

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD

AUTÓNOMA DE PUEBLA

POSGRADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

TESIS PARA OBTENCIÓN DE TÍTULO EN:

DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS

En el área de Química Orgánica

*Identificación de productos naturales de *Bacillus thuringiensis* con actividad.*

Por

M.C Miriam Castro Gutierrez

Director:

Dra. Estibaliz Sansinenea Royano

carta a comisión revisor

Agradecimientos

Publicaciones

Parte de los resultados obtenidos durante la elaboración de la presente Tesis Doctoral han generado las siguientes publicaciones:

- Aurelio Ortiz, Miriam Castro and Estibaliz Sansinenea. 3,4-Dihydroisocoumarins, interesting natural products: isolation, organic syntheses and biological activities. *Current organic synthesis*. **2019**, 16 (1), 112-129.
- Miriam Castro, Jacqueline Jimenez, Aurelio Ortiz, Estibaliz Sansinenea. Di[(R)-2-ethylhexyl] Phthalate, a Bioactive Metabolite First Isolated from Three Different Bacillus Species, and its Synthesis. *Letters in Organic Chemistry*, **2020**, 17 (2), 90-95.

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología Microbiana y Síntesis Orgánica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP), bajo la dirección de la Dra. Estibaliz Sansinenea Royano, con el apoyo económico de la beca nacional otorgada por CONACyT y el apoyo del proyecto CONACyT de ciencia básica N°251512.

ÍNDICE

Abreviaturas	6
Resumen	7
Abstract	8
1- Introducción	9
2- Antecedentes	10
2.1 Productos naturales de origen microbiano	10
2.2 <i>Bacillus thuringiensis</i> como productor de compuestos	13
2.3 Di-2-etilhexilftalato compuesto natural más que un contaminante	14
2.4 Compuestos indólicos	17
3- Objetivos	19
3.1 Objetivo General	19
3.2 Objetivos Particulares	19
4- Discusión de Resultados	20
4.1 Obtención y fraccionamiento del extracto crudo	20
4.2 Purificación de las fracciones obtenidas	22
4.3 Caracterización de los compuestos	22
4.4 Síntesis del compuesto Ftalato de bis-(2 <i>R</i> -etilhexilo)	51
4.5 Pruebas de actividad biológica	65
5- Conclusiones	71
6- Desarrollo experimental	73
6.1 Selección de cepa de <i>Bacillus</i> y preparación de medio de cultivo	73
6.2 Crecimiento de la cepa de <i>Bacillus thuringiensis</i> ELI52	73
6.3 Extracción del cultivo sin células con disolventes orgánicos	73
6.4 Purificación de los compuestos con columna cromatográfica de gel de sílice	73
6.5 Pruebas de sensibilidad	74
6.6 Síntesis orgánica	75
7- Bibliografía	79

ABREVIATURAS

1D	Una dimensión	HCl	Ácido clorhídrico
2D	Dos dimensiones	COSY	Correlación espectroscópica homonuclear
μL	Microlitro	d	Señal doble
mg	Miligramo	DCM	Diclorometano
mL	Mililitro	EI -MS	Espectrometría de masas por impacto electrónico
Da	Unidad Dalton	HSQC	Correlación Quantum Simple
LB	Medio de cultivo Luria Bertani	IR	Espectroscopía infrarroja
PDA	Medio de cultivo papa dextrosa	<i>J</i>	Constante de acoplamiento
TSB	Medio de cultivo tripticaseína de soya	RMN	Resonancia magnética nuclear
S	Sensible	rpm	Revoluciones por minuto
R	Resistente	s	Señal simple
TLC	Cromatografía en capa fina	t	Señal triple
VLC	Cromatografía líquida de vacío	m	Señal múltiple
t.a	Temperatura ambiente		

Resumen

En nuestro grupo de investigación se ha trabajado con una cepa de *Bacillus thuringiensis* ELI 52 cuya actividad bactericida fue evaluada contra varias bacterias de interés clínico. En este trabajo se obtendrán y purificarán algunos compuestos de tipo indólicos además de compuesto ftalato y se realizará la evaluación biológica de todos los compuestos contra hongos y bacterias. Estos compuestos fueron aislados e identificados mediante técnicas de separación por columna, técnicas espectométricas y espectroscópicas.

Cabe destacar que del compuesto de tipo ftalato se obtuvo un enantiómero de forma pura y por ello se decidió realizar la síntesis asimétrica de los dos estereoisómeros. Este compuesto tuvo poco poder inhibitorio a diferentes bacterias y hongos de interés clínico y agrícola respectivamente. Respecto a los compuestos de tipo indólico mostraron alto poder inhibitorio ante diferentes bacterias y hongos.

Como producto del trabajo realizado en el doctorado se obtuvieron dos publicaciones en revistas indexadas en JCR.

Abstract

In our research group it has been working with *Bacillus thuringiensis* ELI 52 strain whose bactericidal activity was evaluated against some gram-positive and gram-negative bacteria. From this strain different compounds were achieved and in this work some indolic compounds and phthalate compound were obtained and purified and the biological activity of the compounds will be evaluated against fungi and bacteria. These compounds were isolated and identified through column separation spectrometric and spectroscopic methods.

It should be worth noting that phthalate compound was achieved one pure enantiomer and for this reason it was decided to do asymmetric synthesis of this compound to obtain two stereoisomers. This compound has a little inhibitory activity against both bacteria and fungi with clinical and agricultural interest respectively. Respecting indolic compounds they show high inhibitory activity against bacteria and fungi.

As result of the work realized during PhD thesis two publications were achieved in JCR indexed journals.

1- INTRODUCCIÓN

Debido a la alta resistencia de diversos microorganismos a los diferentes antibióticos y a la necesidad creciente de nuevos compuestos, es necesario seguir estudiando los diversos metabolitos secundarios producidos por los microorganismos. El género *Bacillus* sp. es productor de múltiples metabolitos secundarios, de diferente estructura química con variadas aplicaciones en el ambiente, la agricultura y la biotecnología industrial.

En trabajos previos en el laboratorio fue identificada del suelo una cepa de *Bacillus thuringiensis*, que mostró poder inhibitorio en diferentes bacterias patógenas, así como en diferentes hongos fitopatógenos con lo cual se pudo apreciar que contaban con una amplia gama de metabolitos secundarios capaces de dicha inhibición.

Por lo que, en este trabajo se propuso la extracción de productos naturales a partir de un extracto crudo de la cepa *Bacillus thuringiensis* ELI 52. Para ello se procedió a la fragmentación del extracto crudo y purificación de diferentes compuestos, para mediante las técnicas espectrométricas realizar su correcta elucidación. Finalmente, también fueron realizadas pruebas de inhibición a bacterias y hongos de los compuestos de interés.

2- ANTECEDENTES

2. 1 Productos naturales de origen microbiano

Los productos naturales tienen un impacto profundo en muchas áreas de investigación, incluida la medicina, química orgánica y la biología celular. Éstos compuestos, derivados de microorganismos, plantas y animales, continúa siendo una inspiración para la química sintética por su compleja arquitectura superlativa.

Para realizar la síntesis de metabolitos secundarios la Naturaleza utiliza una serie de unidades básicas como material de construcción (building blocks) con diferentes átomos de carbono. Simulando un modelo de construcción tipo LEGO® se pueden sintetizar con los pequeños bloques (Figura 1) estructuras más complejas que incluso pueden tener quiralidad. Un ejemplo ilustrativo se encuentra en las moléculas de la siguiente figura (Figura 2).¹

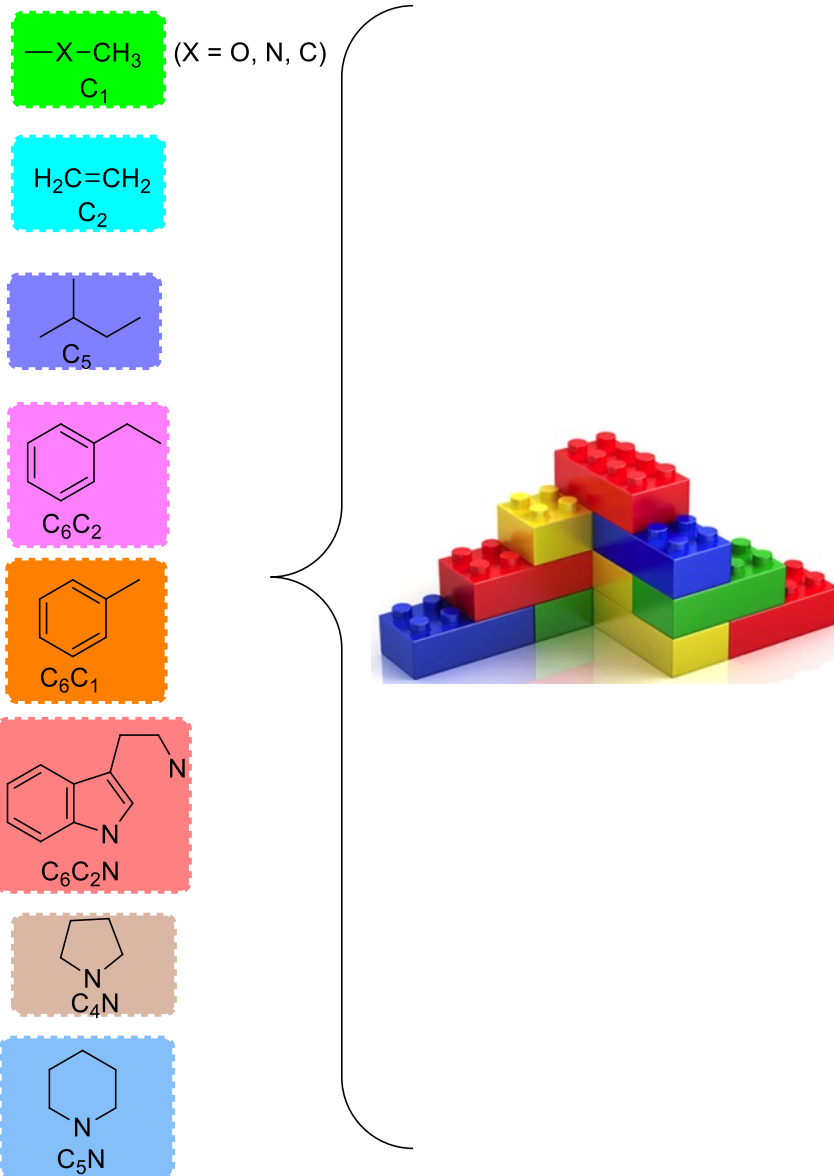


Figura 1. Unidades básicas presentes en los productos naturales.

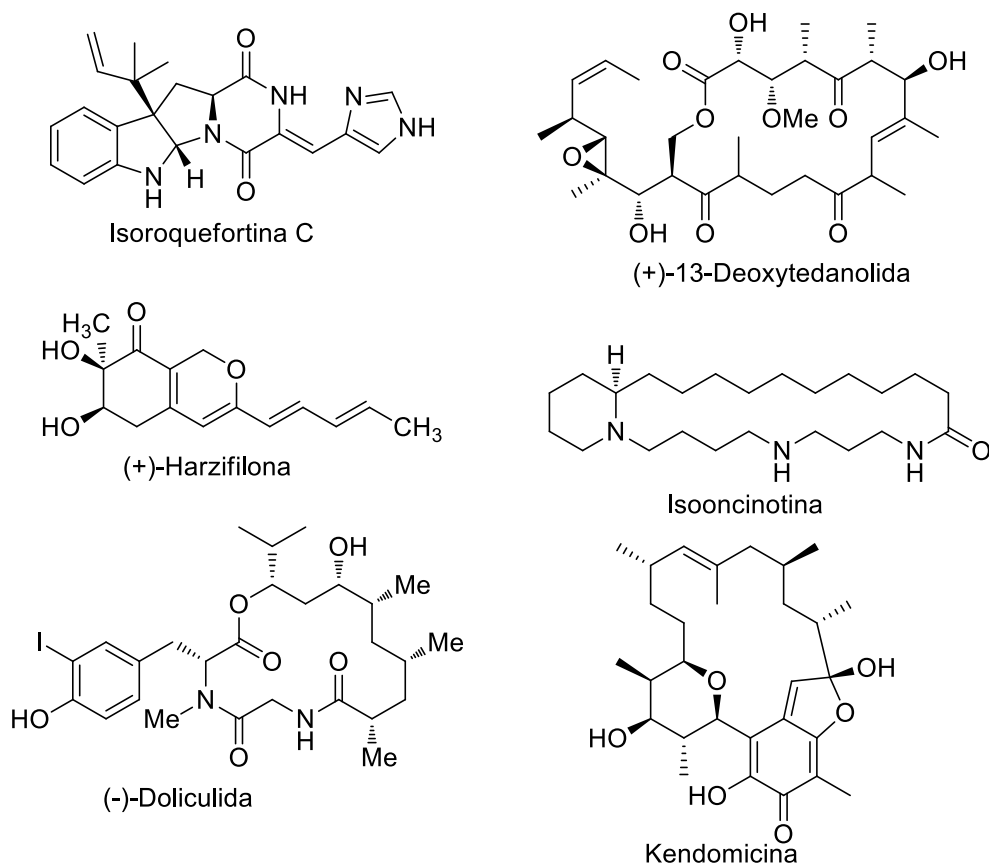


Figura 2. Estructuras complejas

Para sintetizar estas estructuras tan complejas en forma enantioméricamente pura la química orgánica requiere de múltiples pasos de reacción y que necesitan condiciones de laboratorio en muchos casos drásticas como son altas temperaturas o presiones o el uso de catalizadores en muchos casos, etc. Sin embargo de manera natural los organismos vivos pueden producir estos compuestos de forma biosintética mediada por enzimas.¹

La desventaja de la producción natural son las pequeñas cantidades de los productos que se obtienen. Y por otro lado su síntesis suele ser complicada debido a la complejidad estructural. Por todo ello se recurre a dos grandes posibilidades:

- Producción biotecnológica de plantas
- Uso de microorganismos

2.2 *Bacillus thuringiensis* como productor de compuestos

Bacillus sp. secreta muchos metabolitos secundarios, incluyendo antibióticos, antifúngicos y sideróforos de diferente estructura química con variadas aplicaciones en el ambiente, la agricultura y la biotecnología industrial.²⁻⁴ Dentro de los metabolitos secundarios producidos por especies de *Bacillus* spp. se encuentran cuatro familias: bacteriocinas, lantibióticos, lipopéptidos y policétidos⁴. Una de las especies del género *Bacillus* spp. más reconocidas por su potencial como agente de control biológico es *B. thuringiensis* que es considerado parte de la población bacteriana zimógena⁵.

B. thuringiensis secreta otros compuestos con actividades inhibitorias contra otras bacterias, hongos, insectos y nemátodos. La producción de estos metabolitos es muy sensible a factores ambientales o a las condiciones de cultivo⁶. En la siguiente Figura 3 se observan algunas de las estructuras de los compuestos encontrados en *B. thuringiensis*.

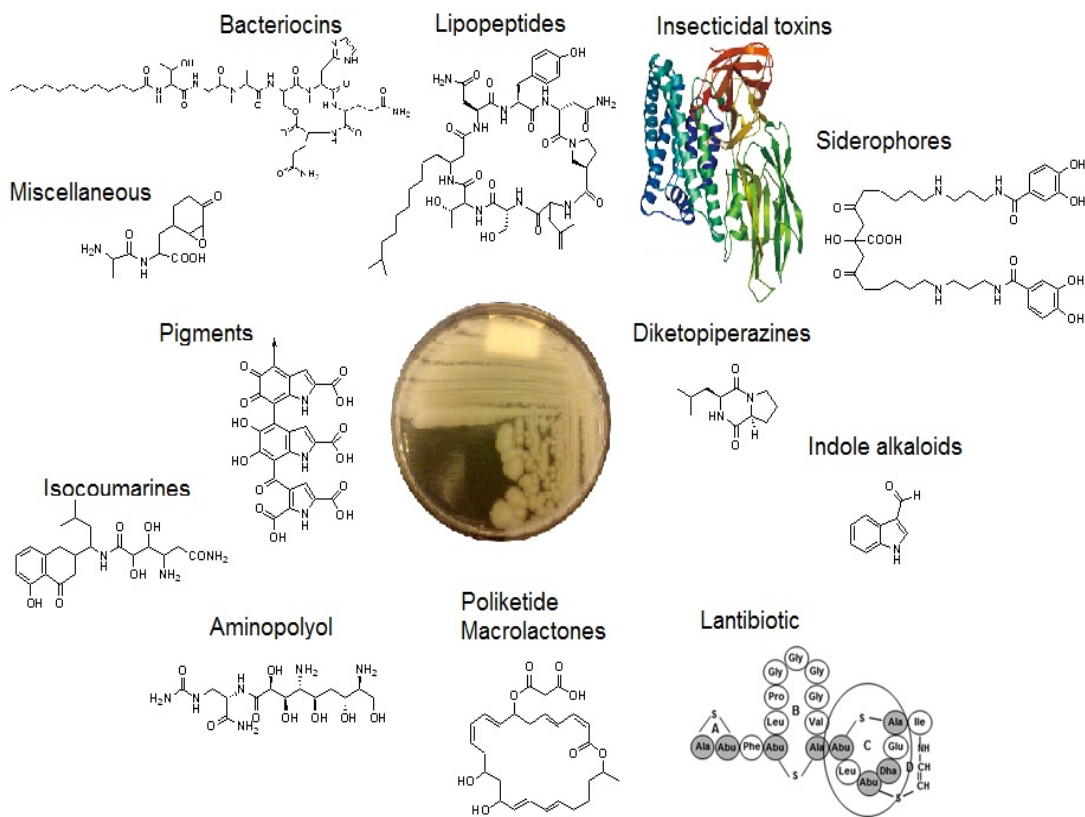


Figura 3. Estructuras de los compuestos encontrados en *B. thuringiensis*

En este trabajo de tesis se pudieron separar e identificar algunos de los compuestos mostrados en la figura anterior entre los que destacan el compuesto Di-2-etilhexilftalato y los compuestos indólicos que se describirán en las siguientes secciones.

2.3 Di-2-etilhexilftalato (DEHP) compuesto natural más que un contaminante

Los compuestos de tipo ftalato son líquidos incoloros que han sido utilizados como plastificadores para mejorar la flexibilidad de varios materiales como empaques de comida, juguetes, aparatos médicos como bolsas para almacenar sangre y otros productos^{7,8}. Este compuesto ha sido persistentemente encontrado en diferentes ambientes terrestres y acuáticos resultando en uno de los contaminantes más importantes del mundo⁹. Estos compuestos se liberan de los productos industriales y su fotodegradación es muy lenta bajo condiciones naturales. Por lo tanto, las cantidades de los compuestos ftalatos se acumulan sobre el tiempo en distintos ambientes como aire, agua, suelo y sedimentos causando una alta exposición para los seres humanos¹⁰. Respecto a su toxicidad y sus efectos en la salud humano se han llevado a cabo varios estudios en donde se advierte que causan teratogenicidad, mutagenicidad y carcinogenicidad incluso a muy bajas concentraciones¹¹. Para reducir la presencia de estos compuestos en el ambiente se han reportado muchas reacciones que llevan a su degradación, aunque uno de los métodos más efectivos es el empleo de microorganismos que degradan estos compuestos por ser métodos simples, baratos y ambientalmente amigables. Sin embargo, hay una parte en esta historia que puede generar controversia acerca del origen de estos compuestos. Se ha reportado que este compuesto ha sido aislado de bacterias y hongos diversos. La biosíntesis natural de este compuesto ha sido tema de debate cuestionando si es un contaminante con efectos tóxicos para la salud humana o más bien es un producto natural.¹²

Para revisar este punto se puede decir que los ésteres de los ftalatos son gradualmente liberados de los productos industriales durante su manufactura,

almacenaje, uso y disposición¹³. La velocidad de fotodegradación e hidrolización de estos contaminantes es muy lenta bajo condiciones naturales, ya que el DEHP tiene una vida media de 2000 años¹⁴. Debido a su extenso uso ha sido detectado en muchos lugares como ríos, lagos, aguas subterráneas, suelos y sedimentos. También se pueden liberar a la atmósfera como gases que podrían entrar en el ser humano mediante la respiración. Debido a esta alta concentración se han realizado varios estudios acerca de sus efectos en la salud humana. Hay estudios que revelan un posible efecto carcinogénico, así como un disruptor endocrino. Sin embargo, su potencial tóxico es inconcluso. Esto es debido a que la mayoría de los estudios han sido llevados a cabo en animales y hay muy pocos datos de los efectos verdaderos en el ser humano^{15,16}. Consecuentemente se han desarrollado métodos eficientes para remover DEHP de diversos ambientes o para degradar este compuesto. Los procesos biológicos han tenido su cabida en la degradación de estos compuestos ya que la biodegradación reduce el costo de operación¹⁷.

La idea de que el compuesto DEHP sea sólo un contaminante ha ido cambiando gradualmente debido a que se ha encontrado que este compuesto es sintetizado por varios microorganismos como los actinomicetos.

En general, los ftalatos son ésteres de ácido ftálico, también conocidos como ésteres de benceno-1,2-ácidos dicarboxílicos. Los ftalatos contienen un anillo de benceno con dos grupos éster. Su solubilidad en agua decrece cuando incrementa la longitud de la cadena lateral o su peso molecular. Tiene temperaturas de ebullición altas, débil solubilidad en agua y buena solubilidad en muchos disolventes orgánicos. Se producen por una reacción de esterificación del ácido ftálico con varios alcoholes. El compuesto Di-2-etilhexilftalato (DEHP) es obtenido por una reacción de esterificación del 2-etilhexanol con el anhídrido ftálico. Es un líquido incoloro y su fórmula molecular es $C_{24}H_{38}O_4$ con un peso molecular de $390.57 \text{ g mol}^{-1}$. Es una sustancia quiral debido a la presencia de un centro estereogénico. Ha sido ampliamente usado como plastificador en muchos artículos hechos de cloruro de polivinilo (PVC)^{9,18}. Está presente en muchos plásticos, especialmente

materiales vinílicos¹⁹. Los compuestos ftálicos no están químicamente unidos al PVC por lo que pueden migrar o evaporarse en la atmósfera.

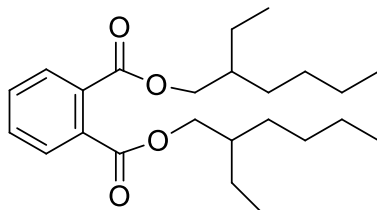
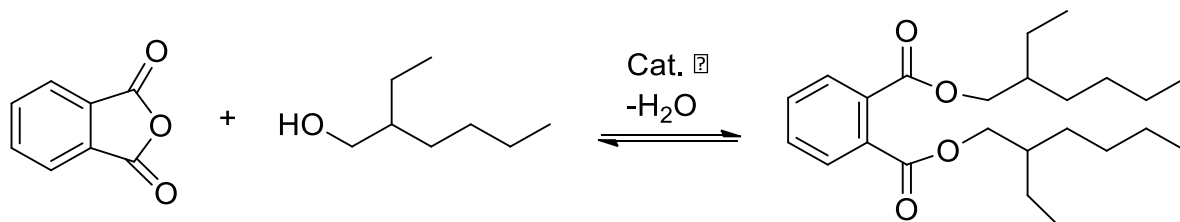


Figura 4. Estructura del di-2-etilhexilftalato (DEHP)

La producción industrial de este compuesto se ha llevado a cabo a través del anhídrido ftálico con 2-etilhexanol. La esterificación ocurre en dos etapas. La primera etapa es muy rápida y puede ser llevada a cabo en ausencia del catalizador. Sin embargo, la esterificación del segundo grupo carboxílico es muy lenta y necesita ser ayudada por un catalizador ácido. El Di-2-etilhexilftalato (DEHP) se obtiene después de la remoción del agua de la mezcla de reacción, como se muestra en el esquema 1.



Esquema 1. Síntesis del DEHP

La síntesis parece simple; sin embargo, existen varios estudios acerca de qué catalizador es más conveniente y apropiado para obtener los mejores rendimientos. El ácido sulfúrico, el ácido metano sulfónico y el ácido *p*-tolueno sulfónico han sido entre otros algunos de los catalizadores homogéneos más utilizados. El ácido sulfúrico es un ácido fuerte y ha sido uno de los más empleados tanto en el laboratorio como en la industria. Sin embargo, la generación de subproductos ha guiado a reemplazarlo por el ácido *p*-tolueno sulfónico que es un catalizador menos activo, pero menos agresivo. Las aplicaciones de estos catalizadores causan algunos problemas como corrosión, la pérdida del catalizador y problemas ambientales. Por esta razón

se ha tratado de realizar estudios acerca de qué catalizador podría ser el más efectivo²⁰.

2.4 Compuestos indólicos

El fragmento de triptamida tiazol o tiazolina es clásico de los compuestos bacillamidas²¹ (Figura 5). Estos compuestos tienen múltiples actividades biológicas, por ejemplo, la bacillamida A y sus derivados poseen una actividad alguicida sustancial contra un amplio rango de algas dinoflageladas²². Es interesante notar que las bacillamidas A-E contienen un bloque común de triptamina en sus estructuras mientras que en la neobacillamida A la porción de amina es reemplazada por el grupo de fenetilamina²³. Investigar los bloques de construcción o los intermediarios de las bacillamidas²⁴ es esencial para su producción en masa e incluso para su síntesis orgánica²⁵.

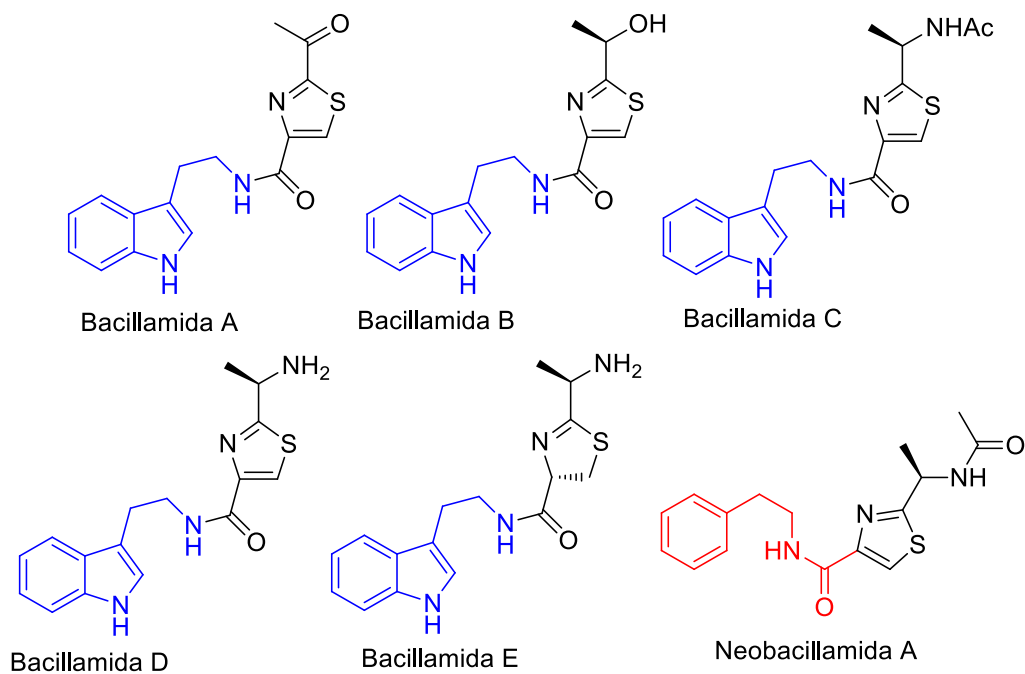


Figura 5. Estructuras de las bacillamidas conteniendo los grupos de triptamina (azul) y fenetilamina (rojo).

3- OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Estudio y caracterización de los productos naturales de origen microbiano producidos por *Bacillus thuringiensis*.

3.2 Objetivos Particulares

1. Obtención de un extracto crudo a partir de acetato de etilo de la cepa *Bacillus thuringiensis* ELI52.
2. Fraccionamiento del extracto crudo mediante cromatografía en columna.
3. Aislamiento y purificación de los compuestos y la elucidación estructural mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas.
4. Pruebas biológicas de los compuestos contra bacterias patógenas y hongos fitopatógenos.

4- DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1 Obtención y fraccionamiento del extracto crudo

Para el crecimiento de la cepa *B. thuringiensis* ELI 52 se tomó una colonia y se inoculó en medio líquido LB incubándose a 29°C durante 7 días con una agitación constante de 175 rpm. Posteriormente se centrifugó el caldo a 6000 rpm durante 15 min, obteniéndose el cultivo sin células para su posterior extracción.

Con el líquido se realizó una extracción con acetato de etilo (AcOEt) en una relación de volumen 1:1 por triplicado obteniendo finalmente un extracto crudo de olor penetrante y un color amarillo-marrón con un rendimiento de 200 mg/L (Figura 6).



Figura 6. Extracto crudo de la cepa *Bacillus thuringiensis* ELI 52

Este extracto se tuvo que obtener varias veces de varios litros para tener una cantidad apropiada para optimizar su separación.

La separación del extracto crudo y purificación se realizó mediante una cromatografía en columna utilizando eluyentes que fueron variando desde una baja polaridad hasta una polaridad mayor (Tabla 1).

Tabla 1. Eluyentes utilizados para el fraccionamiento general

Eluyentes	Proporción %
Hexano	100
Hexano: AcOEt	80:20
Hexano: AcOEt	50:50

AcOEt	100
AcOEt:DCM	50:50
DCM	100
DCM:MeOH	80:20
DCM:MeOH	50:50
DCM:MeOH	20:80
MeOH	100

AcOEt: Acetato de etilo, DCM: Diclorometano, MeOH: Metanol

Se recolectaron diferentes fracciones que se pesan para obtener cada uno de los pesos y así saber qué cantidad se obtuvo de cada uno de ellos (Figura 7).

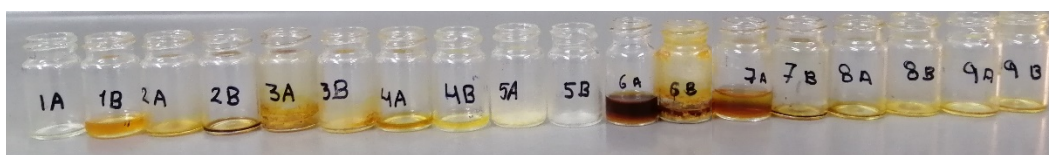


Figura 7. Cada una de las fracciones evaporadas se coloca en viales

Se realizó cromatografía en placa fina para poder hacer reuniones de fracciones (Tabla 2).

Tabla 2. Reuniones resultantes posterior a la elución en CPF

Reunión	Nombre de la fracción
1A+1B	1
2A+2B	2
3A	3A
3B	3B
4A+4B	4
5A+5B	5
6A+6B	6A
7A+7B+8A+8B+9A+9B	7A

4.2 Purificación de las fracciones obtenidas

Fracción 1

La fracción 1 tenía una banda que aparecía limpia y se procedió a su purificación mediante una mini columna y con un sistema móvil de hexano-AcOEt (9:1). De esta fracción se pudo aislar, purificar e identificar el compuesto **1** como un líquido viscoso, incoloro e inodoro.

Fracción 4

Esta fracción 4 fue obtenida con un sistema AcOEt:DCM 50:50 y posteriormente se realizaron purificaciones subsiguientes, obteniendo el compuesto **2** puro.

Fracción 6A

Esta fracción 6A fue obtenida con un sistema de DCM:MeOH 80:20 y posteriormente se realizaron purificaciones subsiguientes, obteniendo como resultado el compuesto **3** puro.

Fracción 7A

Para purificar la fracción 7A se utilizaron sistemas DCM:MeOH. Los compuestos **4** y **5** provienen de la fracción 7^a.

4.3 Caracterización de los compuestos

Fracción 1 (compuesto 1)

Se obtuvo el espectro de masas de alta resolución resultando en un peso molecular de 390.2779 g/mol obteniéndose una fórmula química de $C_{24}H_{38}O_4$, tal y como se muestra en la figura 8.

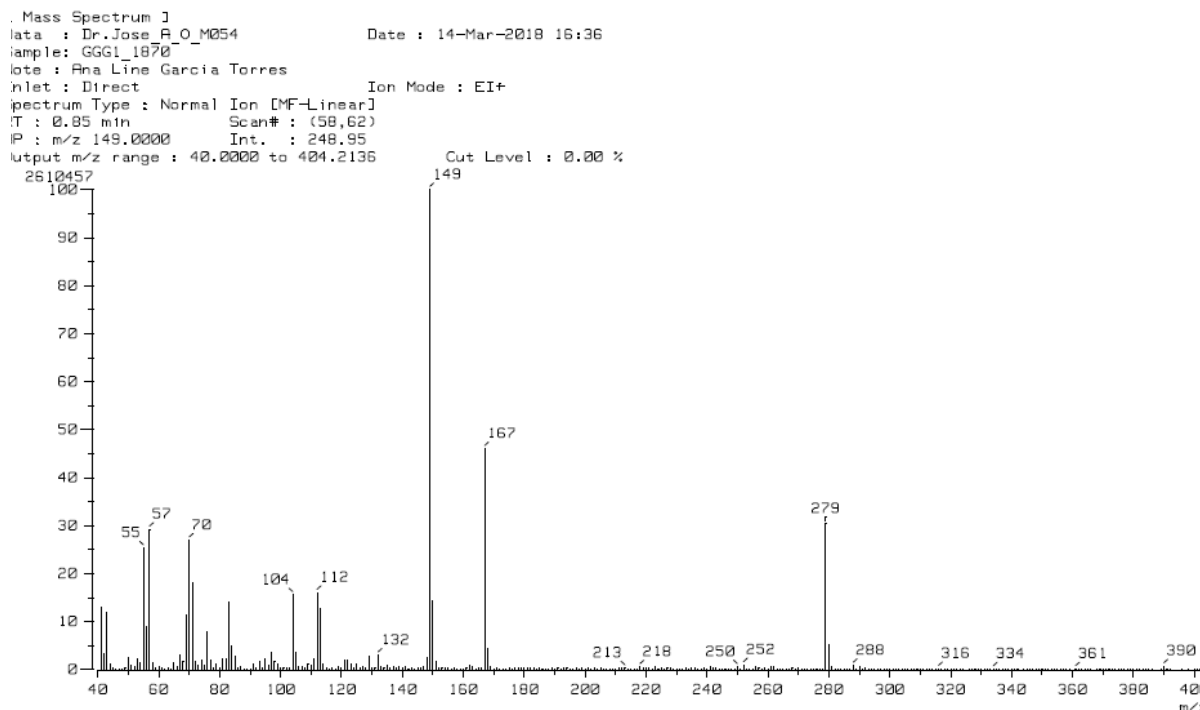


Figura 8. Espectrometría de masas por impacto electrónico (EI-MS) del compuesto 1.

Con el siguiente cálculo para el número de insaturaciones $\frac{(2a+2)-b}{2}$ donde C_aH_b , se obtuvieron 6 insaturaciones.

Se obtuvo el espectro de infrarrojo donde destacan las bandas en 2963.4, 2927.6, 2861.0, 1718.4, 1465.1, 1271.6, 1120.8, 1066.0 y 739.9 cm^{-1} , como se observa en la figura 9.

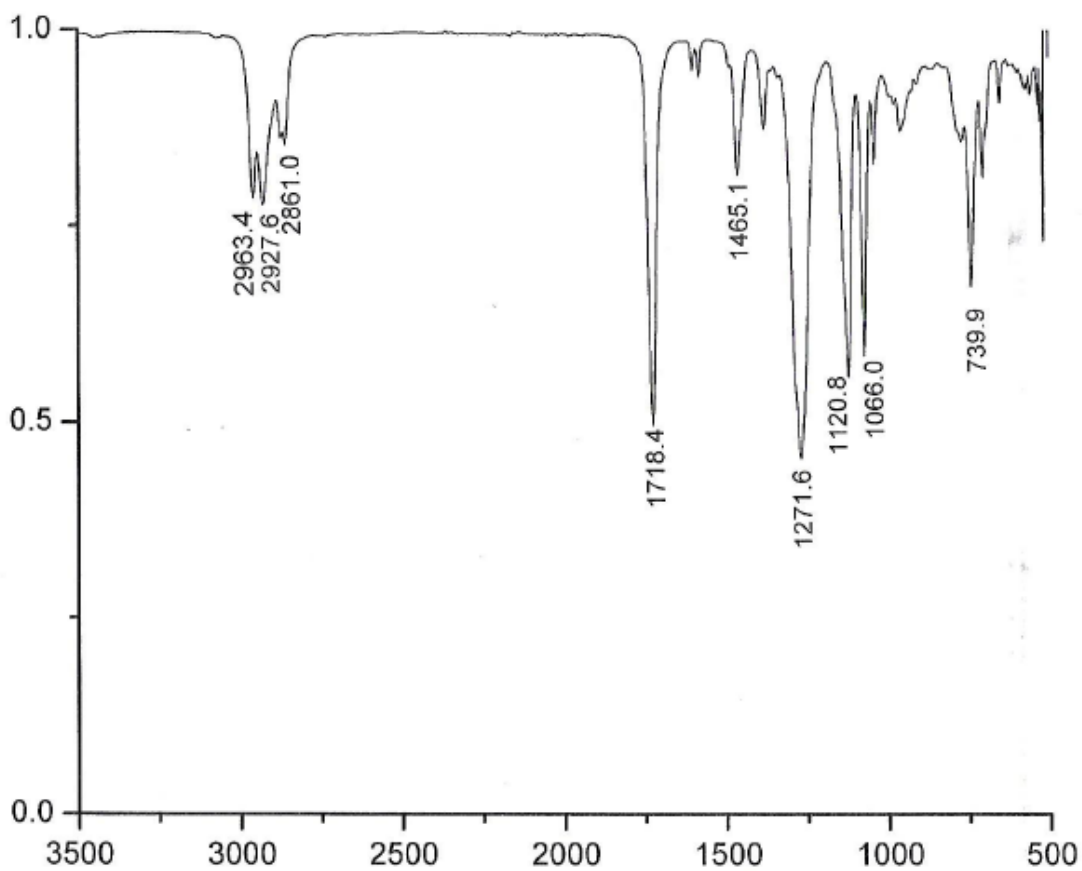


Figura 9. Espectro de IR del compuesto 1

El espectro de RMN ^1H 500 MHz en CDCl_3 del compuesto 1 muestra dos señales dobles de dobles en 7.71 ppm y 7.54 ppm que integran para un protón cada una con constantes de acoplamiento $J = 3.0, 6.0$ Hz y que corresponden a los protones aromáticos. También hay una señal doble de dobles en 4.24 ppm y que integra para un hidrógeno H_a y otra señal doble de dobles en 4.20 ppm que integra para un hidrógeno H_b con constantes de acoplamiento $J = 6.0, 11.0$ Hz, ambos diastereotópicos, que pertenecen al grupo metileno unido a un oxígeno. Que estos hidrógenos sean diastereotópicos significa que tiene un centro quiral adyacente. En 1.69 ppm se observa una señal séptuple con constante de acoplamiento $J = 6.0$ Hz que integra para un hidrógeno, tal y como se muestra en la figura 10.

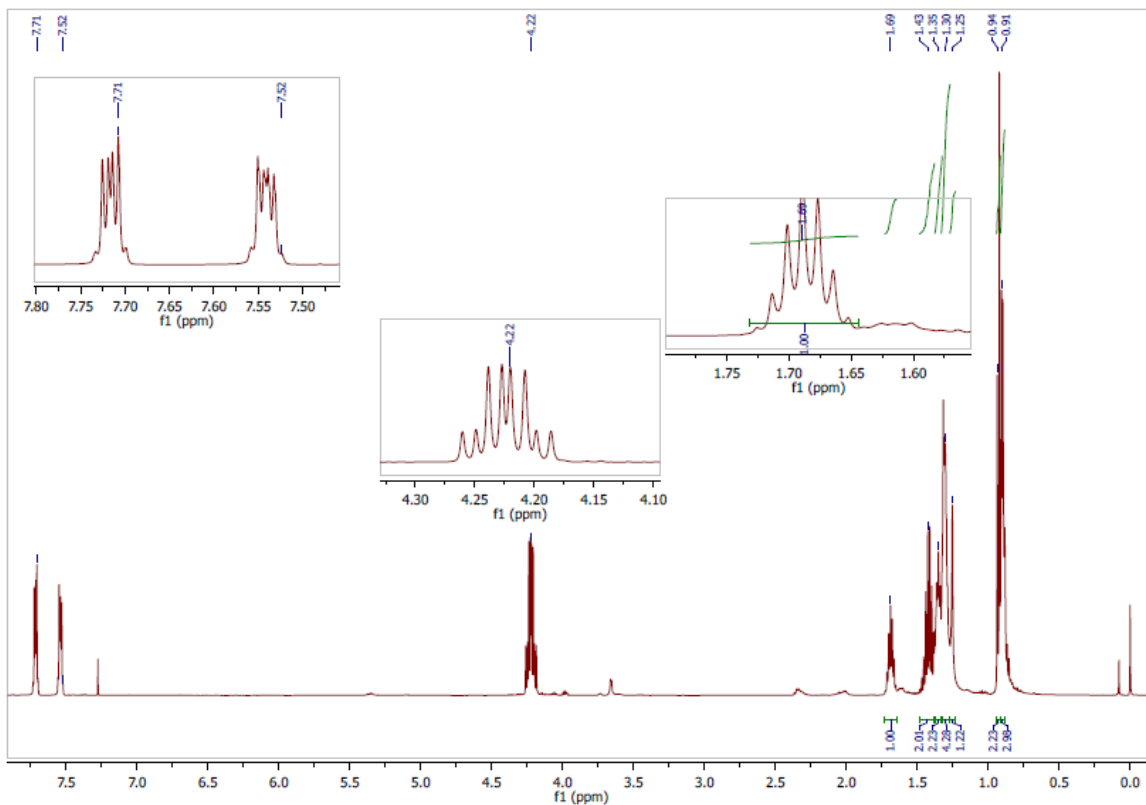


Figura 10. Espectro de RMN ^1H a 500 MHz en CDCl_3 del compuesto **1**

En el espectro de RMN de ^{13}C se destacan las señales en 167.8 ppm correspondiente a un carbonilo y en 68.1 ppm correspondiente a un metileno unido a un oxígeno, como se observa en la figura 11.

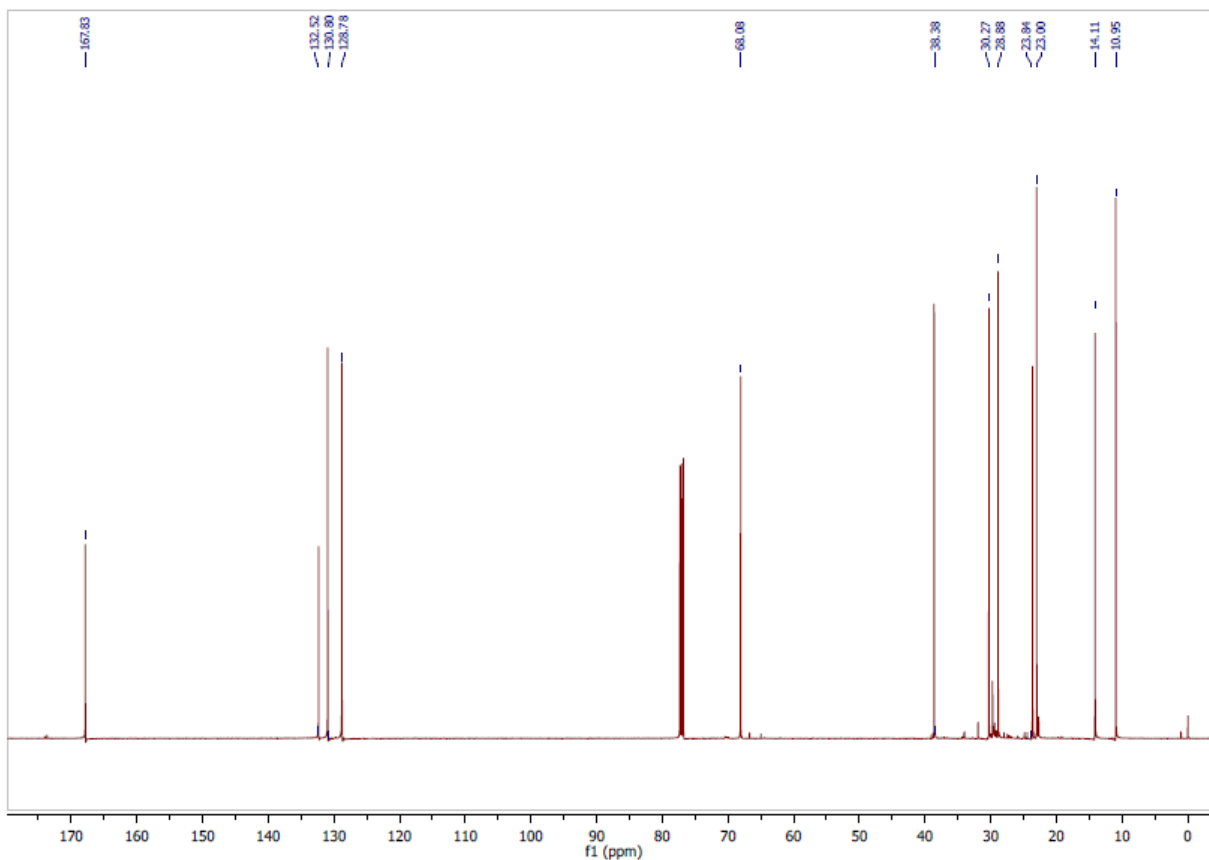


Figura 11. Espectro de RMN ^{13}C a 125 MHz en CDCl_3 del compuesto **1**

Además, se obtuvieron los espectros de dos dimensiones COSY, HSQC y DEPT para ir asignando correctamente las señales e ir correlacionando los hidrógenos y los carbonos, como se observa en las figuras 12, 13 y 14.

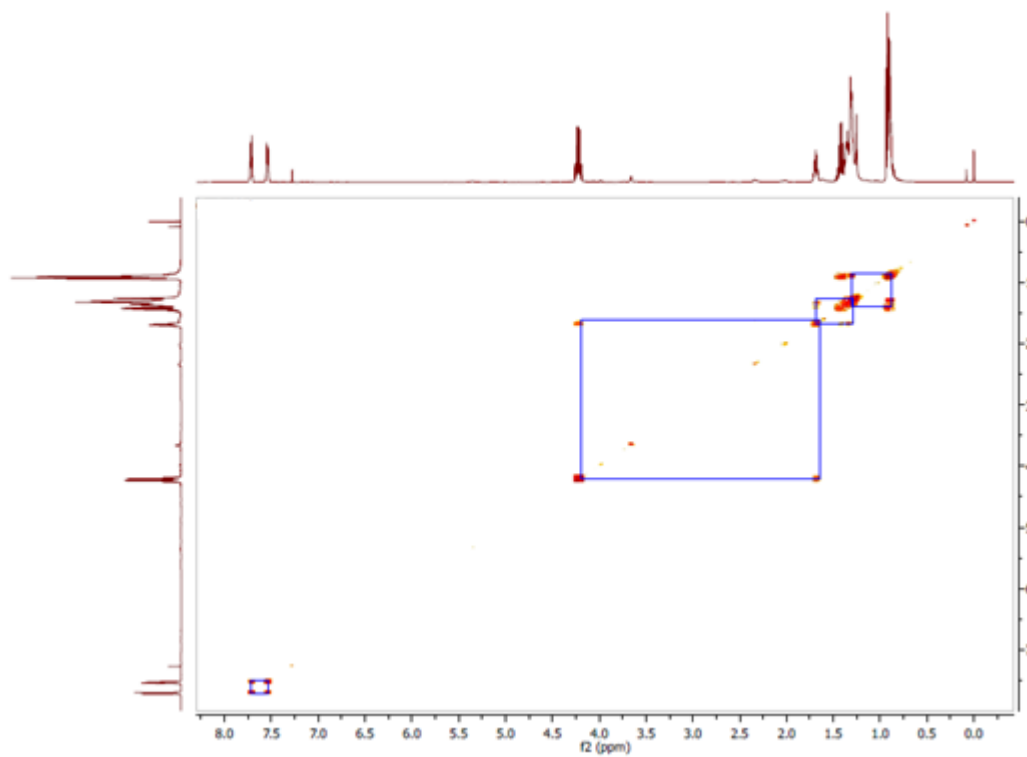


Figura 12. Espectro 2D COSY en CDCl_3 del compuesto 1

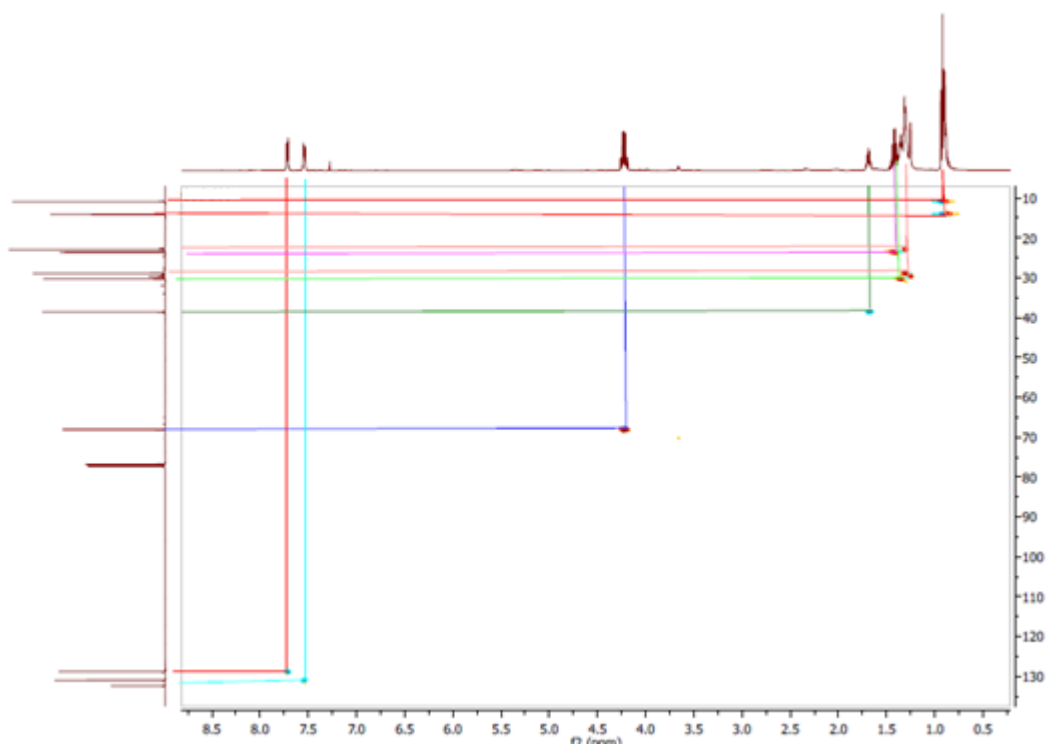


Figura 13. Espectro 2D HSQC en CDCl_3 del compuesto 1

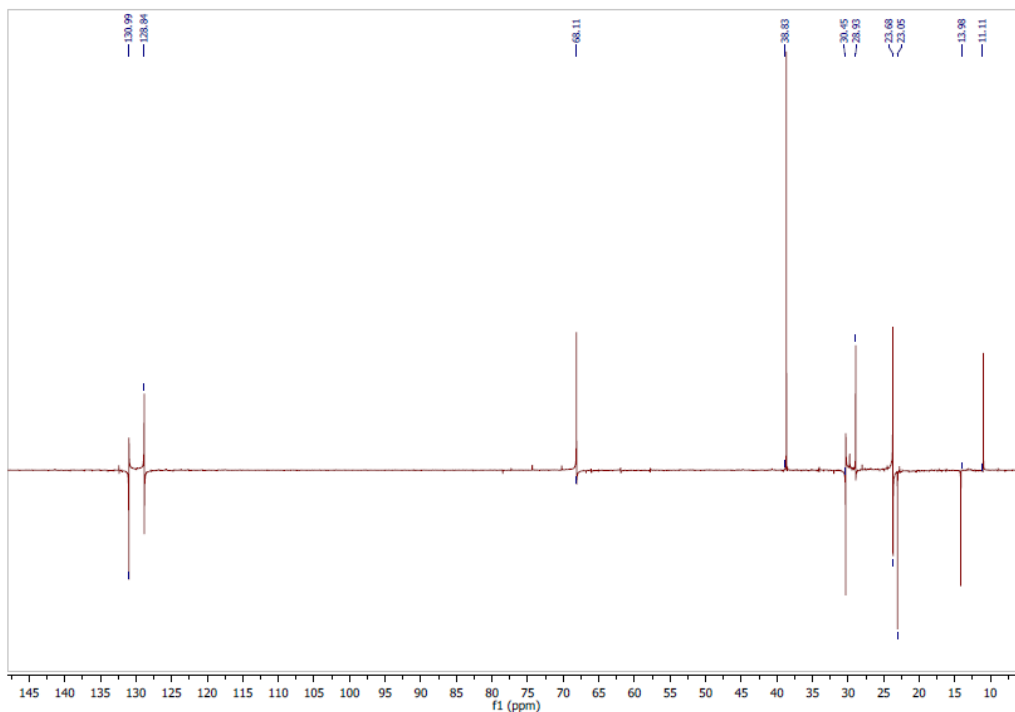


Figura 14. Espectro RMN DEPT en CDCl_3 del compuesto **1**

De acuerdo con todos los datos espectroscópicos recopilados se asignaron los carbonos y protones en la estructura del compuesto como se indica en la Tabla 3. Recopilando el conjunto de todos los datos, se llega a la conclusión que la estructura tiene que ser simétrica y que corresponde al Ftalato de bis-(2-etilhexilo) (Figura 15).

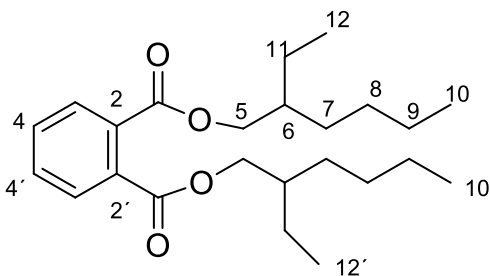


Figura 15. Estructura de Ftalato de bis-(2-etilhexilo).

Tabla 3. Asignación de señales RMN de ^{13}C e ^1H de Ftalato de bis-(2-etilhexilo).

C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$
1	167.8 (C=O)	

2	132.5 (Cq)	
3	128.8	7.71 (1H, dd, $J = 3.0, 6.0$ Hz)
4	130.8	7.54 (1H, dd, $J = 3.0, 6.0$ Hz)
5	68.1	4.24 (1H, dd, $J = 6.0, 11.0$ Hz)
5	68.1	4.20 (1H, dd, $J = 6.0, 11.0$ Hz)
6	38.4	1.69 (1H, septuplete, $J = 6.0$ Hz)
7	30.1	1.35 (2H, t, $J = 6.0$ Hz)
8	28.9	1.30 (2H, m)
9	23.0	1.30 (2H, m)
10	14.0	0.90 (3H, d, $J = 7.5$ Hz)
11	23.8	1.42 (2H, dd, $J = 7.5, 7.0$ Hz)
12	10.8	0.93 (3H, d, $J = 7.5, 7.0$ Hz)

Debido a la quiralidad del compuesto **1** se le determinó su rotación óptica, obteniéndose un resultado de $[\alpha]_D^{24} = -17.1$ (c 1.15, Hex) lo cual sugiere una configuración absoluta de *R* por comparación de datos en la literatura²⁶. Con todos los datos el compuesto fue identificado como Ftalato de bis-(2*R*-etilhexilo).

Se sabe poco sobre la ruta biosintética de este compuesto, sin embargo, en un estudio realizado con di-*n*-butil ftalato (DBP) (Figura 16) se demuestra la producción biológica mediante la ruta del ácido shikímico.²⁷

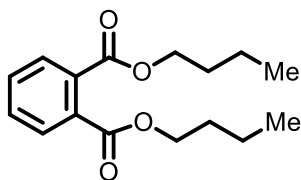


Figura 16. Estructura del di-*n*-butil ftalato (DBP)

Para corroborar que el ftalato, debido a su naturaleza de ser un componente de plásticos, no proviniera de algún material de este tipo utilizado en la industria (envases de los medios de cultivo o disolventes), se procedió a realizar un cultivo en idénticas condiciones, pero sin la presencia de bacterias como un control. El extracto crudo del medio de cultivo sin células obtenido se llevó a RMN de ^1H

(Figura 17) y se corroboró la ausencia del compuesto ftalato, debido a la ausencia de las señales características del compuesto señaladas en la Tabla 3, concluyendo que era sintetizado por la propia bacteria.

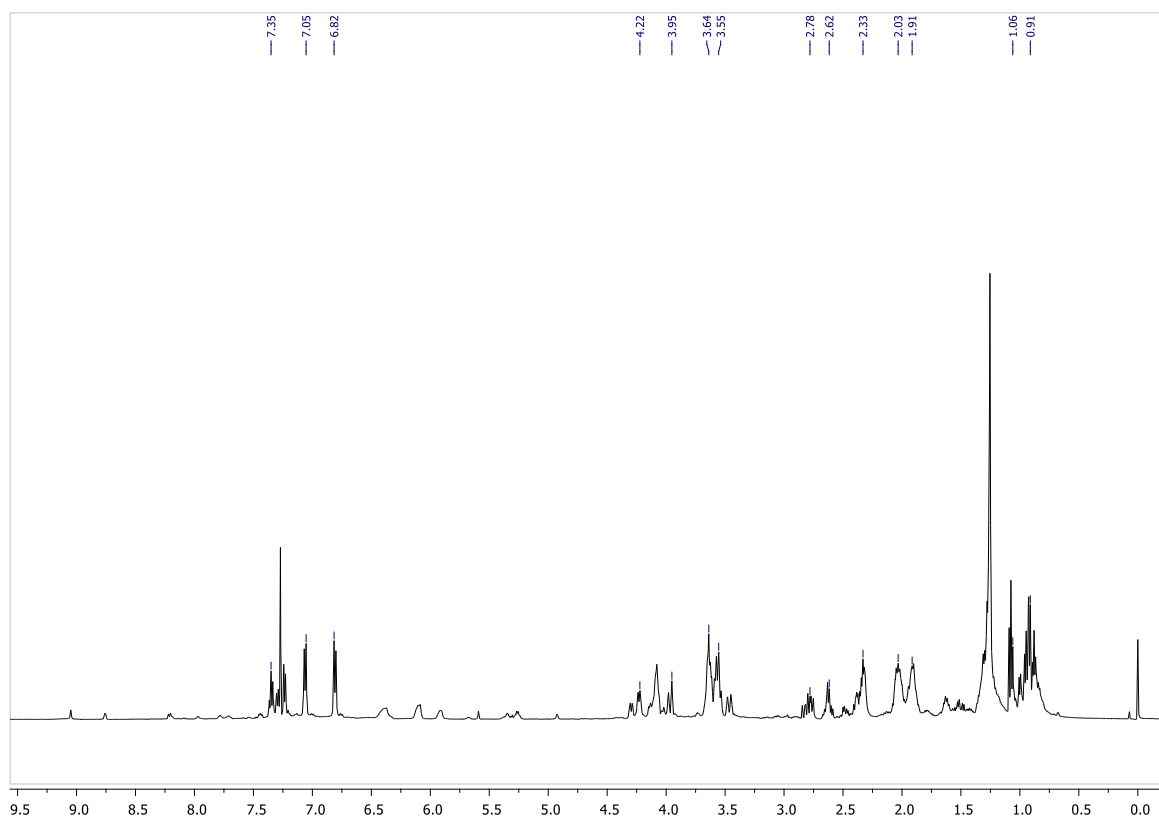


Figura 17. Espectro de RMN ^1H a 500 MHz en CDCl_3 del medio de cultivo sin células

Fracción 4 (Compuesto 2)

Se procedió a realizar los análisis espectroscópicos del compuesto **2** como el espectro de infrarrojo del compuesto **2** (figura 18).

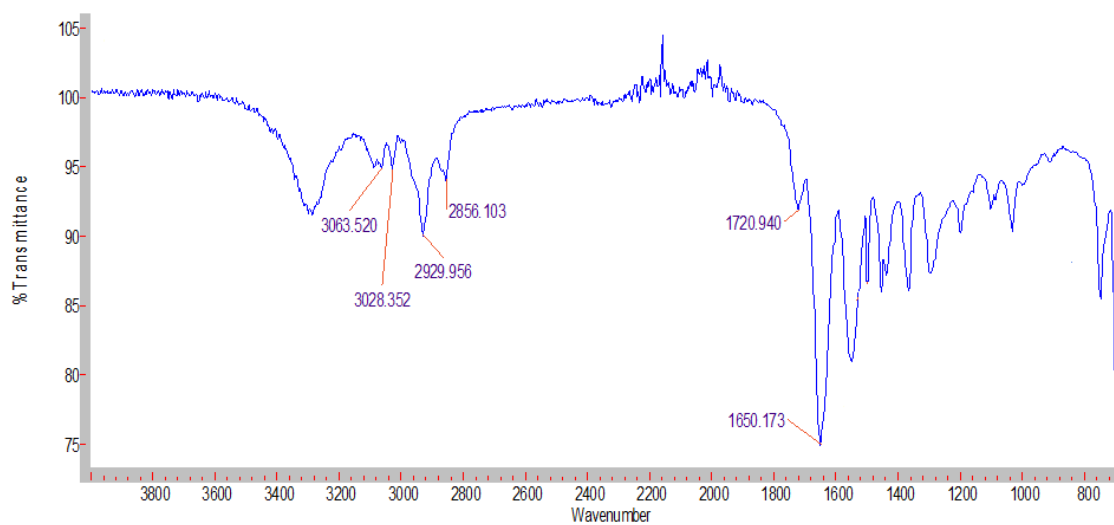


Figura 18. Espectro de IR del compuesto **2**.

Se obtuvieron los espectros de resonancia magnética nuclear de ^1H a 500 MHz en CDCl_3 y se procedió a su análisis como se muestra en la figura 19.

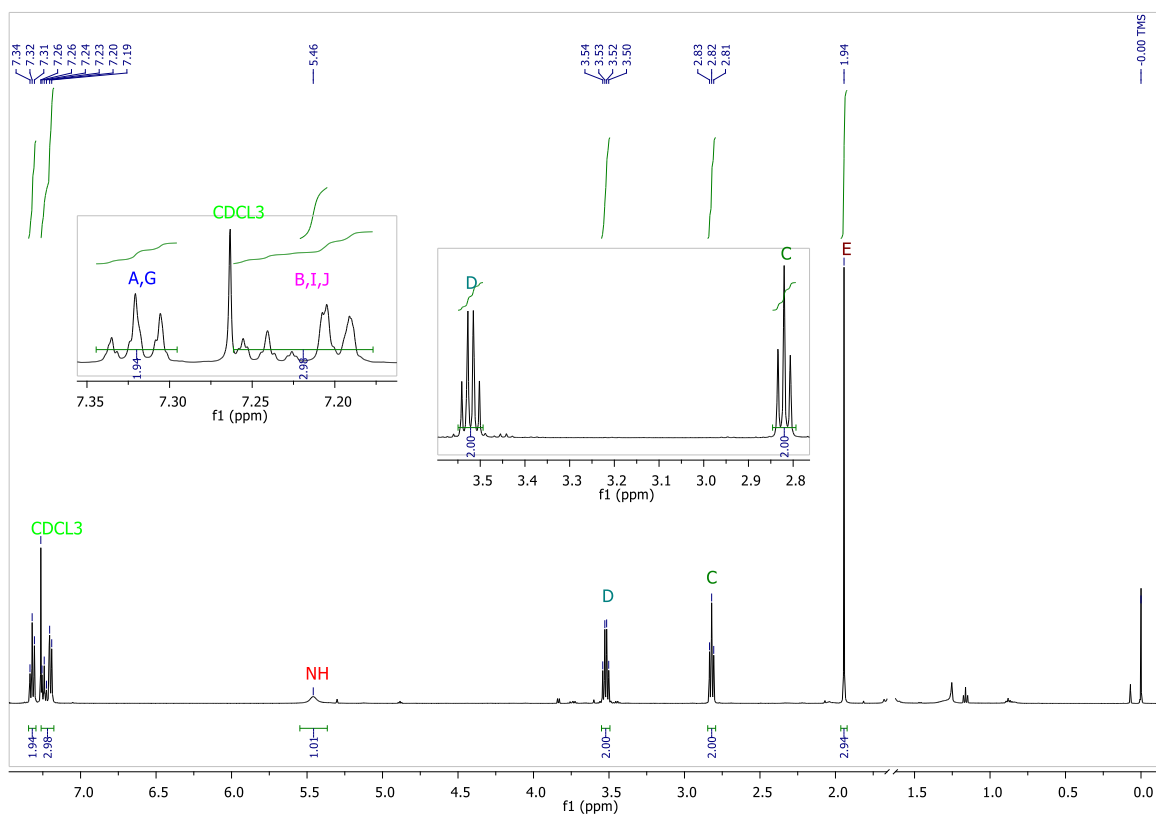


Figura 19. Espectro RMN de ^1H a 500 MHz en CDCl_3 del compuesto **2**.

Para una mejor asignación de los hidrógenos se obtiene el espectro de RMN 2D COSY (figura 20).

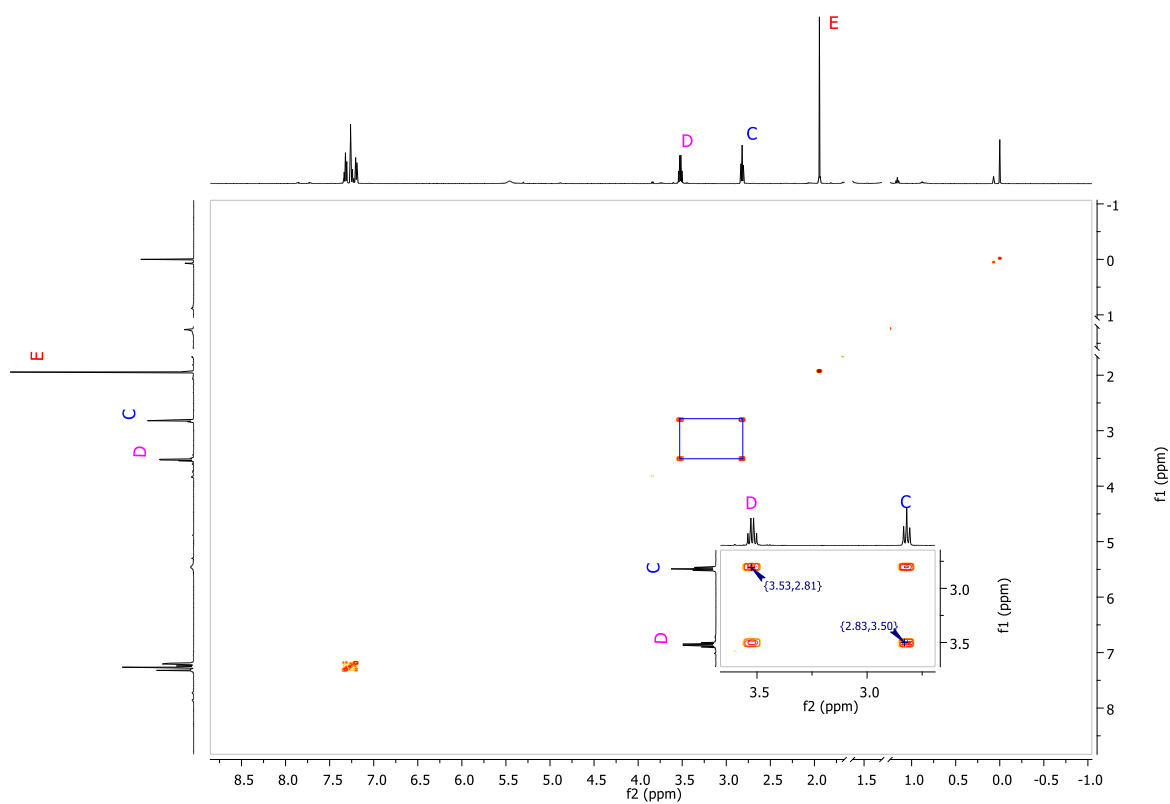


Figura 20. Espectro RMN 2D COSY del compuesto **2**.

También se obtiene un espectro de ^{13}C a 125 MHz del compuesto **2**, como se observa en la Figura 21.

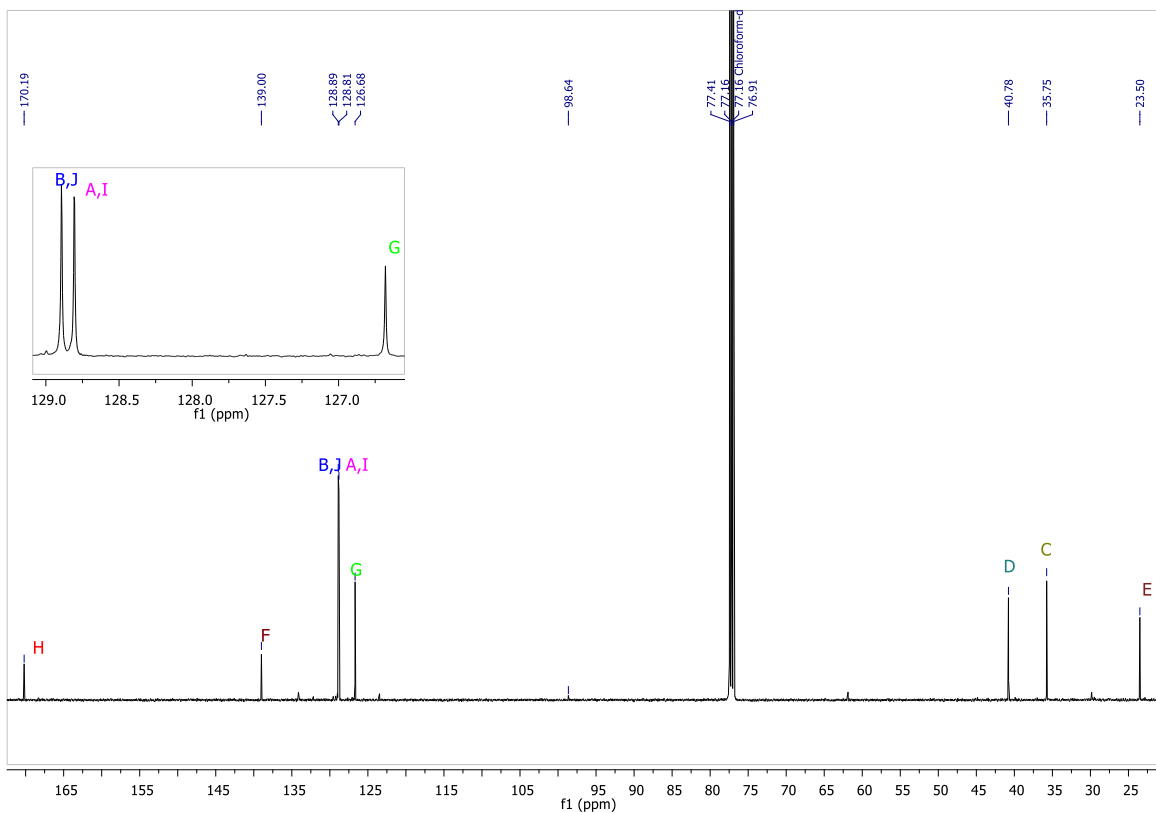


Figura 21. Espectro RMN ^{13}C A 125 MHz en CDCl_3 del compuesto **2**.

En la figura 22 se observa el espectro que se obtuvo de 2D HSQC del compuesto **2**, esto con la finalidad de asignar los carbonos e hidrógenos inequívocamente.

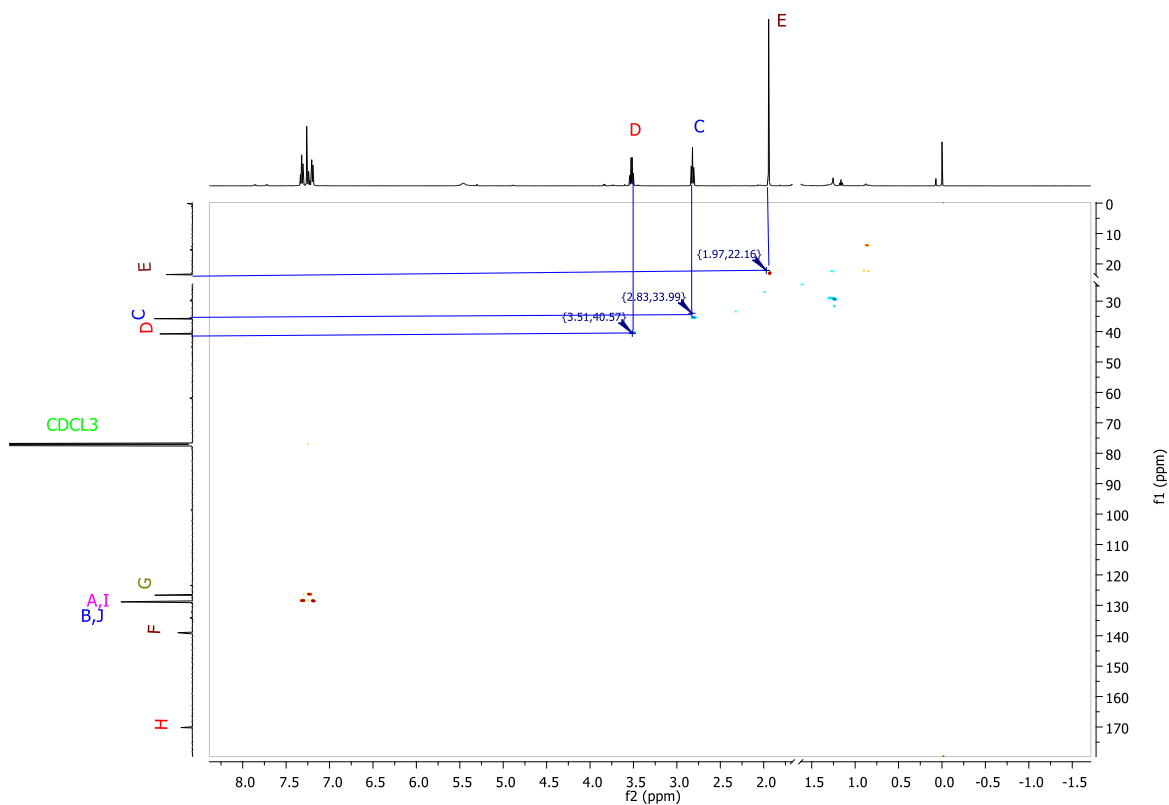


Figura 22. Espectro RMN 2D HSQC del compuesto **2**.

En la siguiente tabla 4 se resumen las señales de RMN ^1H y ^{13}C .

Tabla 4. Señales de los espectros del compuesto **2**.

Correlación	
Señal ^1H ppm	Señal ^{13}C ppm
1.94	23.0
2.82	35.2
3.52	40.3
5.46	----
77.23	128.4 y 128.3
77.32	128.3 y 126.2
----	138.5
----	169.7

Como un último dato se obtuvo un espectro DEPT 135 experimento de ^{13}C de RMN, para establecer que señales correspondían a CH_3 , CH_2 y CH .

La estructura que se propone para el **compuesto 2** se muestra en la figura 23, el nombre que se le asigna es *N-fenetilacetamida*.

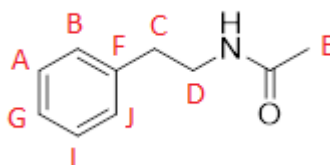


Figura 23. *N-fenetilacetamida*

Fracción 6A (Compuesto 3)

A continuación, se muestra el espectro de infrarrojo del compuesto **3** (Figura 24).



Figura 24. Espectro de IR del compuesto **3**.

Se obtiene un espectro de RMN ^1H a 500 MHz en CDCl_3 el cual se muestra en la figura 25.

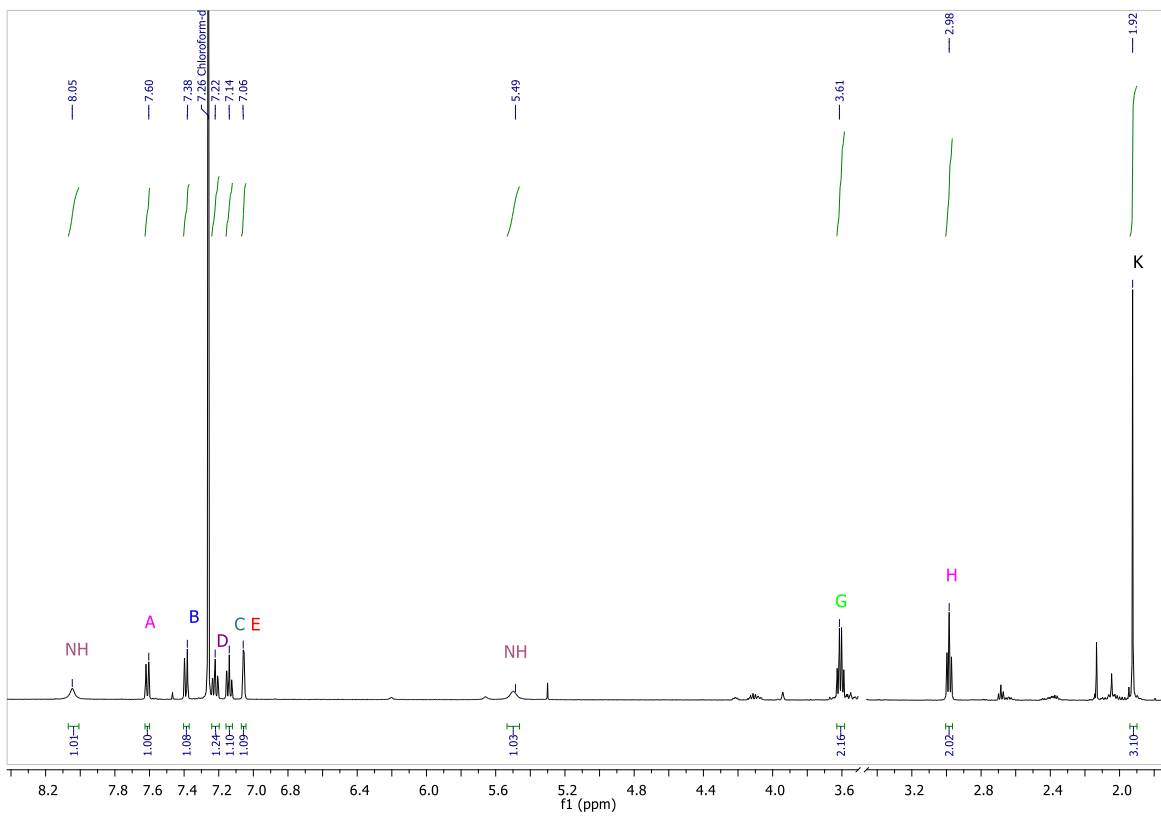


Figura 25. Espectro RMN de ^1H a 500 MHz en CDCl_3 del compuesto **3**.

En el espectro obtenido se observa una señal ancha en 8.05 ppm. En 7.60 ppm se observa una señal doble. Se procede a obtener un espectro 2D COSY con el fin de poder correlacionar los hidrógenos del compuesto, como se observa en la figura 26.

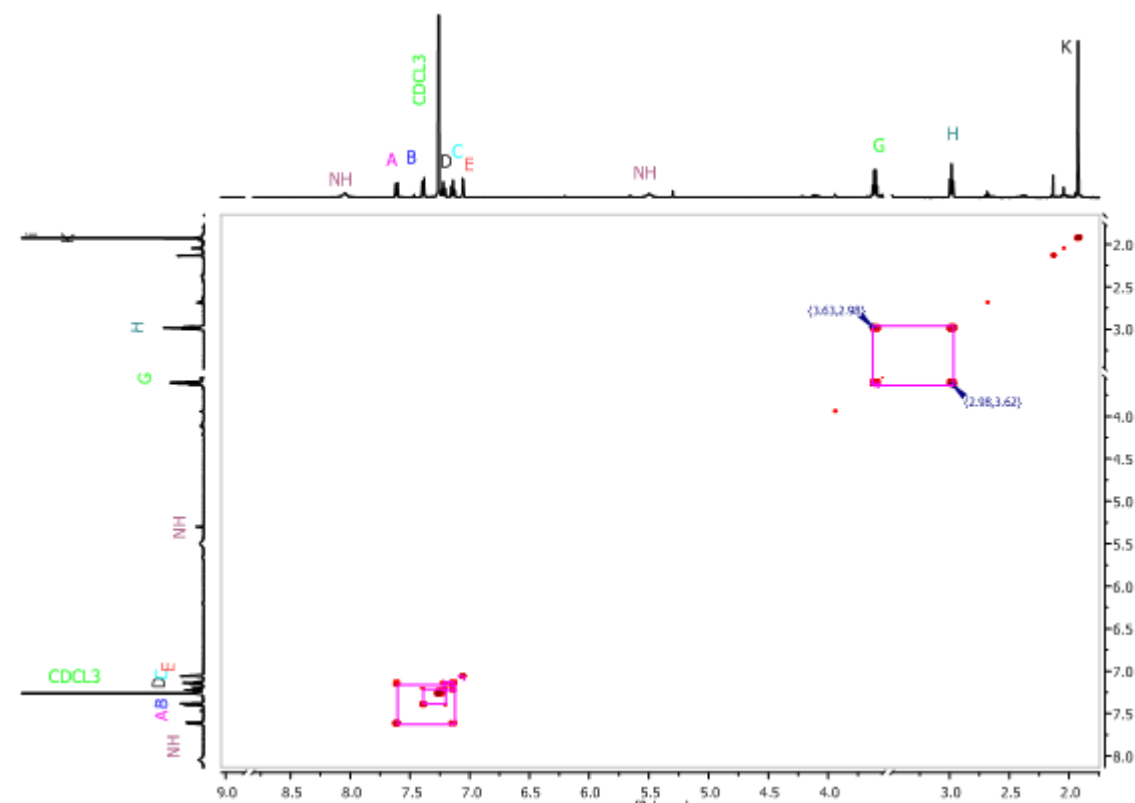


Figura 26. Espectro RMN 2D COSY del compuesto **3**.

También se obtuvo el espectro de RMN de ^{13}C del compuesto **3** (Figura 27).

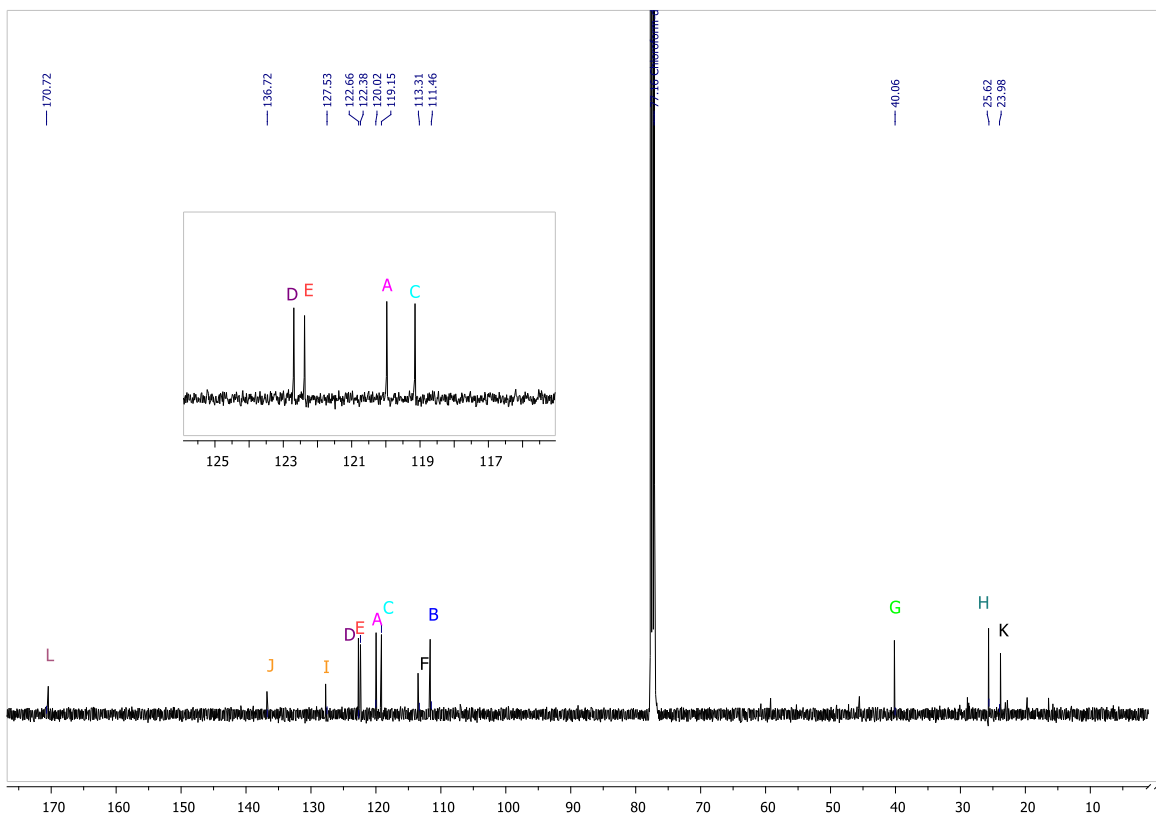


Figura 27. Espectro RMN de ^{13}C a 125 MHz en CDCl_3 del compuesto **3**.

Para saber la correlación existente entre los carbono e hidrógenos se obtiene un espectro RMN 2D HSQC del compuesto **3** (figura 28).

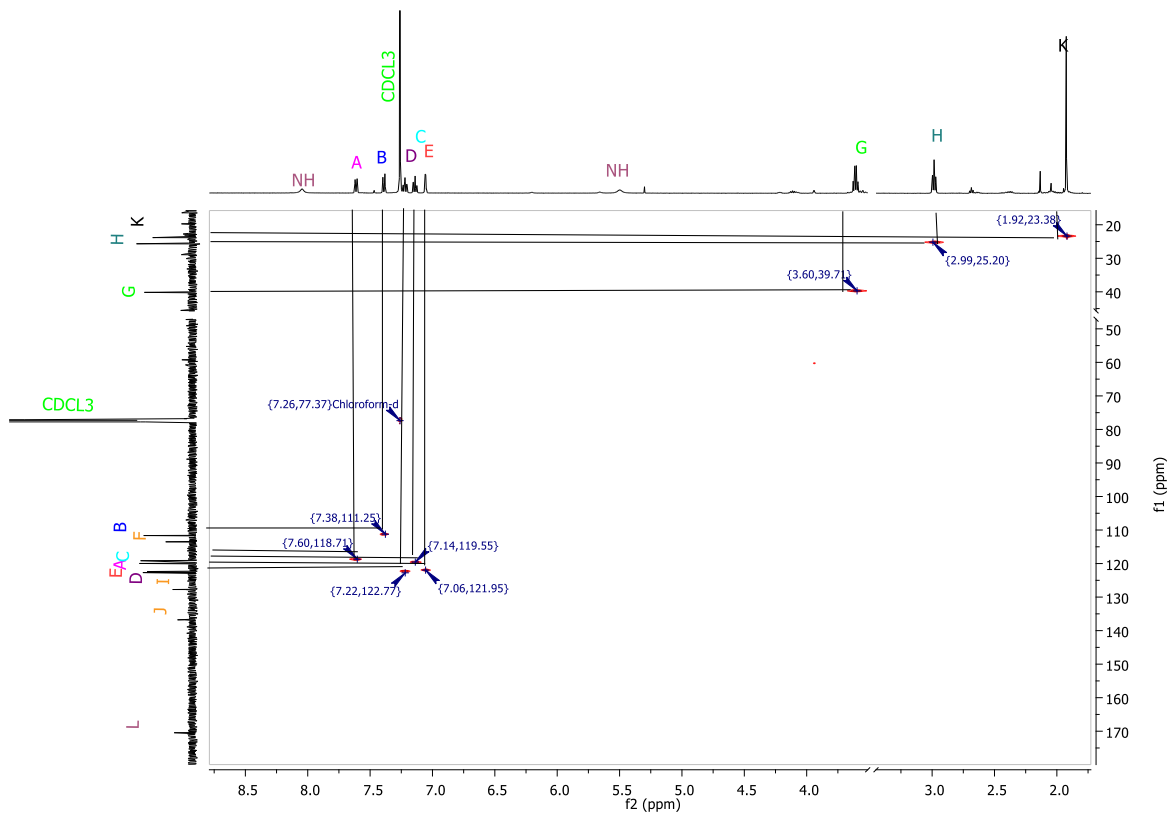


Figura 28. Espectro RMN 2D HSQC del compuesto **3**.

En la tabla 5 se muestra un resumen de la correlación existente entre las señales de RMN ^1H y ^{13}C .

Tabla 5. Señales de los espectros del compuesto **3**.

Correlación	
Señal ^1H ppm	Señal ^{13}C ppm
8.05	----
7.60	120.0
7.38	111.4
7.22	122.6
7.14	119.2
7.06	122.3
5.49	----
3.61	40.0
2.98	25.6
1.92	23.9
----	170.7

----	136.7
----	127.5
----	113.3

Como un último dato se obtuvo un análisis de RMN, un espectro DEPT 135, para establecer que señales correspondían a CH₃, CH₂ y CH.

La estructura del compuesto **3** es la que se muestra en la figura 29 y el compuesto se llamado *N*-(2-(1*H*-indol-3-il)etil)acetamida o también conocida como *N*-acetil triptamina.

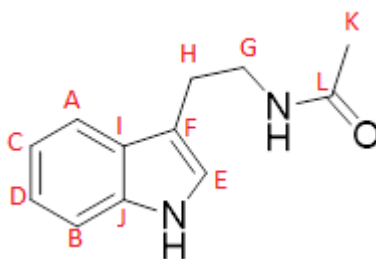


Figura 29. *N*-(2-(1*H*-indol-3-il)etil)acetamida

Fracción 7A (Compuestos 4 y 5)

En esta fracción se logró la purificación de los compuestos **4** y **5**. En la figura 30 se observa el espectro de infrarrojo del compuesto **4**.

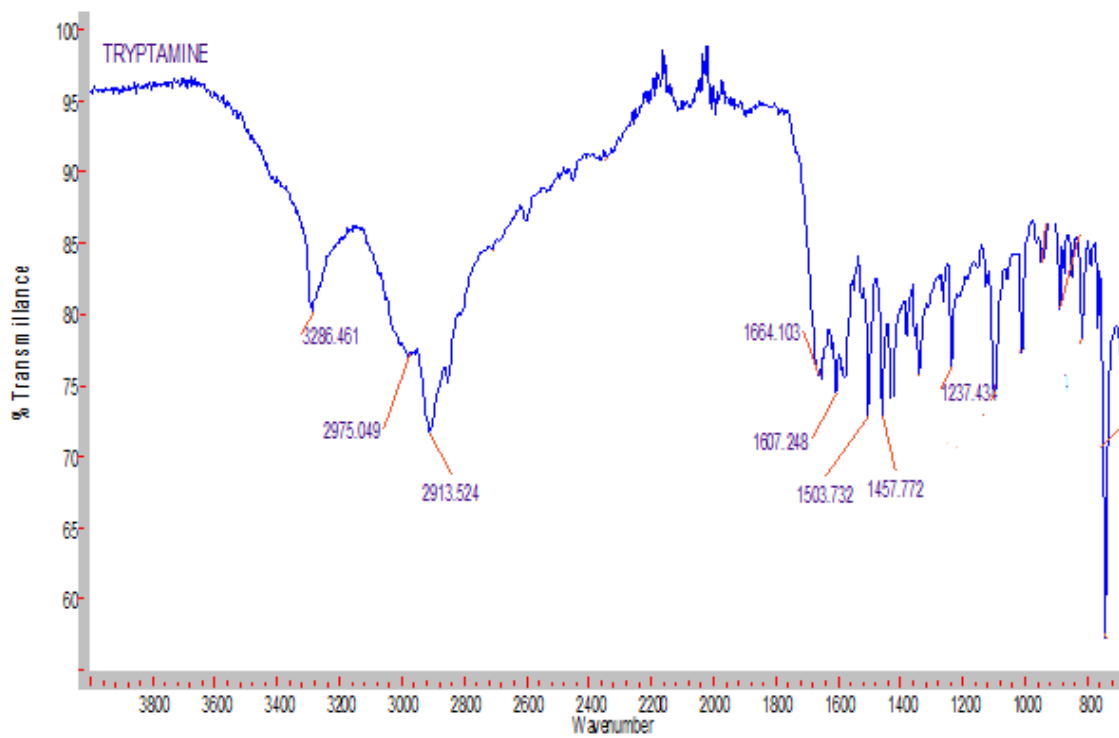


Figura 30. Espectro de IR del compuesto **4**.

Se obtuvieron espectros de resonancia magnética nuclear de ^1H a 500 MHz en D_2O y se procedió a su análisis como se muestra en la figura 31.

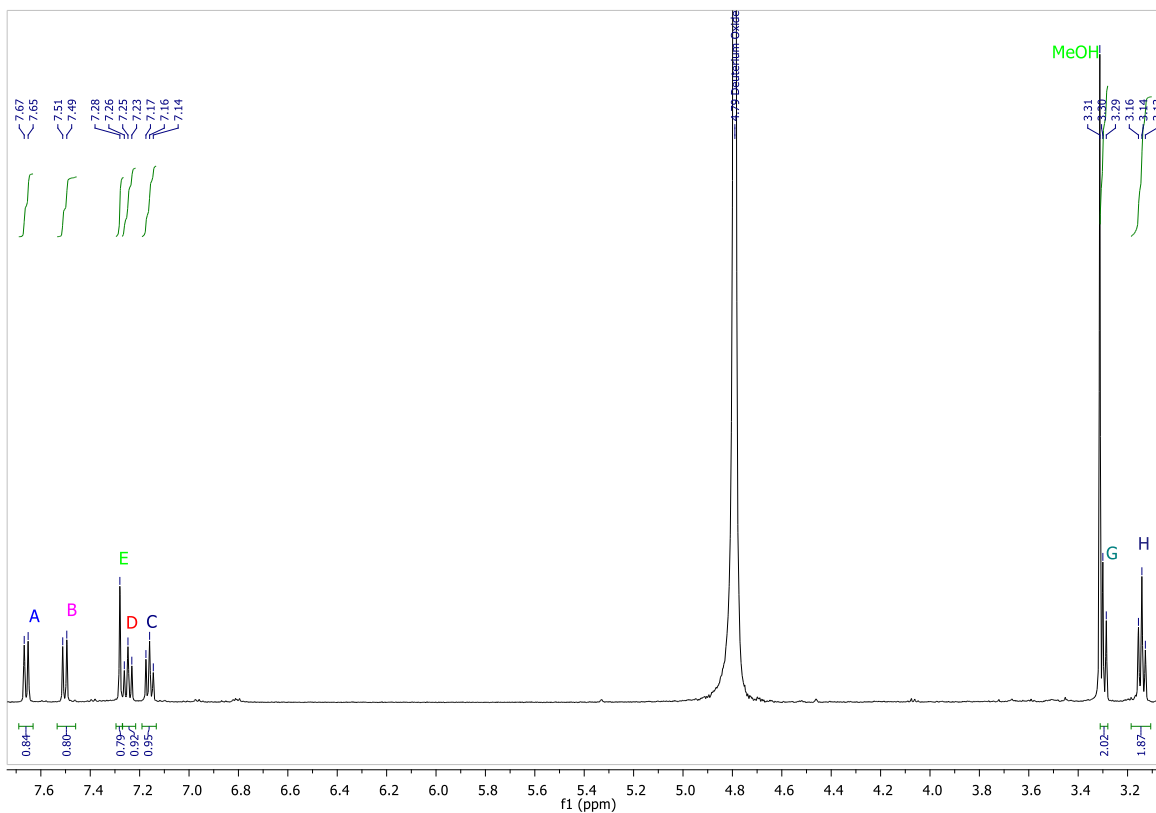


Figura 31. Espectro de ¹H a 500 MHz en D₂O del compuesto **4**.

Se observa una señal doble en 7.67 ppm que integra para un hidrógeno, la señal que se encuentra en 7.51 ppm, es una señal doble que integra para un hidrógeno. En 7.28 ppm se encuentra una señal simple. En 7.25 y 7.16 ppm se observan dos señales triples. En 3.29 y 3.14 ppm se encuentran dos señales triples que integran para dos hidrógenos cada una. Se obtiene también el espectro 2D COSY del compuesto **4** para asignar correctamente los hidrógenos de la molécula (figura 32).

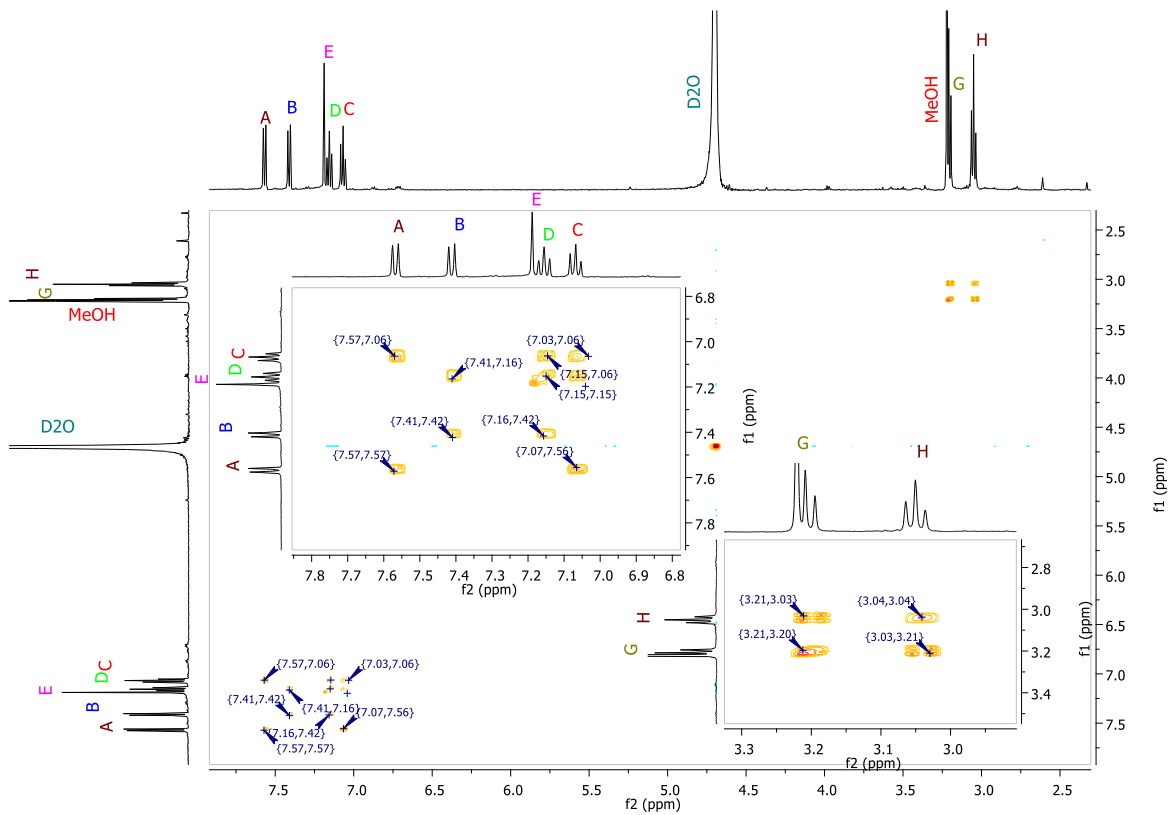


Figura 32. Espectro RMN 2D COSY del compuesto 4.

Se obtuvo el espectro de RMN de ¹³C del compuesto 4 (Figura 33).

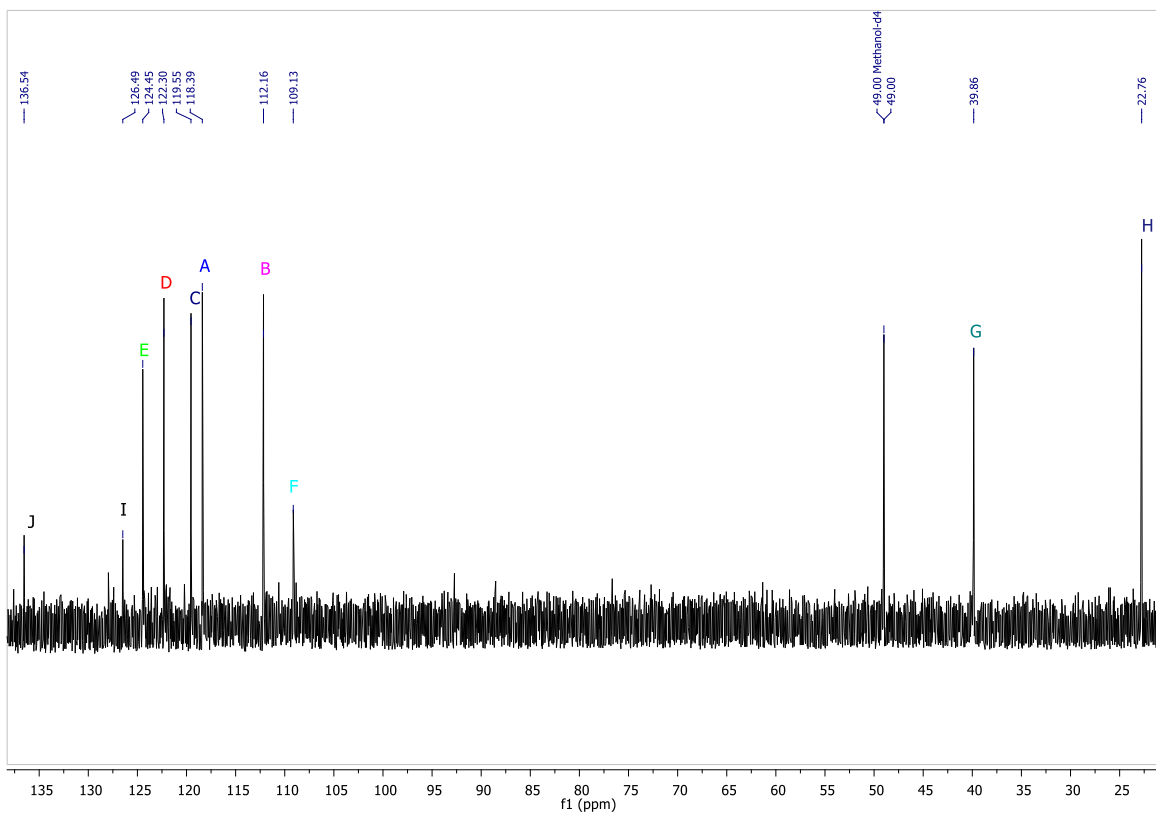


Figura 33. Espectro RMN ^{13}C de 125 MHz en D_2O del compuesto **4**.

Se obtiene el espectro RMN 2D HSQC para saber la correlación existente entre cada uno de los hidrógenos y los carbonos (figura 34).

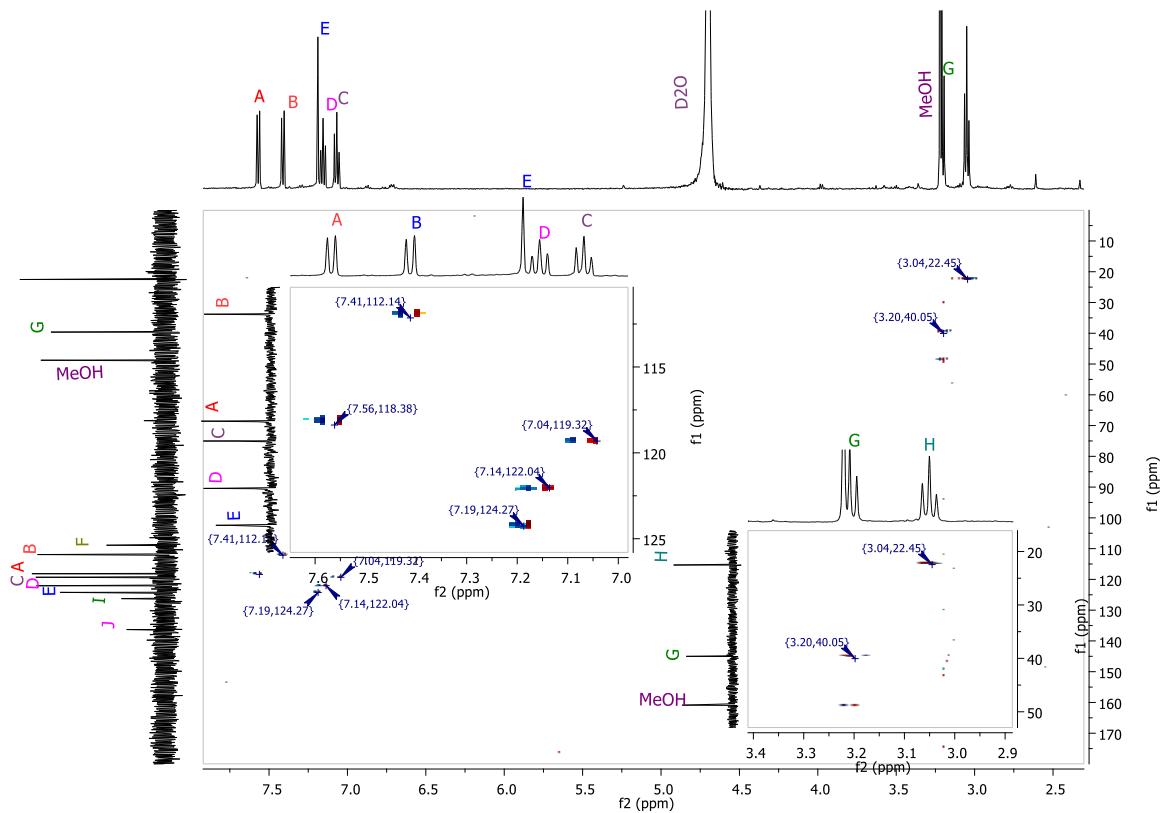


Figura 34. Espectro RMN 2D HSQC del compuesto **4**.

En la tabla 6 se muestra un resumen de la correlación existente entre las señales de RMN ^1H y ^{13}C .

Tabla 6. Señales de los espectros del compuesto **4**.

Correlación	
Señal ^1H ppm	Señal ^{13}C ppm
3.14	22.7
3.29	39.8
7.16	119.4
7.25	122.2
7.28	124.4
7.51	112.1
7.67	118.3
----	109.0
----	126.4
----	136.4

La estructura que se obtiene con ayuda de las técnicas espectroscópicas se muestra en la figura 35, está estructura recibe el nombre de 2-(1-*H*-indol-3-il)etanamina también conocida como *Triptamina*.

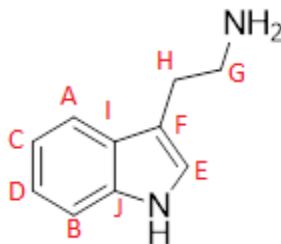


Figura 35. 2-(1-*H*-indol-3-il)etanamina

Fracción 7A (Compuesto 5)

A continuación, se muestra el espectro de infrarrojo (IR) del compuesto **5** (Figura 36).

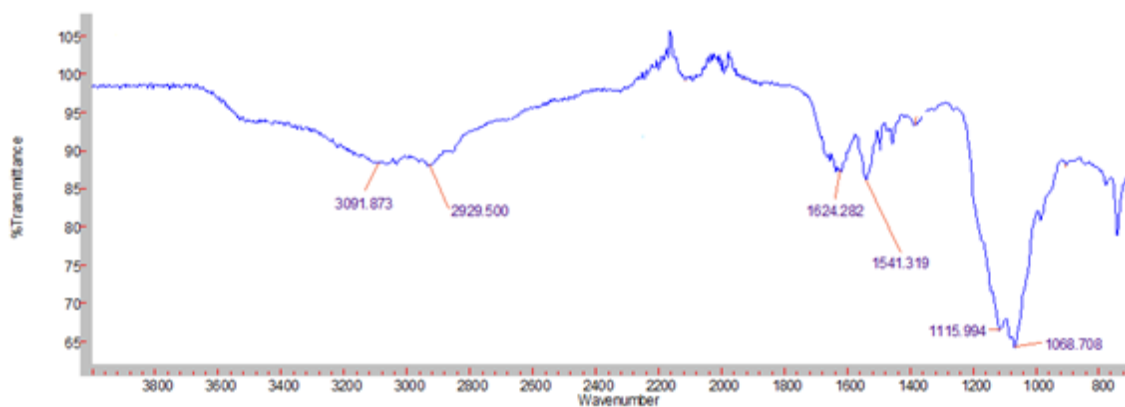


Figura 36. Espectro de IR del compuesto **5**

Se obtuvieron espectros de resonancia magnética nuclear de ¹H a 500 MHz en D₂O ya que no era soluble en cloroformo y se procedió a su análisis como se muestra en la figura 37.

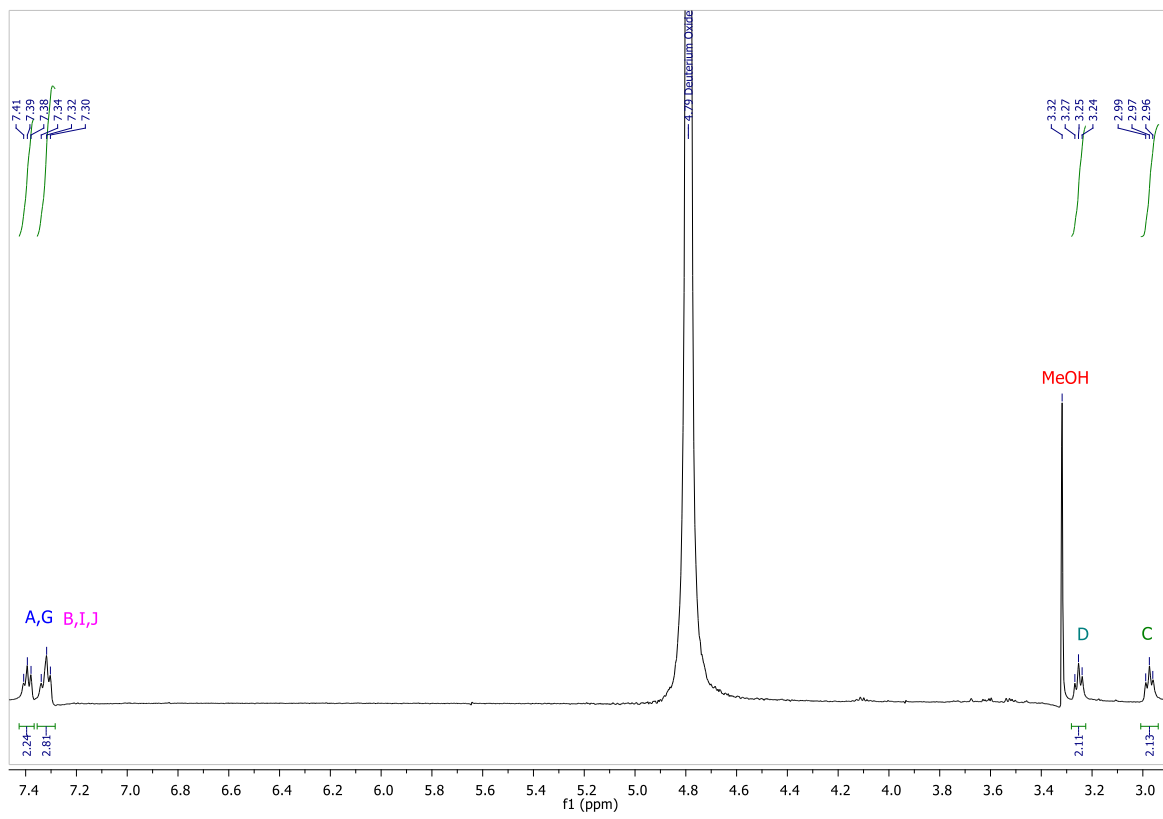


Figura 37. Espectro de RMN de ^1H a 500 MHz en D_2O del compuesto **5**.

Se puede apreciar una señal triple ancha en 7.39 ppm que integra para dos hidrógenos. En 3.25 y 2.97 ppm se observan don señales triples que integra para dos hidrógenos cada una.

Se procedió a obtener espectros de RMN 2D COSY con el fin de poder saber la relación que guardan entre si los hidrógenos y asignarlos inequívocamente (Figura 38).

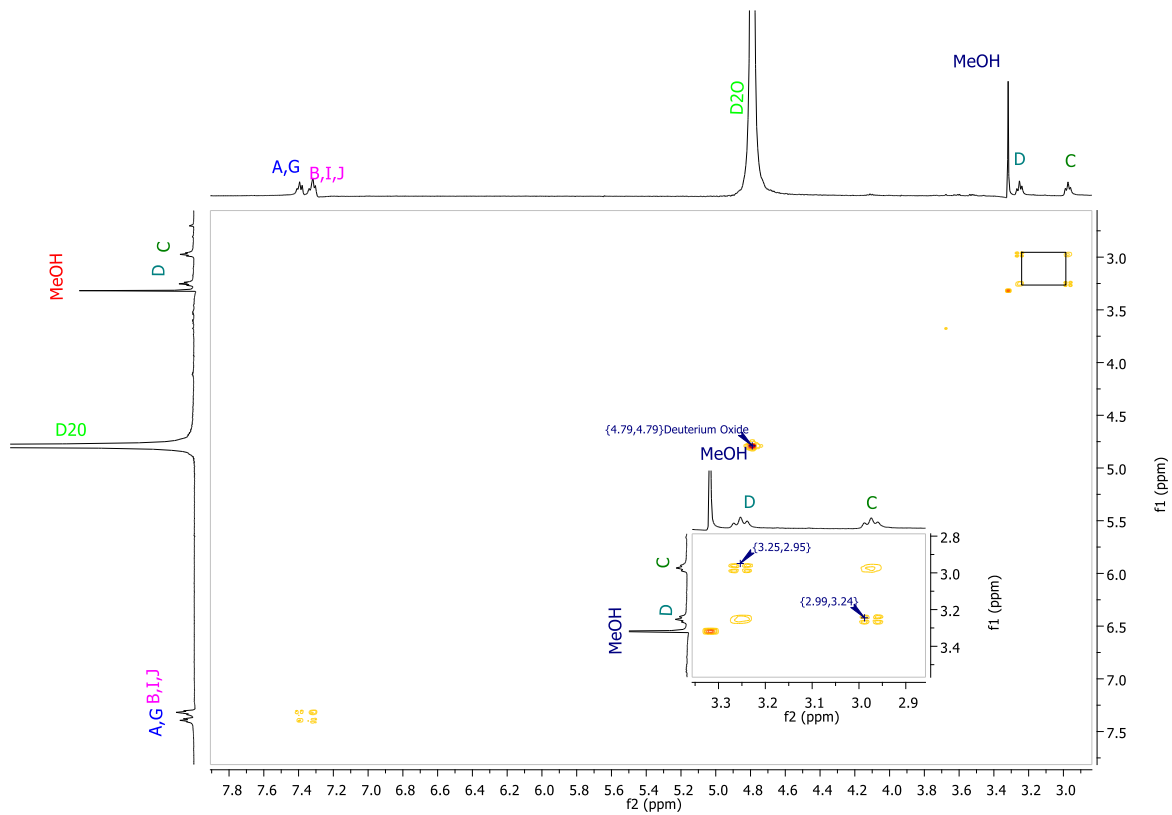


Figura 38. Espectro RMN 2D COSY del compuesto **5**.

Posteriormente se obtuvo el espectro de RMN de ^{13}C del compuesto **5** (Figura 39).

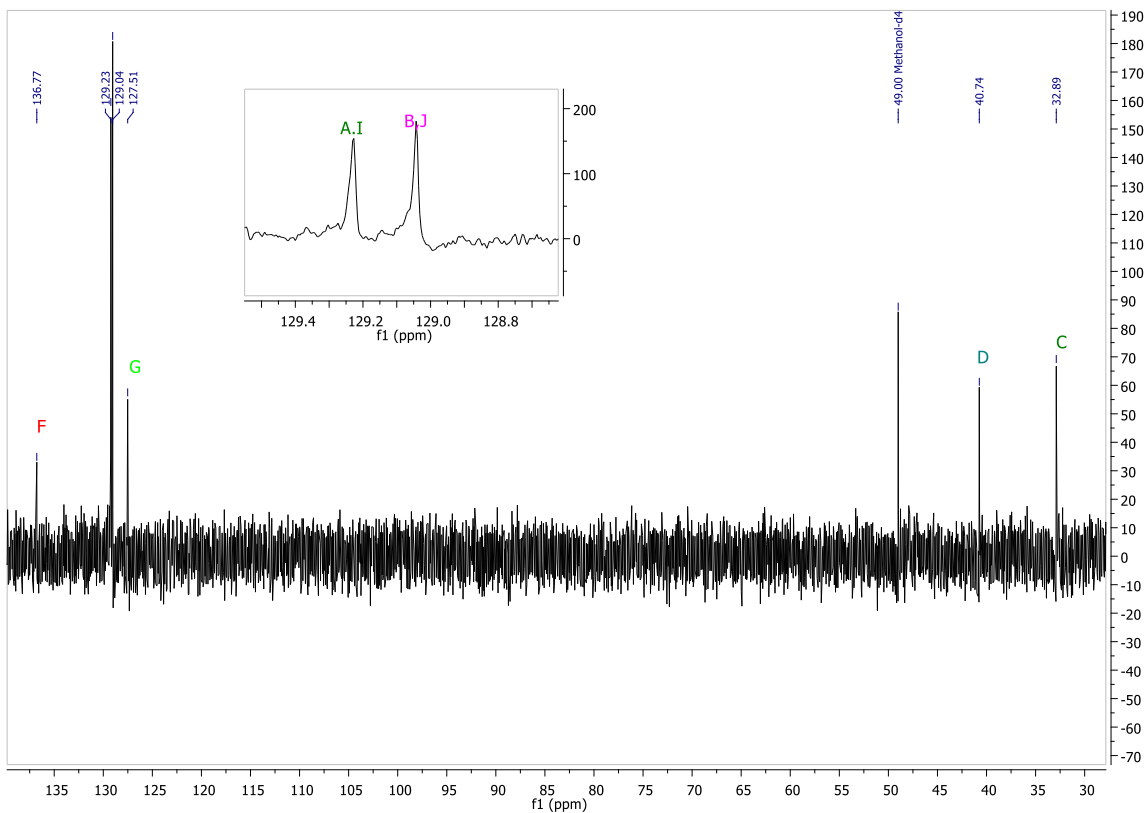


Figura 39. Espectro RMN de ^{13}C a 125 MHz de en D_2O del compuesto 5.

Se observa en el espectro de RMN de ^{13}C seis señales de carbonos diferentes. Para una correcta asignación de los carbonos correlacionándolos con los hidrógenos, se procedió a la obtención del espectro RMN 2D HSQC (Figura 40).

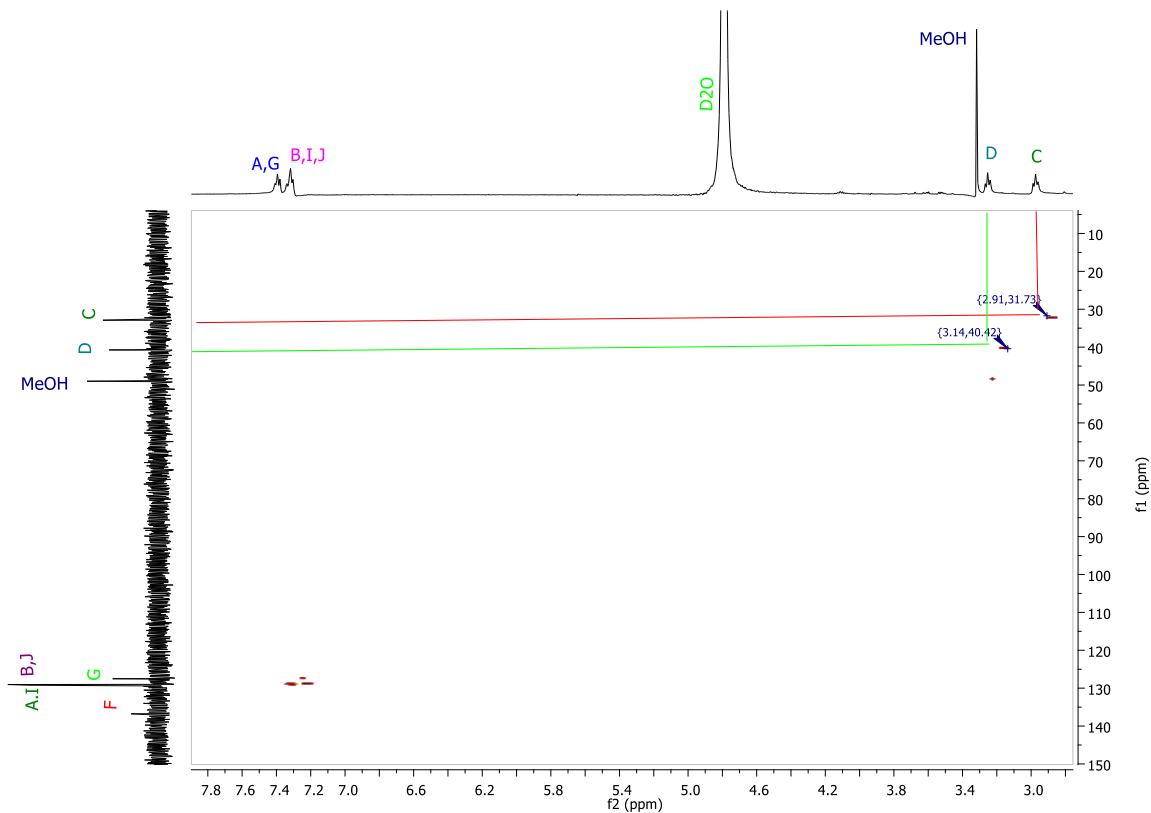


Figura 40. Espectro RMN 2D HSQC del compuesto **5**.

Tabla 7. Señales de los espectros del compuesto **5**

Correlación	
Señal ¹ H ppm	Señal ¹³ C ppm
2.97	32.8
3.25	40.7
7.32	127.5 y 129.0
7.39	129.2
-----	136.7

Se elucida la estructura del compuesto **5** (Figura 41). La estructura propuesta coincide con los espectros de RMN e IR, el nombre que recibe esta estructura es *2-fenetilnamina*.

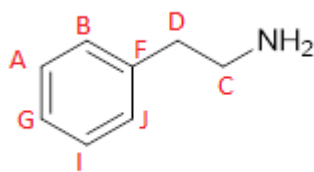


Figura 41. 2-fenetilamina

4.4 Síntesis del compuesto Ftalato de bis-(2-etilhexilo)

De los datos espectroscópicos y del análisis de espectrometría de masas se logró establecer que la estructura del compuesto **1** corresponde al ftalato de bis-(2-etilhexilo). En esta estructura existe un centro estereogénico y la pregunta que surgió inmediatamente, fue cual es el estereoisómero que el proceso biológico formó, cual es la configuración del centro asimétrico del compuesto **1**. Un análisis de los posibles estereoisómeros que pueden tener prevalencia son tres estereoisómeros: el ftalato de bis-((*R*)-2-etilhexilo), ftalato de bis-((*S*)-2-etilhexilo) y ftalato de bis-((*rac*)-2-etilhexilo) figura 42. Con la obtención de su rotación óptica $[\alpha]_{D}^{24} = -17.1$ (c 1, hex), se logró descartar el estereoisómero racémico (compuesto meso) actividad óptica $[\alpha]_{D}^{24} = 0$ y se estableció que el compuesto **1** es el enantiómero Levogiro, y tal como se describió anteriormente por comparación con los datos en la literatura se le asignó la configuración absoluta *R*. Sin embargo, para corroborar con certeza su configuración se planteó realizar la síntesis asimétrica del ftalato de bis-(2-etilhexilo), la cual no ha sido de interés para la comunidad química.

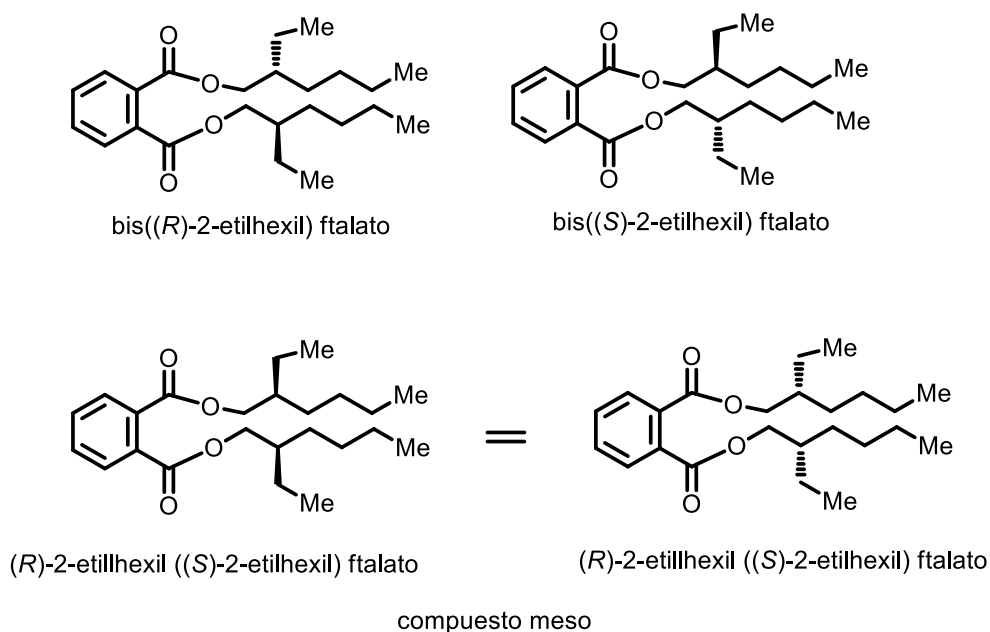
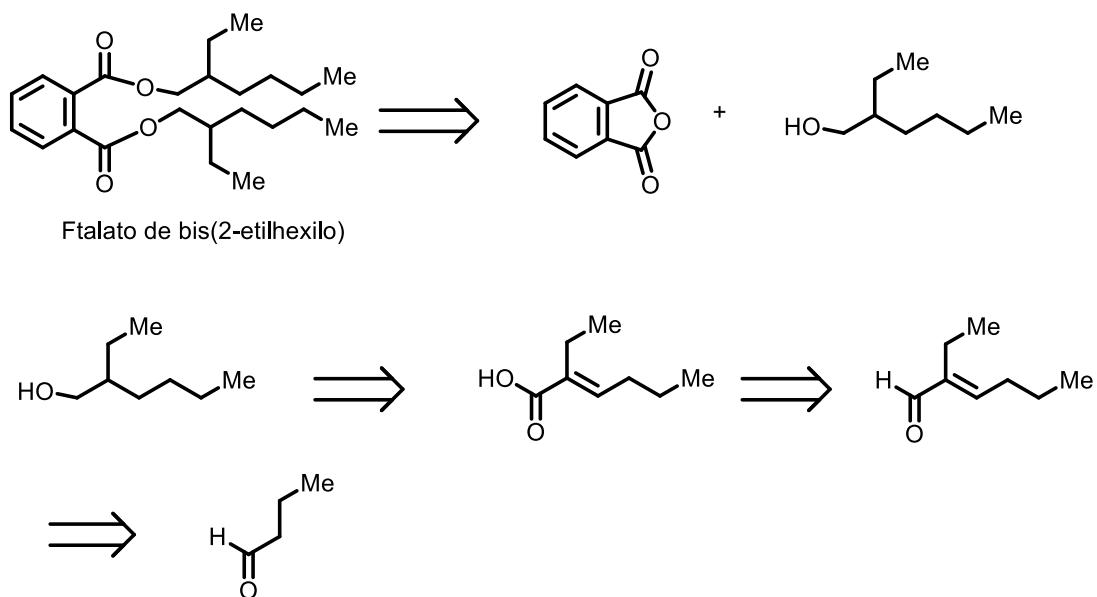


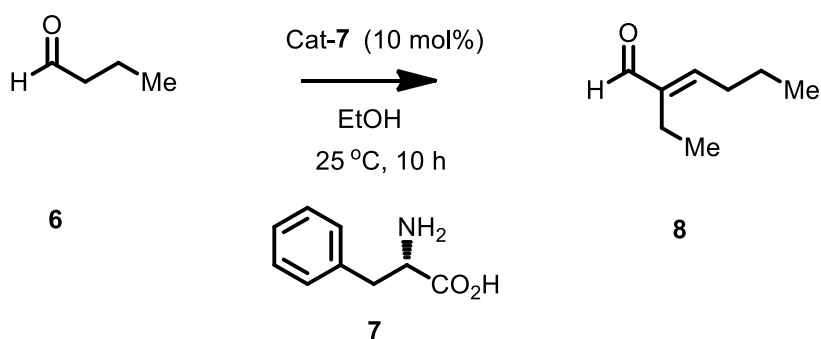
Figura 42. Posibles estereoisómeros del Ftalato de bis-(etilhexilo).

Su retrosíntesis fue propuesta por el rompimiento del enlace C-O del grupo éster dando lugar al anhídrido ftálico y el alcohol 2-etilhexanol el cual puede ser producido a partir del ácido (*E*)-2-etilhex-2-enoico y éste a su vez de (*E*)-2-etilhex-2-enal. El aldehído puede ser obtenido a partir de butiraldehído vía una reacción aldólica catalizada en medio básico, como se muestra en el esquema 2.



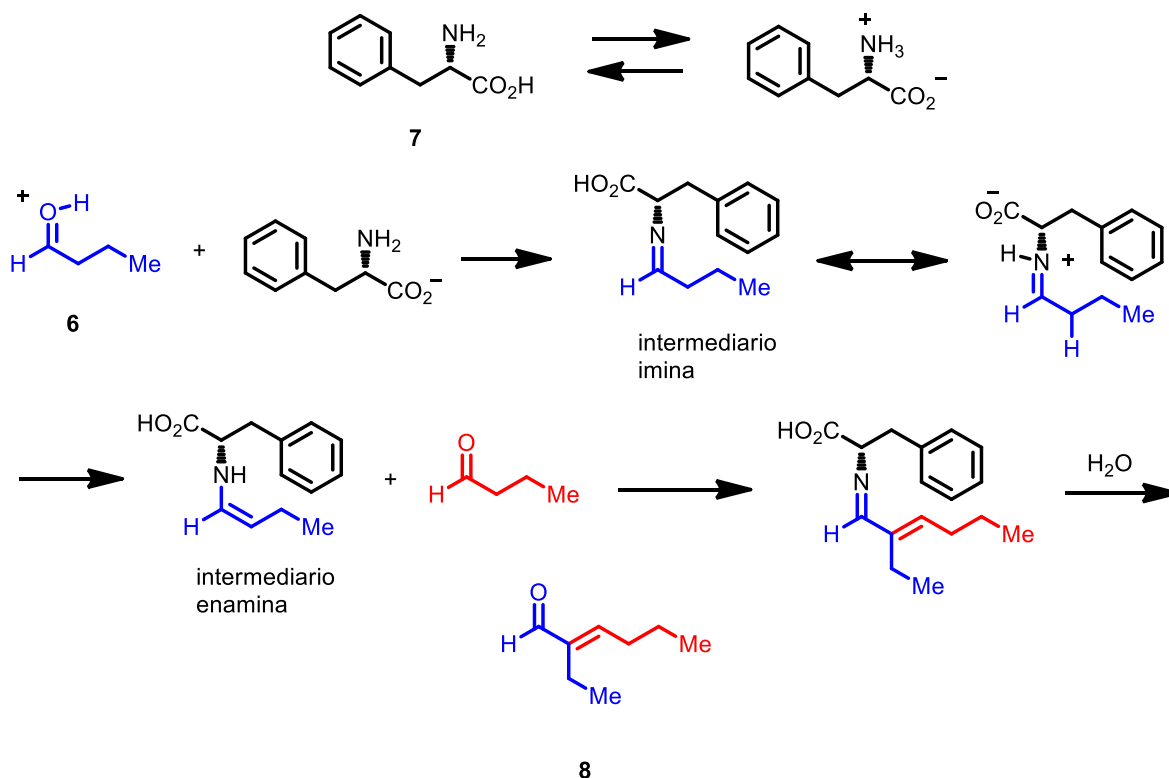
Esquema 2. Retrosíntesis de Ftalato de bis-(2-etilhexilo)

La síntesis, se inició con el tratamiento del butiraldehído **6** bajo condiciones de reacción de la condensación homo aldólica utilizando una cantidad organocatalítica de (*S*)-fenilalanina **7** (10 mol%) en etanol a 25 °C por 10 horas para generar el producto de condensación aldólica (*E*)-2-etilhex-2-enal **8** en un 48% de rendimiento.²⁸ El isómero *trans* fue el producto mayoritario y el isómero *cis* no fue detectado por RMN de ¹H por lo que la reacción fue altamente diastereoselectiva, como se muestra en el esquema 3.



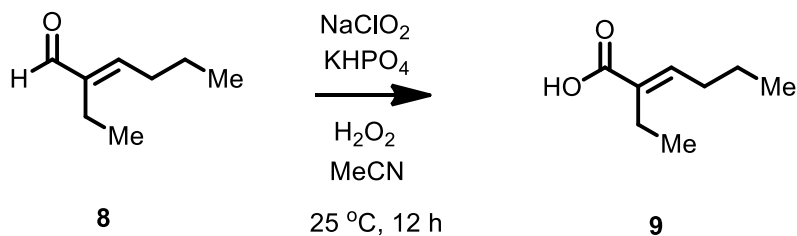
Esquema 3. Reacción de condensación aldólica organocatalítica.

La reacción aldólica organocatalítica se llevó a cabo usando condiciones suaves de reacción, evitando el uso de base metálicas y el uso de soluciones bifásicas evitando el uso de condiciones de reacción drásticas, como el calentamiento de la mezcla de reacción. El mecanismo de reacción usando la (*S*)-fenilalanina **7** quiral como catalizador, puede ser racionalizado de la siguiente manera: el aminoácido puede actuar como fuente de protones, éstos pueden activar al grupo carbonilo del aldehído **6** para facilitar la formación de la respectiva imina. Este intermediario puede ser protonado dando lugar al ion iminium. La eliminación de un átomo de hidrógeno forma la respectiva enamina la cual ataca al grupo carbonilo de otra molécula de butiraldehído **6** formando la imina α,β-insaturada por la pérdida de H₂O. Posteriormente la remoción del catalizador **7** produjo estereoselectivamente el (*E*)-2-etilhex-2-enal **8**, como se muestra en el esquema 4.



Esquema 4. Mecanismo de condensación aldólica vía organocatalítica.

La oxidación de (*E*)-2-etilhex-2-enal **8** con AgNO_3 (10% mol) y H_2O_2 en CH_3CN a 50°C por 12 horas produjo el ácido (*E*)-2-etilhex-2-enoico respectivo **9** en un 50% de rendimiento.²⁹ Sin embargo, cuando se realizó la oxidación de Pinnick usando clorito de sodio (NaClO_2) en presencia de H_2O_2 y KHPO_4 en CH_3CN a 25°C por 12 horas produjo el ácido (*E*)-2-etilhex-2-enoico **9** en un 92% de rendimiento, como se muestra en el esquema 5.



Esquema 5. Oxidación de Pinnick aplicada a un aldehído α,β -insaturado

En el espectro de RMN de ^1H del compuesto **9**, se observa en 11.90 ppm una señal ancha característica del grupo OH unido a un carbonilo. En 6.90 ppm se observa una señal triple con una $J = 7.5$ Hz que integra para un hidrógeno y que

corresponde con un =CH, en 2.31, 2.19 y 1.49 ppm se observan una señal cuádruple con una $J = 7.5$ Hz que integra para dos hidrógenos, otra señal doble de triples con $J = 7.5$, 7.5 Hz que integra para dos hidrógenos y una señal séxtuple con una $J = 7.5$ Hz que integra para dos hidrógenos y que corresponden con tres CH_2 . Finalmente, en 1.02 y 095 ppm se observan dos señales triples con una $J = 7.5$ Hz cada una, que integran para tres hidrógenos cada una y que corresponden a dos CH_3 , como se observa en la figura 43.

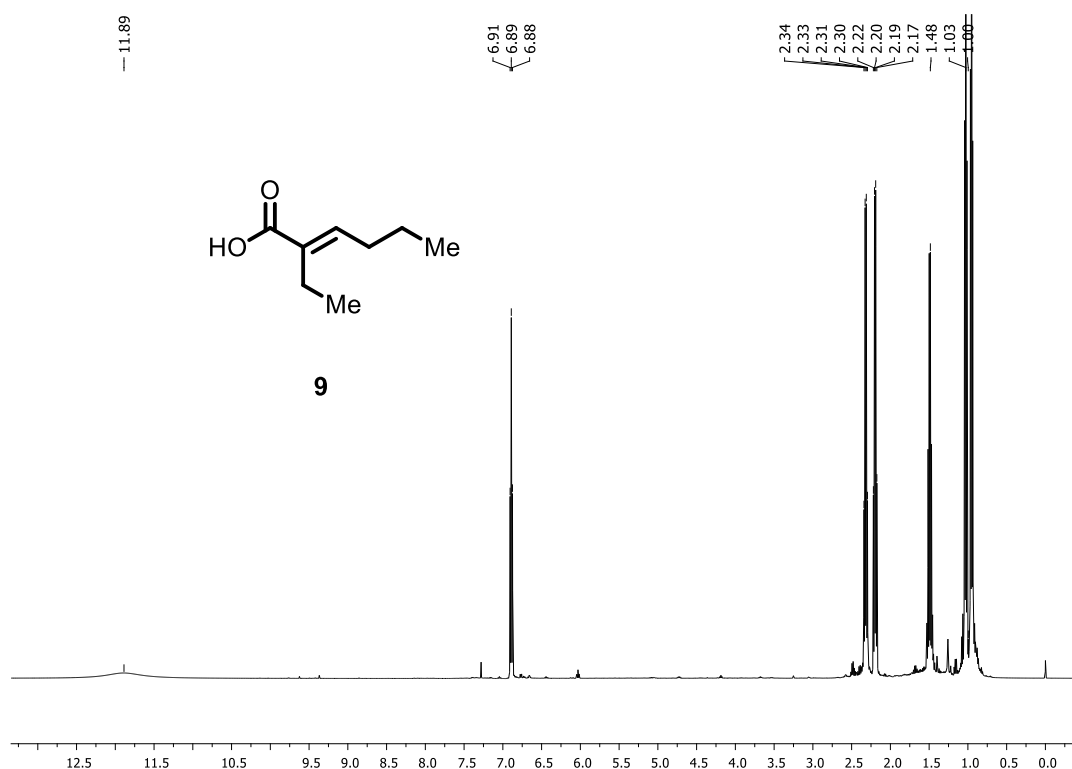


Figura 43. Espectro de RMN de ^1H a 500 MHz en CDCl_3 del compuesto **9**.

Así mismo se obtuvo su espectro de RMN de ^{13}C en donde destacan las siguientes señales en 173.7 ppm que se asignó al átomo de carbono del grupo carboxílico y en 144.8 y 133.1 ppm para los átomos de carbono del doble enlace donde el carbono cuaternario se asignó a la señal de 133.1 ppm y las señales restantes para los átomos de carbono con hibridación sp^3 . Como se muestra en la figura 44.

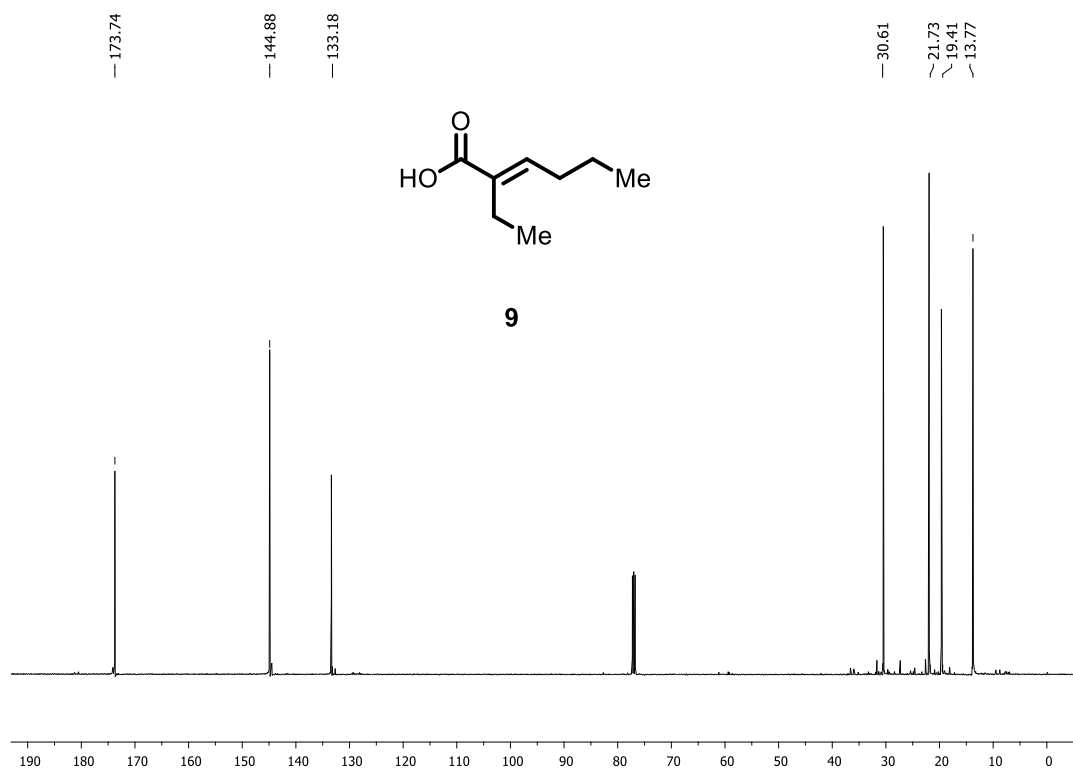
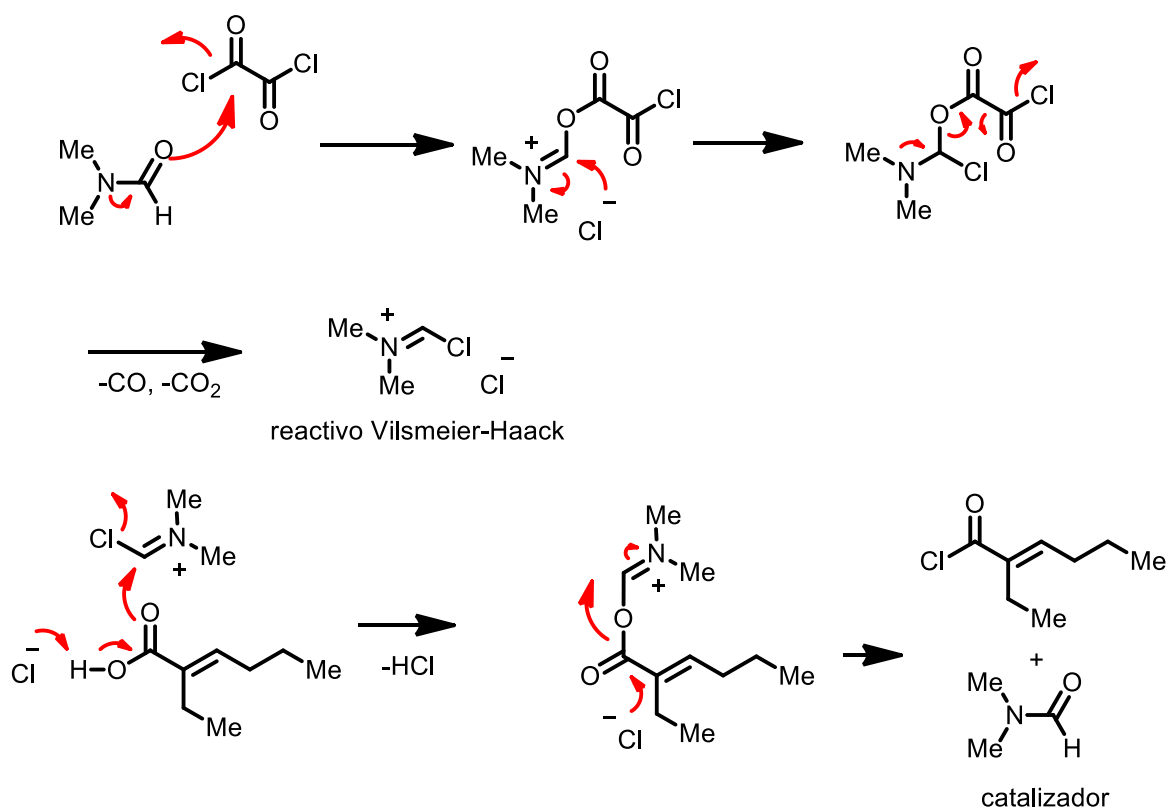


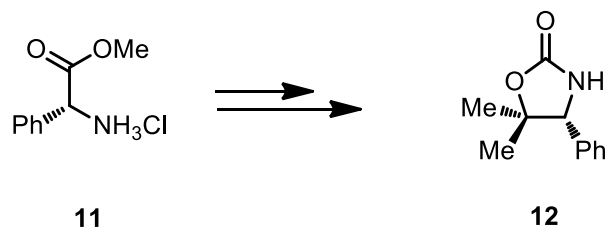
Figura 44. Espectro de RMN de ^{13}C a 125 MHz en CDCl_3 del compuesto **9**.

El mecanismo de la oxidación de Pinnick puede ser racionalizado por la formación de ácido cloroso a partir de la reacción entre el clorito de sodio y fosfato ácido de potasio. El ácido cloroso protona el grupo carbonilo facilitando el ataque del átomo de oxígeno al grupo carbonilo. En el intermediario formado, el átomo de oxígeno realiza la abstracción del átomo de hidrógeno del aldehído formando el ácido (*E*)-2-etilhex-2-enoico **9** y ácido hipocloroso el cual es eliminado con peróxido de hidrógeno para producir HCl y oxígeno, como se muestra en el esquema 6.



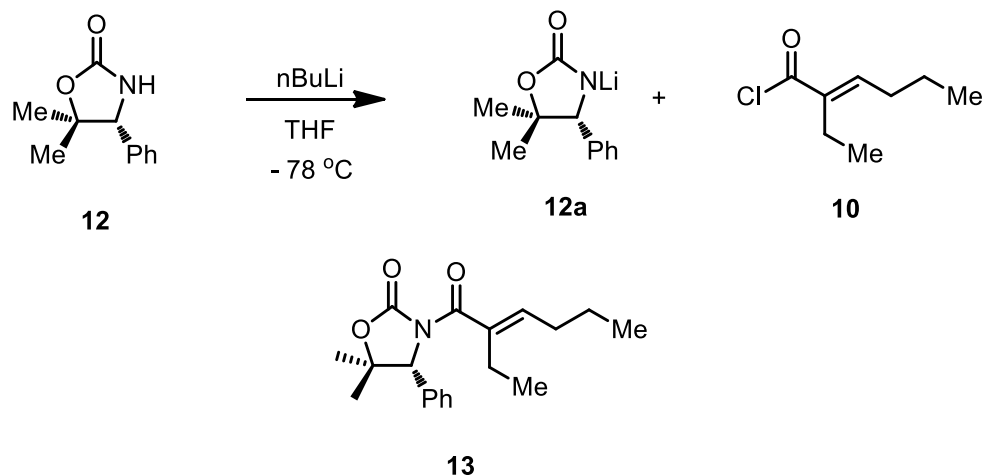
Esquema 8. Mecanismo de reacción para la obtención del cloruro de acilo.

La oxazolidinona quiral **12** fue preparada a partir del éster metílico del clorhidrato de la fenil glicina **11** usando una metodología ampliamente descrita por nuestro grupo de investigación (esquema 9).



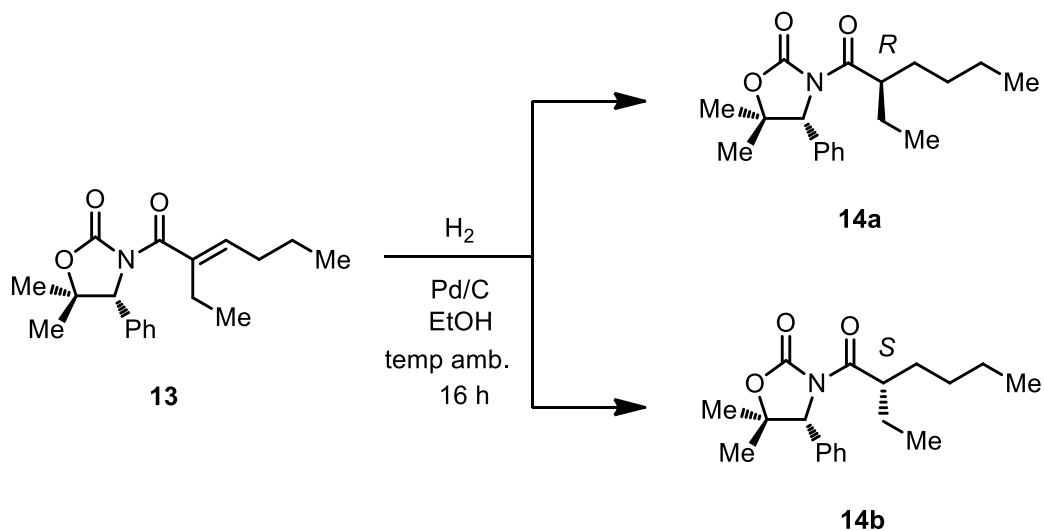
Esquema 9. Oxazolidinona quiral

La oxazolidinona quiral **12** fue tratada con *n*-butillitio a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 40 minutos seguido de una adición del cloruro de acilo **10**. La mezcla de reacción se agitó por 3 días a temperatura ambiente para obtener la *N*-enoil-oxazolidinona quiral **13** en un rendimiento del 60%,³⁰ como se muestra en el esquema 10.



Esquema 10. Reacción de acoplamiento entre la oxazolidinona quiral y cloruro de acilo.

La *N*-enoil-oxazolidinona **13** fue expuesta a condiciones de reacción de hidrogenación utilizando una cantidad catalítica de paladio sobre carbón activado (Pd/C) en etanol a temperatura ambiente por 16 horas para generar una mezcla de diastereoisómeros **14a** y **14b** en rendimiento cuantitativo y con una relación diastereomérica (1:1).³¹ Los diastereoisómeros **14a** y **14b** fueron purificados y separados en columna de gel de sílice con un sistema de hexano:acetato de etilo 97/3 para obtener **14a** y **14b** como líquidos viscosos en un 49 y 47% de rendimiento respectivamente (esquema 11). A pesar de que el compuesto **13** tiene un sustituyente voluminoso con una estereoquímica determinada no fue lo suficientemente impedido para favorecer una hidrogenación estereoselectiva, obteniendo ambos diastereómeros en la misma relación, esto posiblemente debido a una libre rotación del grupo oxazolidinona.



Esquema 11. reacción de hidrogenación

En el espectro de RMN de ^1H del compuesto **14a**, se observa entre 7.38 y 7.30 ppm una señal múltiple que integra para tres hidrógenos y en 7.15 ppm una señal doble de dobles con $J = 8.5, 1.5$ Hz que integra para dos hidrógenos que pertenecen a los hidrógenos aromáticos del grupo fenilo. En 5.10 ppm se observa una señal simple que integra para un hidrógeno que corresponde con el grupo CH unido al nitrógeno. En 3.84 ppm se observa una señal múltiple que integra para un hidrógeno y se asignó al CH base del grupo etilo. El resto de las señales corresponde con los grupos metilos y CH_2 de la molécula, como se observa en la figura 45.

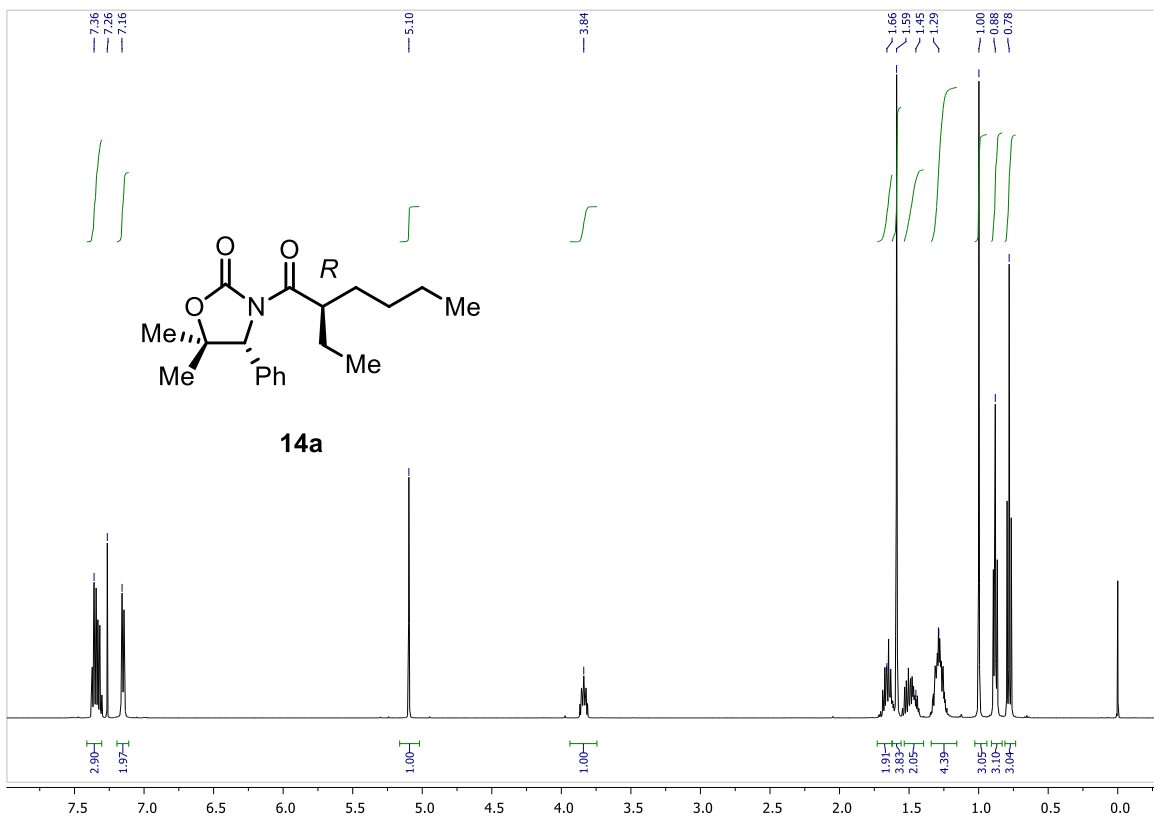


Figura 45. Espectro de RMN de ¹H a 500 MHz en CDCl₃ del compuesto **14a**.

También se obtuvo su espectro de RMN de ¹³C, donde se observan las señales de los diecisiete carbonos diferentes de la molécula, entre los que se encuentran los aromáticos, los cuaternarios, los carbonilos y los alifáticos, como se muestra en la figura 46.

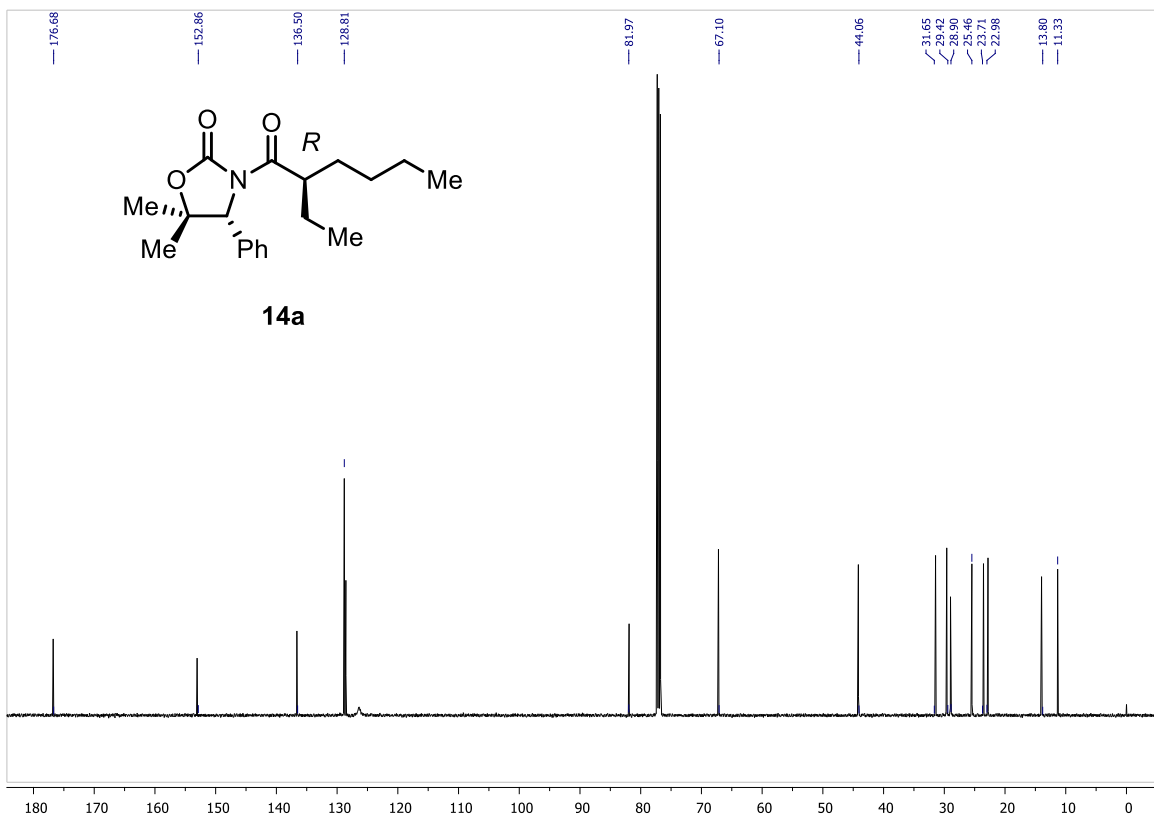
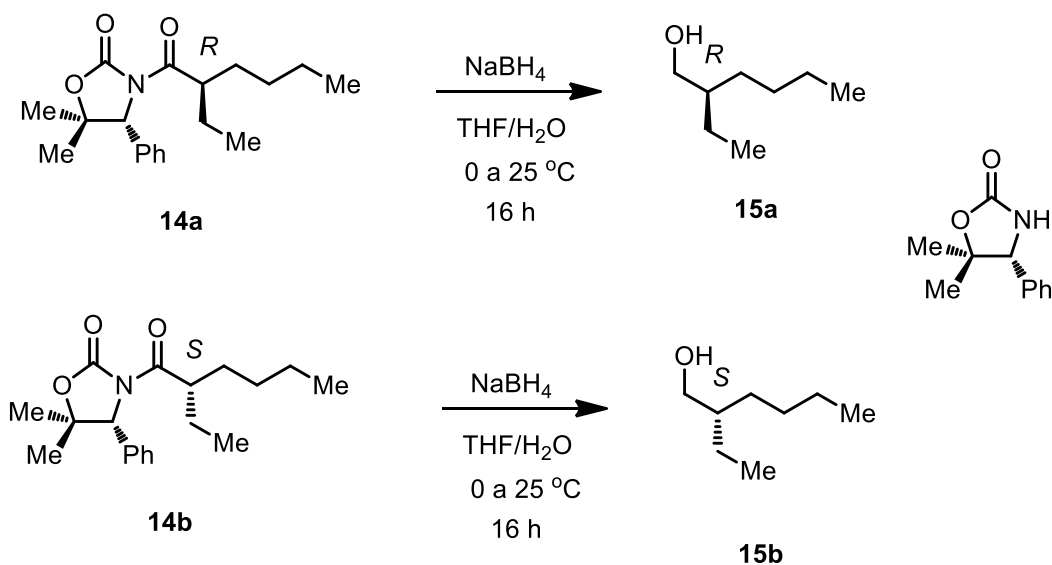


Figura 46. Espectro de RMN de ^{13}C a 125 MHz en CDCl_3 del compuesto **14a**.

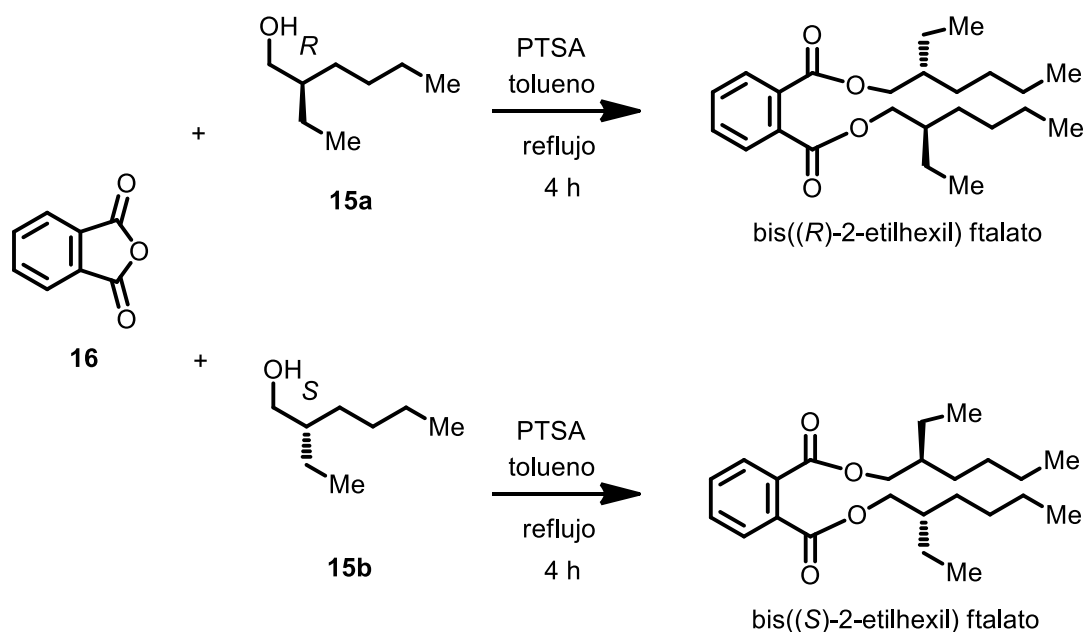
El tratamiento de los diastereoisómeros **14a** y **14b** con borohidruro de sodio en una mezcla de THF- H_2O a 0-25 °C por 16 horas³² dio la oxazolidinona **12** junto con los alcoholes respectivos (*R*)-2-etil-hexanol **15a** ($[\alpha]_D^{22} = -2.0$ c 1.0, CH_2Cl_2) y (*S*)-2-etilhexanol **15b** en un 60% y 65% de rendimiento respectivamente, como se muestra en el esquema 12.



Esquema 12. Remoción de la oxazolidinona quiral.

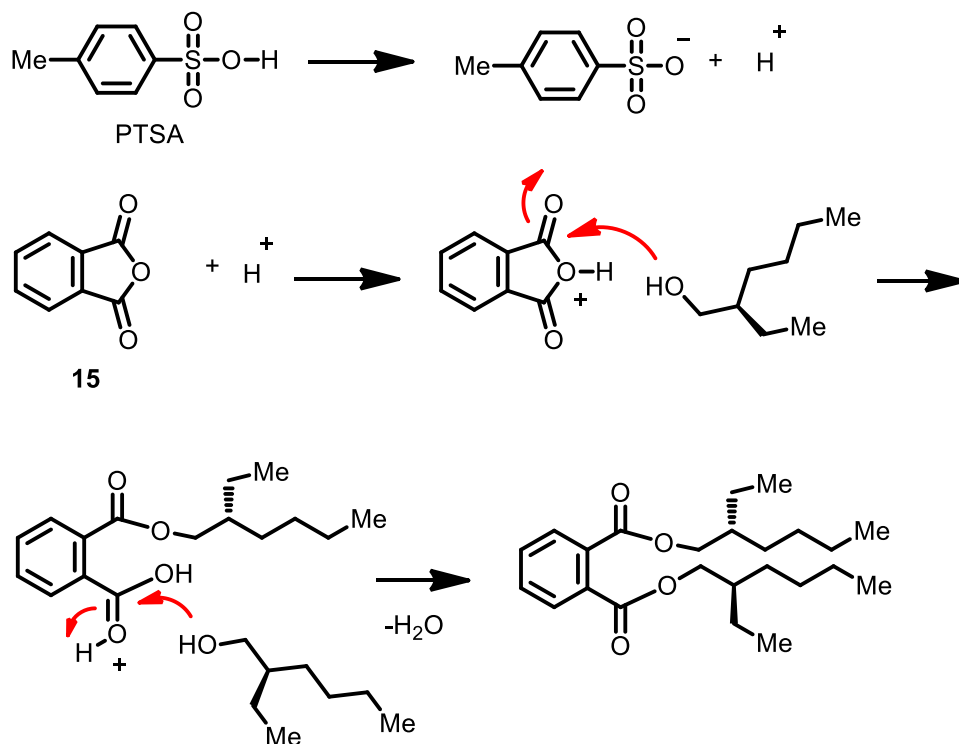
La rotación óptica experimental del compuesto **15a** fue comparado con el que se describe en la literatura (*R*)-2-etilhexan-1-ol $[\alpha]_D^{22} = -2.1$ c 0.5, CH₂Cl₂,³³ $[\alpha]_D^{27} = -2.2$ c 0.6, CH₂Cl₂³⁴ permitiendo el establecimiento de la estereoquímica de los compuestos **14a** y **14b**.

El anhídrido ftálico **16** fue tratado con el alcohol **15a** y **15b** en la presencia de una cantidad catalítica de ácido *p*-tolueno sulfónico (PTSA) en tolueno a reflujo por 4 horas³⁵ para generar el ftalato correspondiente bis-((*R*)-etilhexilftalato y bis-((*S*)-etilhexilftalato en 60% y 68% de rendimiento respectivamente, como se observa en el esquema 13.



Esquema 13. Reacción de acoplamiento del anhídrido ftálico con alcoholes quirales.

El mecanismo de reacción de acoplamiento del anhídrido ftálico con un alcohol quiral, puede ser racionalizado primero por la activación del anhídrido vía protonación y una subsecuente apertura del ciclo por ataque del alcohol. La introducción del segundo alcohol es una etapa difícil de llevar a cabo debido al impedimento estérico por lo que éste debe ser calentado de manera exhaustiva como se observa en el esquema 14.



Esquema 14. Mecanismo de acoplamiento del anhídrido ftálico con el alcohol quiral.

Los espectros de los compuestos bis-((*R*)-etilhexilftalato y bis-((*S*)-etilhexilftalato coinciden con el espectro obtenido del compuesto extraído de manera natural.

4.5 Pruebas de actividad biológica

Respecto a las bacterias de interés clínico se sabe que hoy en día existen muchas bacterias causantes de enfermedades que han ido adquiriendo resistencia contra los fármacos en uso actual, por lo que la búsqueda de nuevos compuestos o fármacos que puedan inhibir su crecimiento o incluso causar su eliminación es un área en amplio desarrollo.

Por otro lado, los fitopatógenos son hongos que afectan a las plantas provocándoles enfermedades que echan a perder cultivos enteros devastándolos y produciendo pérdidas económicas a nivel mundial. Por ello la investigación está

siendo enfocada al descubrimiento de nuevos compuestos antifúngicos de origen natural.

Por lo tanto y teniendo cada uno de los compuestos puros se realizaron pruebas de actividad biológica tanto en bacterias de interés clínico como en hongos fitopatógenos, con la intención de estudiar su posible efecto en los diferentes organismos.

Compuesto 1 Ftalato de bis (2-etilhexilo).

Con la intención de probar su probable toxicidad el compuesto bis (2-etilhexilo) **1** fue evaluado frente a bacterias gram-positivas como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus saprophyticus*, y *Listeria monocytogenes* y también contra bacterias gram-negativas como *Escherichia coli*, *Salmonella choleraesuis*, *Shigella* sp. y *Vibrio cholera* por medio de la difusión en agar en medio Müller-Hinton. De los datos obtenidos se puede resumir que la mayoría de bacterias fueron resistentes exceptuando a *S. agalactiae*, *S. cholerae* y *Shigella* sp. las cuales mostraron una moderada inhibición de tipo bacteriostática a una concentración de 75 mg/mL, lo cual quiere decir que no se inhibe su crecimiento sino que sólo se detiene.

Así mismo se quiso probar su actividad antifúngica y el compuesto fue probado contra los hongos fitopatógenos *Fusarium oxysporum*, *F. avenaceum*, *Moniliophthora roreri*, *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. y *Paecilomyces* sp. no mostrando ningún tipo de efecto inhibitorio en ninguno de los hongos probados.

Estos resultados demuestran que este compuesto no tiene ningún tipo de actividad inhibitoria para los microorganismos y por lo tanto podría no ser tan perjudicial para la salud como lo indican algunos estudios en donde algunos autores mencionan que los ftalatos de origen sintético por las mezclas que tienen podrían ser nocivos a diferencia de los naturales¹²

Compuestos indólicos 2, 3, 4 y 5

Estos compuestos se ensayaron contra bacterias de interés clínico como *S. agalactie*, *S. saprophyticus*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *M. luteus*, *B. cereus*, *S. cholerasuis*, *E. coli*, *V. parahemolyticus*, *V. cholerae*, *Shigella sp.* y *P. aeruginosa*.

Los resultados de las bacterias gram (+) se muestran en la tabla 8 y figura 45 y los resultados de las bacterias gram (-) se muestran en la tabla 9 y figura 46.

Tabla 8. Resultados del antibiograma en bacterias gram (+)

Bacteria/Compuesto	<i>N</i> -fenetilacetamida 2	acetiltriptamina 3	Triptamina 4	Fenetilamina 5
	<i>Halos de inhibición (mm)</i>			
<i>S. agalactie</i>	0	20	0	0
<i>S. saprophyticus</i>	0	17	0	8
<i>S. aureus</i>	0	15	0	4
<i>L. monocytogenes</i>	0	14	0	0
<i>M. luteus</i>	0	29	0	13
<i>B. cereus</i>	0	0	0	0

En la tabla 8 se observa que la *N*-acetiltriptamina 3 es el compuesto que presentó mayor halo de inhibición contra la mayor parte de las bacterias utilizadas. En la figura 47 se puede observar los resultados obtenidos de los antibiogramas.

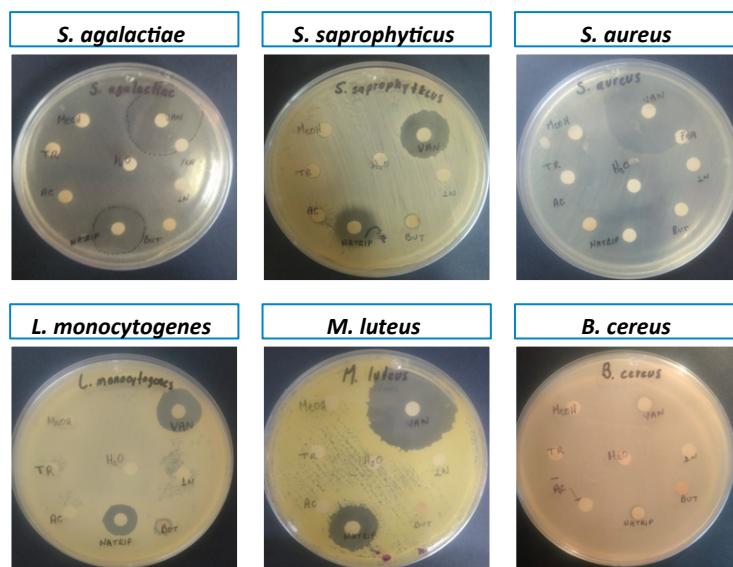


Figura 47. Resultados de antibiograma en bacterias gram (+)

Tabla 9. Resultados del antibiograma en bacterias gram (-)

Bacteria/Compuesto	Fenetilacetamida 2	Acetiltriptamina 3	Triptamina 4	Fenetilamina 5
	Halo de inhibición (mm)			
<i>S. cholerasuis</i>	0	0	14	0
<i>E. coli</i>	7	8	0	0
<i>V. parahemolyticus</i>	0	0	0	0
<i>V. cholerae</i>	7	0	9	8
<i>Shigella sp.</i>	0	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i>	8	0	0	0

En la tabla 9 se puede observar que los resultados de inhibición del crecimiento a comparación de las bacterias gram (+) es menor. Se podría destacar que el compuesto fenetilacetamida **2** inhibió el crecimiento de 3 bacterias las cuales son *E. coli*, *V. cholerae* y *P. aeruginosa*. En la figura 48 se observan los resultados del antibiograma en bacterias gram (-).

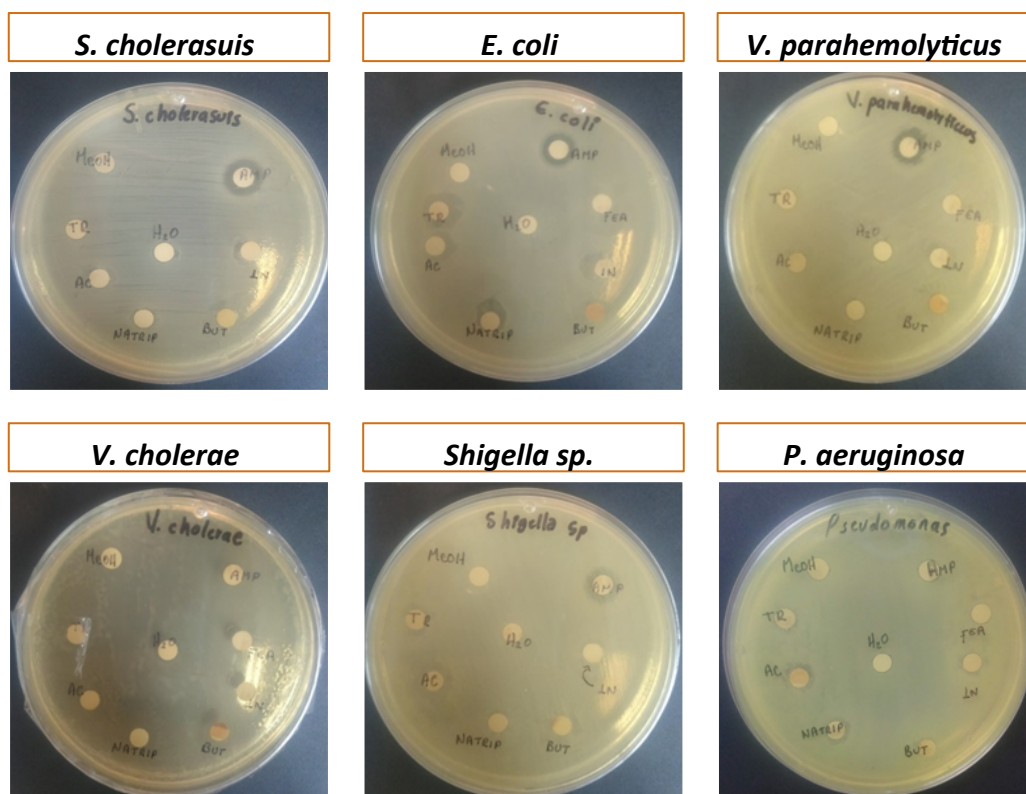


Figura 48. Resultados de antibiograma en bacterias gram (-)

Se realizó el ensayo de antibiograma contra hongos fitopatógenos: *M. roleri*, *F. oxysporum* y *Alternaria alternata*. Los resultados de la lectura a las 24 h se muestran en la tabla 10 y la gráfica 1, los resultados a las 48h se muestran en la tabla 11 y la gráfica 2.

Tabla 10. Resultados del antibiograma a las 24 horas contra hongos fitopatógenos

	Fenil acetamida 2	Acetilriptamina 3	Triptamina 4	Fenilamina 5
<i>M. roleri</i>	16.02%	36.29%	42.87%	54.23%
<i>F. oxysporum</i>	14.99%	26.31%	17.36%	26.58%
<i>A. alternata</i>	0.01%	40.27%	43.73%	34.64%

Gráfico 1. Porcentaje de inhibición a las 24 horas

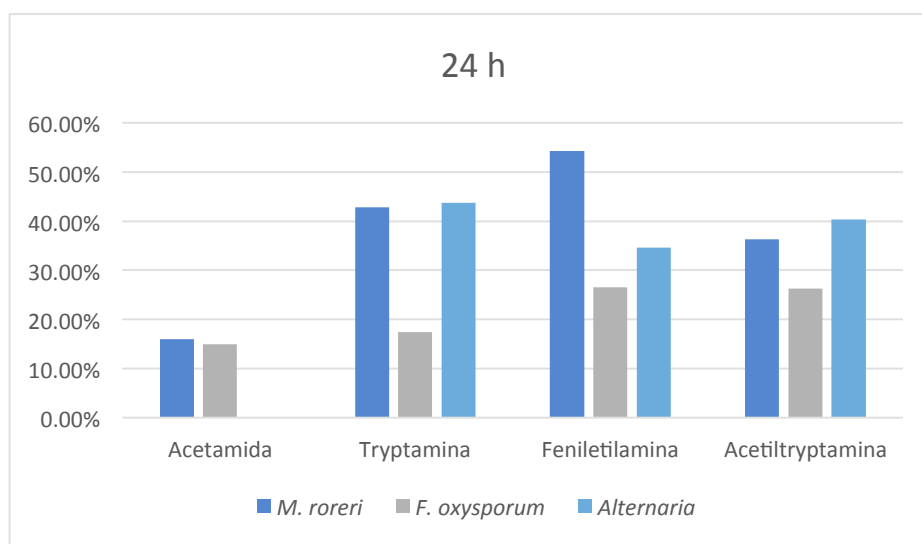
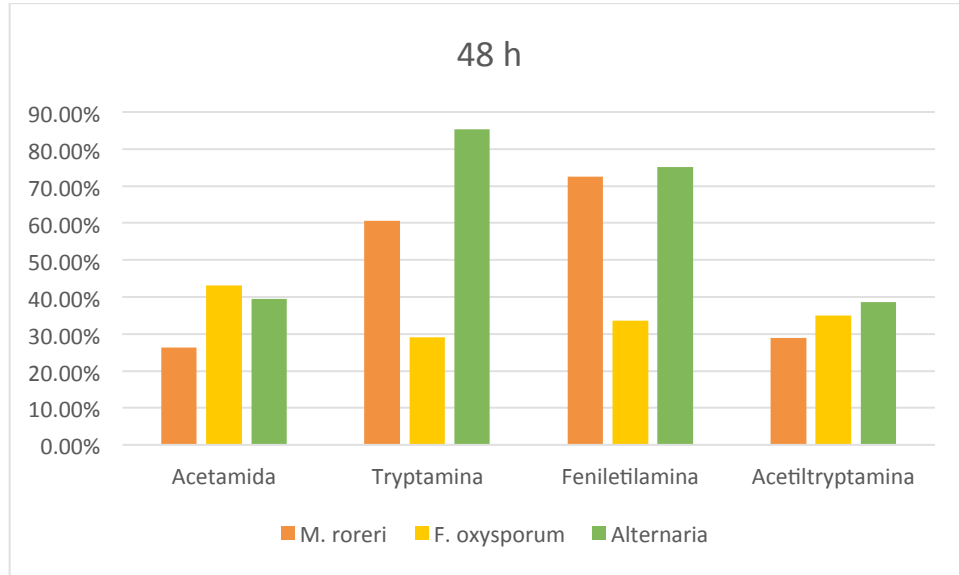


Tabla 11. Resultados del antibiograma a las 48 horas contra hongos fitopatógenos

	Fenil acetamida 2	Acetilriptamina 3	Triptamina 4	Fenilamina 5
<i>M. roleri</i>	26.40%	28.99%	60.64%	72.54%
<i>F. oxysporum</i>	43.12%	35.02%	29.09%	33.60%
<i>A. alternata</i>	39.42%	38.54%	85.29%	75.07%

Gráfico 2. Porcentaje de inhibición a las 48 horas



A las 48 horas es la triptamina **4** quien inhibe en un mayor porcentaje el crecimiento de los hongos seguido de la fenetilamina **5**.

Por lo que se podría concluir que la fenetilamina **5** y la triptamina **4** son los compuestos que tiene mayor actividad frente a los hongos.

5- CONCLUSIONES

- Se lograron separar diferentes fracciones por cromatografía en columna en el de sílice de un extracto crudo del cultivo de la bacteria *B. thuringiensis* ELI52.
- Se logró aislar un compuesto que fue completamente identificado y caracterizado como el Ftalato de bis (2*R*-etilhexilo). El compuesto sólo mostró una leve actividad bacteriostática contra *Streptococcus agalactiae*, *Salmonella cholerasuis* y *Shigella* sp. siendo bastante inocuo para los microorganismos.
- Debería resaltarse que se han hecho algunos esfuerzos químicos para obtener el ftalato racémico incluso utilizando catalizadores homogéneos y heterogéneos. En este trabajo se describe por primera vez la síntesis asimétrica del DEHP de *B. thuringiensis* en buenos rendimientos y enantioméricamente puro.
- La síntesis orgánica asimétrica de los dos isómeros del compuesto fue realizada por primera vez. La última etapa envuelve dos pasos: la primera etapa que es muy rápida y puede ser llevada a cabo en ausencia de catalizador y la segunda etapa que es la esterificación del segundo ácido carboxílico que es lenta y necesita ser ayudada por un catalizador. Por esta razón el proceso produce el producto con rendimientos moderados comparando con la síntesis biológica que lleva a cabo *B. thuringiensis*. Por lo tanto, la extracción de este compuesto de fuentes naturales es más efectiva que la síntesis química.

- Se lograron identificar y caracterizar cuatro compuestos indólicos, llamados *N*-fenetil acetamida, *N*-acetil triptamina, triptamina y fenetilamina.
- Se realizaron pruebas biológicas de inhibición del crecimiento con los cuatro compuestos en bacterias y hongos. Los compuestos de triptamina y fenetilamina fueron los que lograron tener un gran poder inhibitorio contra los hongos.

6- DESARROLLO EXPERIMENTAL

6.1 Selección de cepa de *Bacillus* y preparación de medio de cultivo.

De una colección de cepas se eligió aquella (rotulada como ELI52) con poder inhibitorio hacia algunas bacterias de interés médico (Ej. *E. coli*, *Pseudomonas sp.*, *V. cholerae*, *S. aureus*, etc.), la cual fue identificada como *Bacillus thuringiensis* aislada previamente de una muestra de suelo de Mérida, Yucatán. El medio de cultivo utilizado fue caldo LB (Luria Bertani que consiste en: Extracto de Levadura 5 g, Cloruro de sodio 10 g, Peptona de caseína 10 g).

6.2 Crecimiento de la cepa de *Bacillus thuringiensis* ELI52.

La cepa elegida se incubó inicialmente en una placa de agar LB durante 24 horas para observar su morfología macroscópica libre de contaminación microbiológica. Posteriormente se procede a inocularla en el caldo de cultivo LB en condiciones de esterilidad (campana de flujo laminar y mechero Bunsen). Una vez inoculado el cultivo, se procede a incubarlo en una estufa de incubación a 29°C y con una agitación constante de 180 rpm durante 4 días. Al cumplirse el tiempo de incubación se procede a centrifugar a 6000 rpm durante 10 minutos con el fin de separar las células bacterianas del cultivo líquido por decantación.

6.3 Extracción del cultivo sin células con disolventes orgánicos.

Al sobrenadante se le realiza una extracción por triplicado con acetato de etilo en una relación 1:1 de volumen. Posteriormente la fase orgánica recolectada se seca con sulfato de sodio y se concentra a presión reducida (con rotavapor).

Se obtuvo un extracto crudo de aspecto viscoso de color marrón-amarillo de un olor penetrante en un rendimiento aproximado de 200 mg/L.

6.4 Purificación de los compuestos con columna cromatográfica de gel de sílice.

El extracto de la bacteria se purifica mediante una cromatografía en columna de gel de sílice de una altura aproximada de 9.5 cm. Se utilizan diferentes sistemas

como eluyentes. Por cada sistema de 10 mL se utilizan 3 tubos, cada uno con una cantidad aproximada de 3 mL de eluyente. Se utilizan diferentes sistemas iniciando con la polaridad más baja hasta llegar a la polaridad más alta. Los productos en cada tubo se van identificando por cromatografía en capa fina con luz UV de onda corta (254 nm) y onda larga (360 nm) como revelador.

Para la purificación del compuesto ftalato se realiza una columna cromatográfica en una columna de plástico de 10 cm con gel de sílice a una altura de 4 cm y se agrega el extracto de ftalato con impurezas (altura de 1.8 cm) y se procede a trabajar con una fase móvil de Hexano: acetato 9:1. El compuesto DEHP limpio se obtiene de las fracciones con hexano: acetato 9: 1 con un rendimiento del 10% en peso por litro de medio de cultivo.

6.5 Pruebas de sensibilidad.

Con los compuestos obtenidos, se realizan pruebas de sensibilidad para ver si tiene actividad inhibitoria contra bacterias u hongos. Las bacterias utilizadas para pruebas de actividad antibacterial se utilizan, las bacterias gram-positivas, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Micrococcus luteus*, *Listeria monocytogenes* y *Bacillus* sp y las bacterias gram-negativas *Serratia marcescens*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella* sp, *Shigella* sp, *Pseudomonas aeruginosa* *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*. Las bacterias se inoculan en placas Petri.

El compuesto se prueba en una concentración de 15 mg / 100 µL de hexano utilizando como controles positivo y negativo Vancomicina para bacterias Gram positivas y Ampicilina para bacterias Gram negativas, y hexano respectivamente. Se ponen los sensidiscos impregnados y se incuban. Se espera 24 h para observar el crecimiento bacteriano y si hay halos de inhibición por parte del control positivo y del extracto, los halos se miden en mm.

6.6 Síntesis orgánica.

(E)-2-etilhex-2-enal 8.

A una solución del butiraldehído **6** (2.41 g, 33.4 mmol) en etanol anhidro (15 mL), se adicionó la (S)-fenilalanina **7** (368.8 mg, 2.20 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó por 10 horas a la misma temperatura. Después de un tiempo la reacción se detuvo con H₂O (20 mL) y una solución saturada de NaHCO₃ (10 mL) y la fase orgánica fue extraída con CH₂Cl₂ (3 x 20 mL). La fase orgánica se secó con una solución saturada de NaCl seco con Na₂SO₄, se filtró y concentró a vacío. El producto crudo se purificó por cromatografía en columna con gel de sílice utilizando hexano como eluyente para obtener **8** como un líquido, 1.00 g, 47.6 %.; ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 9.37 (1H, s, CHO), 6.44 (1H, t, *J* = 7.5 Hz, HC=), 2.35 (2H, q, *J* = 7.5 Hz, CH₂), 2.26 (2H, q, *J* = 7.5 Hz, CH₂), 1.55 (2H, sext, *J* = 7.5 Hz, CH₂), 0.99 (3H, t, *J* = 7.5 Hz, CH₃), 0.97 (3H, t, *J* = 7.5 Hz, CH₃); ¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ 195.1 (C=O), 154.6 (HC=), 145.2 (C=), 30.5 (CH₂), 21.8 (CH₂), 17.1 (CH₂), 13.7 (CH₃), 13.2 (CH₃).

Ácido (E)-2-etilhex-2-enoico 9.

A una solución de **8** (1.02 g, 8.11 mmol) en CH₃CN (10 mL) y H₂O (5 mL), se adicionaron KH₂PO₄ (248 mg, 1.82 mmol) y NaClO₂ (1.03 g, 11.3 mmol) seguido por un 30% H₂O₂ (1.4 mL, 12.1 mmol). La mezcla de reacción se agitó por 12 horas y se detuvo con una solución de 10% Na₂S₂O₃ y una solución acuosa de 1M HCl que se adicionó hasta obtener un pH = 1. La fase orgánica se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x 20 mL). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄, se filtró y concentró al vacío. El producto crudo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice con hexano: acetato de etilo (97/3) como eluyente para generar **9** como un líquido viscoso, 1.04 g, 91.3 %; ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 11.90 (1H, bs, OH), 6.90 (1H, t, *J* = 7.5 Hz, HC=), 2.31 (2H, q, *J* = 7.5 Hz, CH₂), 2.19 (2H, dt, *J* = 7.5, 7.5 Hz, CH₂), 1.49 (2H, sext, *J* = 7.5 Hz, CH₂), 1.02 (3H, t, *J* = 7.5 Hz, CH₃), 0.95 (3H, t, *J* = 7.5 Hz, CH₃); ¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ 173.5 (C=O), 145.1 (HC=), 133.2 (C=), 30.5 (CH₂), 21.9 (CH₂), 19.6 (CH₂), 13.9 (CH₃), 13.8 (CH₃); IR_{max}: 2958.5,

1670.7, 1630.0, 1416.7, 1287.0, 1251.9, 915.2 cm^{-1} ; EI-HRMS: calculado para ($\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}_2$), 142.0994; encontrado 142.0995.

(*R,E*)-3-(2-etilhex-2-enoil)-5,5-dimetil-4-feniloxazolidin-2-ona 13.

A una solución de **9** (387.1 mg, 2.72 mmol) en CH_2Cl_2 anhidro (16 mL) bajo atmósfera de argón se le adicionó cloruro de oxalilo (0.92 mL, 10.9 mmol) a 0 °C seguido de tres gotas de DMF anhidro. La mezcla de reacción se agitó por 30 minutos y a la misma temperatura y se continuó la agitación por cuatro horas más a temperatura ambiente. El cloruro de oxalilo y CH_2Cl_2 remanente se evaporaron para generar el cloruro de acilo **10** correspondiente como un líquido marrón viscoso. En otro matraz a una solución de la oxazolidinona quiral **12** (473.4 mg, 2.47 mmol) en THF anhidro (15 mL), se adicionó *n*-BuLi (2.5 M en hexano, 1.18 mL) gota a gota a -78 °C. La mezcla de reacción se agitó por 45 minutos y entonces se adicionó una solución de cloruro de acilo en THF anhidro (10 mL) y se agitó por 10 minutos a la misma temperatura. La mezcla de reacción se agitó por 18 horas a temperatura ambiente y se detuvo con una solución acuosa de NH_4Cl (10 mL) saturada, el THF se removió bajo vacío y el residuo se disolvió en CH_2Cl_2 y se extrajo con CH_2Cl_2 (3 x 30 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 , se filtró y concentró bajo vacío. El producto crudo se purificó por cromatografía en columna en gel de sílice con hexano/acetato de etilo (9:1) como eluyente para generar **13** como un líquido viscoso, 470.1 mg, 60.2 %. $[\alpha]_D^{26} = -22.8^\circ$ (c 1.75, CHCl_3); ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 7.38-7.31 (3H, m, Ph), 7.19 (2H, d, $J = 7.0$ Hz, Ph), 6.09 (1H, t, $J = 7.5$ Hz, HC=), 5.13 (1H, s, CHN), 2.40 (2H, m, CH_2), 2.21 (2H, qd, $J = 7.5, 2.0$ Hz, CH_2), 1.62 (3H, s, CH_3), 1.50 (2H, sext, $J = 7.5$ Hz, CH_2), 1.01 (3H, s, CH_3), 0.98 (3H, t, $J = 7.5$ Hz, CH_3), 0.97 (3H, t, $J = 7.5$ Hz, CH_3); ^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ 171.3 (C=O), 152.8 (C=O), 138.8 (HC=), 136.8 (C=), 135.7, 128.7, 128.5, 126.0 (Ph), 82.0 (C-O), 67.5 (C-N), 30.1 (CH_2), 28.2 (CH_3), 24.0 (CH_3), 22.0 (CH_2), 21.2 (CH_2), 13.8 (CH_3), 13.2 (CH_3); IR_{max} : 2975.4, 1776.6, 1687.4, 1321.6, 1260.2, 743.0, 694.7 cm^{-1} ; EI-HRMS: calculado para ($\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{NO}_3$), 315.1834; encontrado 315.1847.

(*R*)-3-[(*R*)-2-etilhexanoil]-5,5-dimetil-4-feniloxazolidin-2-ona 14.

A una solución de **13** (279.4 mg, 0.88 mmol) en etanol anhidro (15 mL), se adicionó Pd/C (55.8 mg, 10 wt %) y se agitó bajo presión ordinaria de hidrógeno (globo) a 25 °C por 16 horas. La mezcla resultante se diluyó con CH₂Cl₂, se filtró a través de celita y se lavó con CH₂Cl₂ (3 x 20 mL). El filtrado se evaporó para generar una mezcla de diastereoisómeros **14a** y **14b** en rendimiento cuantitativo. Los diastereoisómeros **14a** y **14b** se aislaron por una cromatografía en columna en gel de sílice con hexano/ acetato de etilo (97:3) como eluyente. El diastereoisómero **14a** fue un líquido viscoso, 138 mg, 49.1 %.; $[\alpha]_D^{25} = -67.3^\circ$ (c 1.45, CHCl₃); ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 7.38-7.30 (3H, m, Ph), 7.15 (2H, dd, *J* = 8.5, 1.5 Hz, Ph), 5.10 (1H, s, CHN), 3.84 (1H, m, CH), 1.72-1.61 (2H, m, H_a-3, H_a), 1.60 (3H, s, CH₃), 1.55-1.43 (2H, m, H_b-3, H_b), 1.35-1.23 (4H, m, CH₂-4, CH₂-5), 1.00 (3H, s, CH₃), 0.88 (3H, t, *J* = 7.0 Hz, CH₃-6), 0.78 (3H, t, *J* = 7.0 Hz, CH₃); ¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ 176.7 (C=O), 153.0 (C=O), 136.6, 128.8, 128.5, 126.4 (Ph), 82.0 (C-O), 67.2 (C-N), 44.1 (CH), 31.4 (CH₂), 29.6 (CH₂), 29.0 (CH₃), 25.4 (CH₂), 23.5 (CH₃), 22.8 (CH₂), 14.0 (CH₃), 11.3 (CH₃); IR_{max}: 2929.6, 1759.4, 1689.0, 1322.4, 1216.8, 1160.4, 1090.0, 744.7, 694.8 cm⁻¹; EI-HRMS: calculado para (C₁₉H₂₇NO₃), 317.1991; encontrado 317.2044.

(R)-3-[(S)-2-etilhexanoil]-5,5-dimetil-4-feniloxazolidin-2-ona 14b.

El diastereoisómero **14b**, fue un líquido viscoso, 132 mg, 47 %.; $[\alpha]_D^{24} = -38.9^\circ$ (c 1.65, CHCl₃); ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 7.38-7.31 (3H, m, Ph), 7.15 (2H, dd, *J* = 8.5, 1.5 Hz, Ph), 5.11 (1H, s, CHN), 3.87 (1H, m, CH), 1.71-1.61 (2H, m, H_a-3, H_a), 1.59 (3H, s, CH₃), 1.57-1.39. (2H, m, H_b-3, H_b), 1.25-1.18 (2H, m, CH₂-4), 1.13-1.06 (2H, m, CH₂-5), 1.00 (3H, s, CH₃), 0.92 (3H, t, *J* = 7.0 Hz, CH₃-6), 0.80 (3H, t, *J* = 7.0 Hz, CH₃); ¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ 176.7 (C=O), 153.0 (C=O), 136.6, 128.7, 128.5, 126.4 (Ph), 81.8 (C-O), 67.1 (C-N), 44.1 (CH), 31.8 (CH₂), 29.0 (CH₂), 28.9 (CH₃), 25.2 (CH₂), 23.5 (CH₃), 22.7 (CH₂), 13.9 (CH₃), 11.7 (CH₃); IR_{max}: 2929.6, 1766.8, 1689.0, 1322.4, 1216.9, 1160.4, 1082.6, 744.7, 702.1 cm⁻¹. EI-HRMS: calculado para (C₁₉H₂₇NO₃), 317.1991; encontrado 317.2004.

Bis[(S)-2-etilhexil]ftalato 1'

A una solución de anhídrido ftálico **16** (50 mg, 0.33 mmol) en tolueno (10 mL) se adicionaron, (S)-2-etilhexan-1-ol **15b** (106 mg, 0.81 mmol) y una cantidad catalítica de ácido *p*-toluen sulfónico (6.4 mg) a temperatura ambiente. Al matraz de reacción se acoplaron una trampa Dean-Stark y un tubo condensador y se reflujo la reacción por cuatro horas. El tolueno remanente se evaporó y el residuo se disolvió en etanol y agua. La fase orgánica se lavó con agua (3 x 15 mL) y con una solución saturada acuosa de NaHCO₃ (15 mL). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄, se filtró y concentró a vacío. El producto crudo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice con hexano/acetato de etilo (95:5) como eluyente para generar **1'** como un líquido viscoso, 90 mg, 68.3 %. $[\alpha]_D^{24} = + 17.1^\circ$ (c 1.0 Hex); ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 7.71 (1H, dd, *J* = 3.0, 6.0 Hz Ph), 7.54 (1H, dd, *J* = 3.0, 6.0 Hz, Ph), 4.24 (1H, dd, *J* = 6.0, 11.0 Hz, CH_aH_b), 4.20 (1H, dd, *J* = 6.0, 11.0 Hz, CH_aH_b), 1.69 (1H, m, CH), 1.42 (2H, dd, *J* = 7.0, 7.5 Hz, CH₂), 1.35 (2H, t, *J* = 6.0 Hz, CH₂), 1.30 (4H, m, CH₂), 0.93 (3H, d, *J* = 7.5 Hz, CH₃), 0.90 (3H, d, *J* = 7.5 Hz, CH₃); ¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ 167.8 (C=O), 132.5 (Cq), 130.8, 128.8 (Ph), 68.1 (C-O), 38.4 (CH), 30.1 (CH₂), 28.9 (CH₂), 23.8 (CH₂), 23.0 (CH₂), 14.0 (CH₃), 10.8 (CH₃); IR_{max}: 2963.4, 2927.6, 2861.0, 1718.4, 1465.1, 1271.6, 1120.8, 1066.0, 739.9 cm⁻¹; EI-HRMS: calculado para (C₂₄H₃₈O₄), 390.2770; encontrado 390.2779.

7- BIBLIOGRAFÍA

1. Gutierrez-Ravelo, A.; Estevez-Braun, A. *Rev. R. Acad. Cienc. Exact. Fís. Nat. (Esp)*, **2009**, *103*, 409-419.
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. Meadows, M. P. (1993). *Bacillus thuringiensis* in the environment: ecology and risk assessment. En: Enwiwistle, P, Cory JS, Bailey MJ, Higgs S (eds). *Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide: Theory and Practice*. Wiley, New York, N.Y. pp: 193-220.
6. Demain, A.L. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **1999**. *52*, 455-463.
7. Daiem, M.M.A.; Rivera-Utrilla, J.; Ocampo-Perez, R.; Mendez-Diaz, J.D.; Sanchez-Polo, M. *Journal of Environmental Management*, **2012**, *109*, 164–178.
8. Gao D.-W.; Wen, Z.-D. *Science of the Total Environment*, **2016**, *541*, 986-1001.
9. Magdoui, S.; Daghrir, R.; Brar, S.K.; Drogui P.; Tyagi, R.D. *Journal of Environmental Management*, **2013**, *270*, 36-49.
10. Net, S.; Sempere, R.; Delmont, A.; Paluselli A.; Ouddane, B. *Environmental Science and Technology*, **2015**, *49*, 4019–4035.
11. Park, M.A.; Hwang, K.A.; Lee, H.R.; Yi, B.R.; Jeung, E.B.; Choi, K.C. *Molecular Medicine Reports*, **2012**, *5*, 761–766.
12. Ortiz, A.; Sansinenea, E. *J. Chem.* **2018**, *6040814*, 1-7.
13. Clausen, P.A.; Liu, Z.; Kofoed-Sorensen, V.; Little J.; Wolkoff, P. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, *46*, 909–915.
14. Staples, C.A.; Peterson, D.R.; Parkerton T.F.; Adams, W.J. *Chemosphere*, **1997**, *35*, 667–749.
15. Lambrot, R.; Muczynski, V.; Lecureuil, C.; Angenard, G.; Coffigny, H.; Pairault, C.; Moison, D.; Frydman, R.; Habert R.; Rouiller-Fabre, V. *Environ. Health Perspect.* **2009**, *117*, 32-37.

16. Jonsson, B.A.; Richthoff, J.; Rylander, L.; Giwercman A.; Hagmar, L. *Epidemiology*, **2005**, *16*, 487-493.
17. Pham, T.T.H.; Tyagi, R.D.; Brar S.K.; Surampalli, R.Y. *Chemosphere*, **2011**, *82*, 923-928.
18. Przybylinska P. A.; Wyszowski, M. *Ecol Chem Eng S.* 2016, *23*, 347-356.
19. Heudorf, U.; Mersch-Sundermann V.; Angerer, J. *International journal of hygiene and environmental health*, **2007**, *210*, 623-634.
20. Sejidov, F.T.; Mansoori, Y.; Goodarzi, N. *Journal of Molecular Catalysis A: chemical*, **2005**, *240*, 186-190.
21. Yu, L.Y.; Hu, Z.F.; Ma, Z.J. *Nat. Prod. Res.* 2015, *29*, 2087–2091.
22. Jeong, S.-Y.; Ishida, K.; Ito, Y.; Okada, S.; Murakami, M. *Tetrahedron Lett.* 2003, *44*, 8005–8007.
23. Yu, L.L.; Li, Z.Y.; Peng, C.S.; Li, Z.Y.; Guo, Y.W. *Helv. Chim. Acta* 2009, *92*, 607–612
24. Zhang, F.; Mulati, N.; Wang, Y.; Li, Y.; Gong, S.; Karthik, L.; Sun, W.; Li, Z. *J. Biotechnol.* 2019, *292*, 5–11.
25. Figueira, V. B. C.; Prabhakar, S.; Lobo, A. M. *ARKIVOC*, 2005, *14*, 14-19.
26. Semenov, A.A.; Enikeev, A.G.; Snetkova, L.V.; Permyakov, A.V.; Sokolova, N.A.; Dudareva, L.V. *Doklady Biochemistry and biophysics*, **2016**, *471*, 421-422.
27. Tian, C., Ni, J., Chang, F., Liu, S., Xu, N., Sun, W., Xie, Y., Guo, Y., Ma, Y., Yang, Z., Dang, C., Huang, Y., Tian Z., Wang, Y. *Scientific Reports*, **2016**, *6*, 19791.
28. Ostrowski, K.O.; Lichte, D.; Stuck, M.; Vorholt, A. J. *Tetrahedron* **2016**, *72*, 592-598.
29. Chakraborty, D.; Gowda, R.R.; Malik P. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 6553-6556.
30. Davies, S.G.; Elend, D. L. Jones, S. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 7837-7851.
31. Jiménez, J.; Lopez, M.; Carranza, V.; Mendoza, A.; Varela, J.; Sansinenea, E.; Ortiz, A. *Tetrahedron Lett.* **2017**, *58*, 235-239.

32. Prashad, M; Har, D.; Kim, H.-Y.; Repic, O. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 7067-7070.
33. Hodgson, D.M.; Kaka, N.S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 9958-9960.
34. Ding, L.; Li, Z.-H.; Lu, X.-W.; Wu, Y.; Li, Y. *Synthesis*, **2012**, *44*, 3296-3300.
35. Sejidov, F. T.; Mansoori, Y.; Goodarzi, N. J. *Mol. Catal. A: Chem.*, **2005**, *240*, 186-190.