4**, se disuelve en DCM, se adiciona Et_3N y se mantiene en agitación por una hora, pasado esto se adiciona: *N*-Boc L-Tirosina **8**, DMAP y por último DCC.

Ya obteniendo el producto **9** se procede a la ciclación intramolecular, primeramente se procede a la desprotección de la amina **9** que tiene el Boc para que este átomo pudiese llevar a cabo el ataque nucleofílico hacia el carbonilo perteneciente al de la L-Tirosina y liberar el grupo metoxi en forma de metanol, para obtener el producto ciclado **2** en un rendimiento del 70%, como se muestra en el siguiente esquema 11.

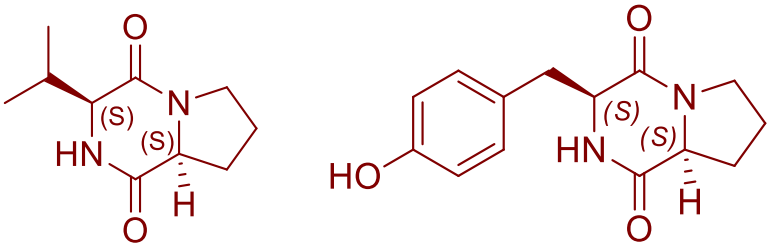


Esquema 11: Desprotección y ciclación intramolecular.

Al finalizar la reacción de ciclación intramolecular se obtiene el producto final **2** el cual se obtiene como un polvo blanco con un rendimiento del 70%.

Conclusiones

- En la búsqueda de metabolitos secundarios de la bacteria *Bacillus endophyticus* crecida en un medio de cultivo de tripticaseína de soya se obtuvo un extracto crudo con acetato de etilo con un rendimiento de 400 mg/L, que tenia actividad antimicrobiana.
- De este extracto se lograron aislar dos compuestos orgánicos de interés que se caracterizaron mediante técnicas espectroscópicas identificándolas como dicetopiperazinas, compuestos con gran valor biológico.



Ciclo (L-Pro-L-Val) **1** Ciclo (L-Pro-L-Tyr) **2**

- Se obtuvieron cristales de ambos compuestos para su análisis por difracción de rayos X confirmando la estructura propuesta y su estereoquímica con una configuración absoluta del compuesto **1** (*S*), (*S*) y del compuesto **2** (*S*), (*S*).

- Con los compuestos purificados se realizaron antibiogramas a las bacterias de interés medico dando una nula inhibición; en cambio, cuando se realizaron antibiogramas contra hongos fitopatógenos se observó una clara inhibición contra *Fusarium oxysporum* y *Penicillium sp*, poniendo en evidencia la actividad antifúngica de estos compuestos además hace pensar que en el extracto crudo aún existen otros metabolitos con actividad antibacteriana.

- En base a la elucidación estructural de los compuestos **1** y **2**, se realizó su análisis retrosintético, proponiendo una síntesis orgánica llevada a cabo con éxito en dos pasos de manera sencilla, obteniendo un rendimiento global de 44% del producto **1** y 29% del producto **2**.

Desarrollo Experimental

Extracción de los Compuestos Naturales

6.1 Materiales y Métodos

De una colección de cepas se eligió una cepa con poder inhibitorio hacia algunas bacterias de interés médico (*E. coli, Pseudomonas, Vibrio*, *S. aureus*, etc…) catalogada como ELI 149, siendo *Bacillus endophyticus* aislada anteriormente del suelo.

El medio de cultivo utilizado fue TSB (caldo soya tripticaseína) el cual contiene:

Peptona de Caseína	17.0g
Peptona de Soya	3.0g
Dextrosa	2.5g
Cloruro de sodio	5.0g
Fosfato dipotásico	2.5g

Estos ingredientes se disuelven en 1 L de agua destilada y se coloca en 4 matraces Erlenmeyer de 500 mL depositando en cada uno de ellos 250 mL del caldo de cultivo.

Pasado esto se procedió a la esterilización en autoclave bajo las siguientes condiciones: 20 min, 15 libras, 120 °C. Pasado el tiempo de esterilización se dejó enfriar a temperatura ambiente.

6.2 Crecimiento de la cepa ELI 149

La cepa a utilizar se creció primeramente en una placa de medio sólido LB (Luria Bertani), durante 24 horas, se observó su morfología macroscópica y se revisó que permaneciera sin ninguna contaminación por alguna otra bacteria u hongo. Posteriormente se procedió a inocularla en el cultivo TSB en condiciones de esterilidad (campana de flujo laminar y mechero bunsen). Una vez inoculado el cultivo se procedió a incubar en una estufa a 29 °C y con una agitación orbital de 175 rpm durante 7 días.

Pasado el tiempo de incubación se procedió a centrifugar, con el fin de separar células del cultivo líquido a 6000 rpm durante 15 min separando por decantación el botón celular del cultivo ya tratado.

6.3 Extracción del cultivo sin células con disolventes orgánicos

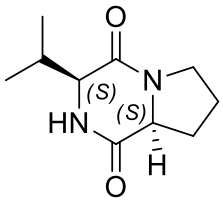
Al cultivo ya sin células se le procedió a realizar una extracción con disolventes en una relación 1:1 de volumen.

Se utilizó acetato de etilo en la relación ya antes mencionada por 3 veces. Posteriormente la fase orgánica recolectada se secó con Na_2SO_4 y se concentró a presión reducida obteniendo un extracto crudo de aspecto viscoso de color marrón-amarillo de un olor penetrante en un rendimiento de 400 mg/L.

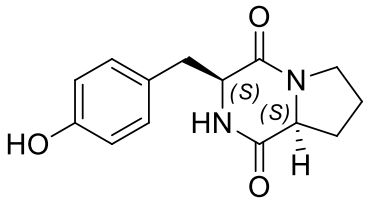
6.4 Purificación del extracto crudo de la cepa ELI 149

El extracto crudo se procedió a su purificación mediante cromatografía en columna de gel de sílice encontrando sistemas óptimos para la obtención de dos compuestos de interés, (eluyente AcOEt:Acetona 90:10 y 80:20, respectivamente).

6.5 Caracterización de los compuestos de interés



(3*S*, 8a*S*)-3-isopropilhexahidropirrol[1,2-a]piperazina-1,4-diona, 1. Rendimiento 4.6% (0.015 g, 0.077 mmol) sólido blanco. p.f= 165.2 °C, $[\alpha]_D^{25}$= - 129° (*c* 1.0, MeOH). El espectro de masas muestra el ion molecular con masa de 154 *(m/z)*, correspondiente a la fórmula molecular $C_{10}H_{16}N_2O_2$ [m/z (%): 196 (2), 154 (100), 125 (35), 110 (10), 98 (7), 70 (65), 41 (12)]. RMN ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) δ 5.88 (1H, s, NH), 4.10 (1H, dd, *J* = 7.4 Hz, CH, Pro), 3.94 (1H, s, CH, Val), 3.69-3.60 (1H, m, CHa, Pro), 3.57-3.53 (1H, m, CHb, Pro), 2.69-2.60 (1H, dsep, *J* = 7.0,2.6 Hz, CH, Val), 2.31 – 2.33 (1H, m, CHa, Pro), 2.08-2.01 (2H, m, CHb, CHa, Pro), 1.94-1.86 (1H, m, CHb, Val), 1.07 (3H, d, *J* = 7.0 Hz, CH_3, Val), 0.91 (3H, d, *J* = 7.0 Hz, CH_3, Val). RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) δ 170.0 (C=O), 164.8 (C=O), 60.3 (CH-Pro), 58.7 (CH-Val), 45.1 (CH_2-Pro), 28.5 (CH_2-Pro) 28.2 (CH-Val), 22.3 (CH_2-Pro), 19.2 (CH_3-Val), 16.0 (CH_3-Val). $IR_{\upsilon max}$: 3212, 2969, 1669, 1426, 1293, 791 cm^{-1}. EI-HRMS: calculado para ($C_{10}H_{16}N_2O_2$), 196.1212; encontrado, 196.1192.



(3*S*, 8a*S*)-3-(4 hidroxibenzil) hexahidropirrolo[1,2-a]piperazin-1,4-diona, 2. Rendimiento 5.8% (0.023 g, 0.089 mmol) sólido blanco. p.f= 147.2 °C. $[\alpha]_D^{25}$= - 53,8° (*c 1*, EtOH). El espectro de masas muestra el ion molecular con la masa de 196 *(m/z)*, correspondiente a la fórmula molecular $C_{14}H_{16}N_2O_3$ [m/z (%): 260 (8), 154 (100), 125 (3), 107 (50), 70 (18), 18 (44)]. RMN ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.07 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, Ph), 6.79 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, Ph), 6.36 (1H, s, OH), 5.78 (1H, s, NH), 4.20 (1H, dd, *J* = 10.5, 4.0 Hz, CH-Tir), 4.11-4.07 (1H, m, CH-Pro), 3.67-3.54 (2H, m, CH_2-N), 3.47 (1H, dd, *J* = 14.6, 4.0 Hz, CHa [CH_2-Tir]), 2.75 (1H, dd, *J* = 14.6, 10.0 Hz, CHb [CH_2-Tir]), 2.37-2.32 (1H, m, CHa [CH_2-Pro]), 2.05-1.87 (3H, m, CH_2, CHb [CH_2-Pro]). RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) δ 169.0 (C=O), 165.1 (C=O), 155.4 (C-OH), 130.3 (CHPh), 127.1 (CPh), 116.1 (CHPh), 59.1 (CH-Pro), 56.2 (CH-Tyr), 45.4 (CH_2-Pro) 35.8 (CH_2-Tyr), 28.3 (CH_2-Pro), 22.5 (CH_2-Pro). $IR_{\upsilon max}$: 3292, 3212, 1632,

1514, 1533, 1227, 806 cm^{-1}. FAB-HRMS: calculado para ($C_{14}H_{16}N_2O_3$), 260.1161; encontrado, 260.1160.

Pruebas Biológicas

Para realizar este tipo de pruebas se utilizó el método de antibiograma que es una prueba microbiológica que se realizó para determinar la susceptibilidad (sensibilidad o resistencia) de un microorganismo (bacteria y hongo) a un compuesto o grupo de compuestos con actividad antibiótica u antimicrobiana. Se considera antimicrobiano cualquier sustancia con capacidad de matar o al menos inhibir el crecimiento de los microorganismos.

Se prepararon cultivos en tubos cerrados estériles de 15 mL con una suspensión de las bacterias que se probaron (*Escherichia coli, Pseudomonas sp, Salmonella cholerasuis, Serratia marcescens, Vibrio cholerae, Staphylococcus aureus, Staphylococcus saprophyticus y Listeria monocytogenes*) con 5 mL de cultivo líquido LB. Éstos se incubaron a 29 °C por 24 h. Posteriormente se tomaron 100 µL de cada tubo con la bacteria en suspensión y se esparcieron en placas de medio de cultivo sólido en condiciones de esterilidad.

En forma paralela se impregnaron con los compuestos discos de papel filtro de aproximadamente 0.5 mm de diámetro previamente esterilizados que fueron colocados con pinzas estériles en las correspondientes placas del medio de cultivo sólido donde se encontraba esparcida la bacteria. En cada placa también se colocaron dos discos más que fueron los controles: el control positivo (antibiótico) y negativo (agua estéril). Estas placas se incubaron a 29 °C por 24h. Transcurrido el tiempo se observó el crecimiento de cada placa y se midió el halo de inhibición que provocara el compuesto impregnado en el disco.

Para el antibiograma con hongos se realizó el siguiente procedimiento; en condiciones de esterilidad (mechero bunsen) se tomó con un asa micológica parte del micelio aéreo del hongo, el cual fue crecido previamente en una placa con medio PDA (Agar papa dextrosa) durante 7 días, depositándolo en 1 mL de cultivo líquido LB contenido en un tubo estéril y se procedió a agitar por 1 min, posteriormente se dejó en reposo por 15 min. Se realiza una observación microcópica para observar esporas del hongo. Se procede a tomar 100 µL de la parte media con el fin de solo tomar esporas en suspensión y se colocan en placas de medio sólido papa dextrosa (PDA) y se esparcen como se realiza con las bacterias y posteriormente se realiza el mismo procedimiento de discos impregnados con los compuestos a la vez también se coloca un control positivo (antifúngico miconazol) y un control negativo (agua), se incuban por 24 h y pasado el tiempo se mide su halo de inhibición que tuvieron los compuestos impregnados en el disco.

El colocar un control positivo tanto a bacterias como hongos es para tener un punto de referencia de la inhibición que podría tener un compuesto frente al microorganismo.

Desarrollo Experimental

Síntesis Orgánica

Materiales y Métodos

El material de reacción se secó previamente en una estufa a 100 °C toda la noche y bajo flama directa momentos antes de ser utilizado. El metanol fue secado con Magnesio (Mg^0), Yodo y destilado bajo atmósfera de argón. El cloruro de metileno fue secado con CaH_2 y destilado bajo atmósfera de argón. Todas las reacciones fueron monitoreadas por cromatografía en placa fina utilizando cromato-placas comerciales de gel de sílice 60. Se utilizó para revelado una lámpara ultravioleta o una cámara con vapores de yodo. La purificación de productos mediante cromatografía de columna se realizó bajo presión, empleando gel de sílice Macherey-Nagel 60 como fase estacionaria y mezclas de disolventes en proporciones adecuadas (acetato de etilo, hexano) como eluyentes.

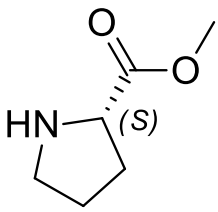
Los espectros de RMN de ^1H y de ^{13}C se determinaron en espectrómetros Varian 300 MHz y Bruker 500 MHz, utilizando agua deuterada (D_2O), cloroformo deuterado ($CDCl_3$) como disolvente y tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los valores de los desplazamientos químicos se encuentran en partes por millón (ppm) respecto al TMS y las constantes de acoplamiento (*J*) en Hertz (Hz). Para la multiplicidad de las señales para un espectro de ^1H se utilizan las siguientes abreviaturas: (s) simple, (d) doble, (dd) doble de doble, (dsept) doble de séptuples, (t) triple, (q) cuádruple, (m) múltiple, (sa) señal ancha.

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Bamstead Electrothermal 9100 en capilares abiertos.

Los espectros de masas se realizaron por impacto electrónico (EI-MS) y espectrometría de masa de alta resolución (HR-MS) en el espectrómetro de masas Jeol JMS-700.

Las rotaciones ópticas se realizaron en el polarímetro Perkin Elmer Instruments Modelo 341 y se expresaron como valores específicos [α] (longitud de onda empleada: línea D del Na (589)), con indicación del disolvente y la concentración utilizados en (g/100mL). Las mediciones se realizaron a temperatura ambiente.

Obtención del Éster L-Prolina 4

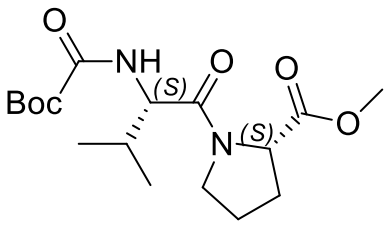


En un matraz de fondo redondo seco, con atmósfera de argón y con barra magnética se adicionó L-prolina (1.00 g, 8.60 mmol) en seguida metanol anhidro y se colocó en baño de hielo (0 °C) en agitación. Se adicionó poco a poco cloruro de tionilo (1.13 g, 9.50 mmol), y posteriormente se mantiene en agitación por 24 hrs. Transcurrido el tiempo, el exceso de cloruro de tionilo y el metanol se evaporaron a presión reducida obteniéndose el producto **4** como un aceite amarillo, rendimiento del 98%.

RMN ^{1}H (300 MHz, D_2O) δ 4.50 (1H, m, CH), 3.85 (3H, s, CH_3), 3.50-3.35 (4H, m, NH_2, CH_2), 2.53 - 2.49 (2H, m, CH_2) 2.22-2.00 (2H, m, CH_2).

RMN ^{13}C (75 MHz, D_2O) δ 172.6 (C=O), 65.3 (CH), 51.8 (CH_3), 46.7 (CH_2), 29.7 (CH_2), 24.5 (CH_2).

Obtención del (*S*)-metil 1-((S)-2-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-3-metoxibutanoil)pirrolidina-2-carboxilato 6

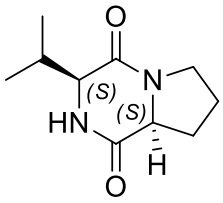


En un matraz de fondo redondo seco, con atmósfera de argón y con barra magnética se adiciona el éster de la L-prolina **4** (0.50 g, 3.19 mmol) enseguida se adiciona diclorometano seco pasado esto se coloca en agitación, posteriormente se adicionó poco a poco trietilamina (0.89 mL, 6.39 mmol) y se mantiene en agitación por 1 hr. Pasado el tiempo se adicionó a este matraz de reacción DMAP (0.11 g, 9.5 mmol), *N*-Boc de la L-valina (1.06 g, 3.62 mmol) y DCC (0.72 g, 3.51 mmol) hasta que se observó una mezcla homogénea, se colocó a temperatura ambiente por 16 h. Al finalizar el tiempo de reacción se evaporó el disolvente a presión reducida, posteriormente se adicionó 15 mL de éter etílico en agitación y enseguida se filtró con ayuda de una capa de celita (1 cm) y se repitió el proceso dos veces más. El filtrado se colocó en un matraz de bola, el disolvente se evaporó a presión reducida obteniendo un crudo de reacción el cual se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (eluyente hexano:AcOEt, 70:30) obteniéndose el producto acilado **6** como un líquido transparente, rendimiento del 57% (0.53 g, 1.63 mmol).

RMN ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) δ 5.18 (1H, d, *J* = 9 Hz, CH), 4.50 (1H, dd, *J* = 4.8 Hz, CH, Pro) 4.25 (1H, dd, *J* = 6.4 Hz, CH), 3.81 - 3.73 (1H, m, CH, Pro), 3.69 (3H, s, CH_3, Pro), 3.68 - 3.58 (1H, m, CH, Pro), 2.8 - 2.15 (1H, m, CH, Pro), 2.07 - 1.88 (4H, m, CH_2, Pro), 1.40 (9H, s, 3 CH_3, Val), 1.01 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, CH_3), 0.91 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, CH_3, Val).

RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) δ 172.4 (C=O), 171.2 (C=O), 155.8 (C=O), 79.4 (C-Boc), 58.7 (CH-Pro), 56.8 (CH-Val), 52.1 (C-OMe), 47.1 (CH_2-N-Pro), 33.9 (CH-Val), 31.3 (CH_2-Pro), 29.0 (CH_2-Pro), 28.3 (3CH_3-Boc), 19.2 (CH_3-Val), 17.3 (CH_3-Val).

Obtención del (3*S*, 8a*S*)-3-isopropilhexahidropirrol[1,2-a]piperazina-1,4-diona 1

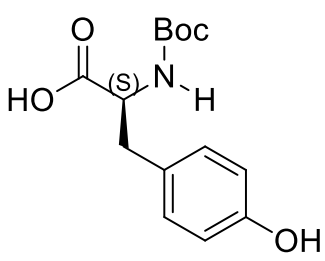


En un matraz de fondo redondo y barra magnética se adicionó el producto **6** de la condensación anterior y se le adicionó por cada 50 mg, 10 mL de una solución de HCl 5M en acetato de etilo y se mantuvo en agitación por 1 h a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo se adicionó a 0 °C una solución de NaOH 2M hasta obtener un pH=10 y se dejó en agitación por 30 min. Pasado el tiempo se extrajo el producto con acetato de etilo (3 x 50 mL) la fase orgánica se secó con Na_2SO_4 y se evaporó a presión reducida obteniéndose un sólido blanco el cual se cristalizó con un sistema DCM:Hexano 30:10 obteniendo un producto ciclado **1**. Rendimiento 78% con aspecto sólido, blanco y cristalino.

RMN ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) δ 6.51 (1H, sa, NH), 4.08 (1H, dd, *J* = 7.2 Hz, CH, Pro), 3.95 (1H, s, CH, Val), 3.67 - 3.61 (1H, m, CHa-N, Pro), 3.57 - 3.53 (1H, m, CHb-N, Pro), 2.67 - 2.59 (1H, dsep, *J* = 7.0, 2.5 Hz, CH, Val), 2.40 - 2.35 (1H, m, CHa, Pro), 2.08 - 2.00 (2H, m, CHb, CHa, Val), 1.94 - 1.87 (1H, m, CHb, Val), 1.90 (3H, d, *J* = 7.5 Hz, CH_3, Val) 0.92 (3H, d, *J* = 7.5 Hz, CH_3, Val).

RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) δ 170.18 (C=O), 164.93 (C=O), 60.35 (CH-Pro), 58.34 (CH-Val), 45.06 (CH_2-Pro), 28.46 (CH_2-Pro) 28.32 (CH-Val), 22.30 (CH_2-Pro), 19.09 (CH_3-Val), 15.99 (CH_3-Val).

Obtención del compuesto Acido (*S*)-2-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-3-(4-hidroxifenil) propanoico 8

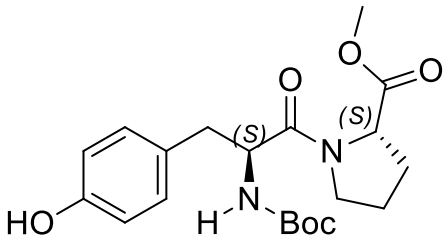


En un matraz de fondo redondo con barra magnética se adicionó el aminoácido L-Tirosina **7** (0.5 g, 2.75 mmol) en seguida 15 mL de una solución de NaOH 2N después de esta se adiciona 10 mL de dioxano y se colocó en agitación, ya que este disuelto se adicionó poco a poco ditert-butil dicarbonato (0.66 g, 2.75 mmol) se mantiene en agitación a

temperatura ambiente por 3 h. Transcurrido el tiempo, se procede a acidificar la mezcla de reacción con una solución de HCl concentrado hasta llegar a un pH neutro, finalmente esta mezcla se extrajo con AcOEt (3 x 50 mL) y se concentró a vacío para obtener el producto **8**, rendimiento del 98%, características de un sólido blanco.

RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.09 (3H, s, NH, OH, Ph-OH), 6.99 - 6.97 (2H, d, *J* = 7.6 Hz, Ph), 6.73 - 6.71 (2H, d, *J* = 7.6 Hz, Ph), 5.18 - 5.16 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, CH), 3.02 (2H, m, CH_2), 1.41 (9H, s, Boc)

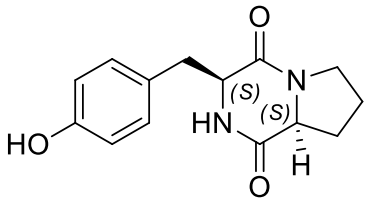
Obtención del (*S*)-metil 1-((*S*)-2-((*tert*-butoxicarbonil) amino)-3-(4-hidroxifenil) propanil)pirrolidina-2-carboxilato 9



En un matraz de fondo redondo seco, con atmósfera de argón y con barra magnética se adiciona el éster de la L-prolina **4** (0.070 g, 0.42 mmol) enseguida se adiciona diclorometano seco pasado esto se coloca en agitación, posteriormente se adicionó poco a poco trietilamina (0.11 mL, 0.84 mmol) y se mantiene en agitación por 1 hr. Pasado el tiempo se adicionó a este matraz de reacción DMAP (0.01 g, mmol), *N*-Boc de la L-tirosina (0.15 g, 0.05 mmol) y DCC (0.09 g, 0.42 mmol) hasta que se disolvió, transcurrido esto se colocó a temperatura ambiente por 16 h. Al finalizar el tiempo de reacción se evaporó el disolvente a presión reducida, posteriormente se adicionó 15 mL de éter etílico en agitación y enseguida se filtró con ayuda de una capa de celita (1 cm) y se repitió el proceso dos veces más. El filtrado se colocó en un matraz de bola, el disolvente se evaporó a presión reducida obteniendo un crudo de reacción el cual se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (eluyente hexano:AcOEt, 60:40) obteniéndose el producto acilado **9** rendimiento 42%, como un sólido blanco.

RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.73 (1H, sa, OH), 7.36 (1H, sa, NH), 6.98 - 6.95 (2H, d, *J* = 8.4 Hz, Ph), 6.78 - 6.75 (2H, d, *J* = 8.4 Hz, Ph), 5.03 (1H, d, *J* = 6 Hz, CH-Tyr), 4.48 (1H, sa, CH-Pro), 3.73 - 3.45 (2H, m, CH_2-N-Pro), 3.70 (3H, s, CH_3, O-Me), 2.99-2.93 y 2.75-2.68 (2H, m, CH_2-Pro), 1.91-1.83 y 1.67-1.63 (2H, m, CH_2-Tyr), 1.35 (9H, s, $3CH_3$).

Obtención del (3S,8aS)-3-(4-hidroxibenzil)hexahidropirrol[1,2-a]piperazina-1,4-diona. 2



En un matraz de fondo redondo y barra magnética se adicionó el producto **9**, se le adicionó por cada 50 mg, 10 mL de una solución de HCl 5M en acetato de etilo y se mantuvo en agitación por 1 h a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo se adicionó a 0 °C una solución de NaOH 2M hasta obtener un pH=10 y se dejó en agitación por 30 min. Pasado el tiempo se extrajo el producto con acetato de etilo (3 x 50 mL), la fase orgánica se secó con Na_2SO_4 y se evaporó a presión reducida obteniéndose el producto ciclado **2,** rendimiento 70%, como un sólido blanco y cristalino.

RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.02 (2H, d, *J* = 10.0 Hz, Ph), 6.77(2H, d, *J* = 10.0 Hz, Ph), 6.40 (1H, s, NH), 4.36 (1H, s, CH-Tyr), 4.12 (1H, s, CH-Pro), 3.68 - 3.57 (2H, m, CH_2-N, Pro), 3.64 (2H, m, CH Pro, OH), 3.07 (1H, dd, *J* = 14.0, 4.0 Hz, CH_2, Tyr), 2.90 (1H, dd, *J* = 14.0, 10.5 Hz, CH_2, Tyr), 2.06-1.98 (3H, m, CH_2-Pro, CH-Pro). RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) δ 169.0 (C=O), 165.1 (C=O), 155.4 (C-OH), 130.3 (CHPh), 127.1 (CPh), 116.1 (CHPh), 59.1 (CH-Pro), 56.2 (CH-Tyr), 45.4 (CH_2-Pro) 35.8 (CH_2-Tyr), 28.3 (CH_2-Pro), 22.5 (CH_2-Pro)

Bibliografía

1. Velusamy, P.; Gnanamanickam, S.S. (**2008**) The Effect of Bacterial Secondary Metabolites on Bacterial and Fungal Pathogens of Rice. In: Karlowsky P (ed) Soil biology, vol14. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp 93–106.
2. Stein, T. *Mol. Microbiol*., **2005**, *56*:845–857
3. Demain, A.L.; Fang, A. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol*. **2000**, *69*:1–39
4. Sansinenea, E.; Ortiz, A. *Biotechnol. Lett*., **2011**, *33*:1523–1538.
5. Sansinenea, E. (Ed) (**2012***) Bacillus thuringiensis* biotechnology. ISBN: 978-94-007-3020-5 Springer.
6. Karlovsky, P. (**2008**) Secondary metabolites in soil ecology. In: Karlovsky P (ed) Soil biology, vol 14. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp 1-19.
7. Reva, O. N.; Smirnov, V.V.; Petterson, B.; Priest, F.G. *Int. J. Syst. Evol. Micr*., **2002**, *52*, 101-107.
8. Lee, Y-J.; Lee, S-J.; Kim, S. H.; Lee, S. J.; Kim, B-C.; Lee, H-S.; Jeong, H.; Lee, *D-W. J. Bacteriol*. **2012**, *194*, 5705-5706.
9. Ortiz-Castro R, Díaz-Pérez C, Martínez-Trujillo M, del Río RE, Campos-García J, López-Bucio *J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **2011**, *108*: 7253–7258.
10. Arachchilage, A. P. W.; Wang, F.; Feyer, V.; Plekan, O.; Prince, K. C. *J. Chem. Phys*. **2012**, *136*, 124301-1.
11. Nakagawa, K.; Takada, K.; Imamura, N. *Biosci. Biotechnol. Biochem*, **2013**, *77*, 1449-1454.
12. Kumar, S. N.; Siji, J. V.; Nambisan, B.; Mohandas, C. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2012**, *168*, 2285-2296.
13. Alan D. Borthwick. *Chem. Rev*. **2012**, *112*, 3641-3716.
14. Campbell, J.; Lin, Q.; Geske, G.D.; Blackwell, H. *Chem. Biol*. **2009**, *4*, 1051-1059.
15. Thajudeen, H.; Park, K.; Moon, S-S.; Hong, I.S. *Tetrahedron Lett*., **2010**, *51*, 1303-1305.
16. Confalone, P. N.; Huie, E. H.; Ko, S. S.; Cole, G. H. *J. Org Chem.* **1988**, *53*, 482-487.
17. Wenting W.; Zhihui Z.; Lanny S. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 14256–14259.
18. Rioton, S; Orliac, A; *Org. Lett*. **2015**, *17*, 2916-2919.