



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

POSGRADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**“Aislamiento, caracterización e identificación de
compuestos naturales en *Moniliophthora roreri*”**

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE

Maestría en Ciencias Químicas

PRESENTA:

Q.F.B. José Daniel Rosales Torres

Director

Dra. Estibaliz Sansinenea Royano

Co-Asesor

Dr. José Aurelio Ortiz Márquez

H. PUEBLA DE Z, mayo 2022



BUAP

A QUIEN CORRESPONDA:

Por este conducto la Comisión Revisora formada por la Dra. Martha Virginia Sosa Rivadeneyra, Dra. Rosa Luisa Meza León, Dra. Carmen María González Álvarez y la Dra. Gabriela Huelgas Saavedra, informan haber leído y aprobado para su impresión, la tesis denominada **“Aislamiento, caracterización e identificación de compuestos naturales en Monilophthora roreri”**, que presenta el alumno **José Daniel Rosales Torres** para obtener el grado de Maestro en Ciencias Químicas.

Se extiende la presente a los veintiocho días del mes de abril del año dos mil veintidós.

ATENTAMENTE

Dra. Martha Virginia Sosa Rivadeneyra

Dra. Rosa Luisa Meza León

Dra. Carmen María González Álvarez

Dra. Gabriela Huelgas Saavedra

Índice

1. INTRODUCCIÓN	5
2. ANTECEDENTES	8
2.1 Productos naturales	8
2.2 Moniliophthora roreri un hongo fitopatógeno	9
2.3 Importancia de Moniliophthora roreri en biotecnología	11
2.4 Importancia de los compuestos aislados en este trabajo	14
3. OBJETIVOS	18
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
5. PARTE EXPERIMENTAL	32
6. CONCLUSIONES	35
7. BIBLIOGRAFIA	36

Resumen.

El presente trabajo de tesis fue desarrollado en el área de productos naturales el cual tuvo como finalidad aislar, caracterizar e identificar metabolitos secundarios del hongo *Moniliophthora roreri* por lo que este hongo se sembró en un medio de cultivo que le proporciona nutrientes para su óptimo crecimiento y bajo ciertas condiciones de temperatura y agitación para que desarrollara compuestos orgánicos que pudieran tener un gran potencial de interés biológico y/o industrial.

Una vez que los hongos produjeron sus metabolitos se realizó una extracción del medio de cultivo sin células con acetato de etilo para obtener un extracto crudo de todos sus metabolitos generados por *Moniliophthora roreri*, partiendo de este extracto crudo se realizó la separación y purificación de los compuestos producidos mediante cromatografía en columna, y placa preparativa.

Finalmente, con los compuestos ya puros se realizó la elucidación de su estructura química mediante métodos espectroscópicos de Resonancia magnética nuclear: unidimensional RMN de ^1H , RMN de ^{13}C , y dimensional HSQC, COSY y HR-MS.

Abstract

This thesis work was developed in the area of natural products, which had the purpose of isolating, characterizing and identifying secondary metabolites of *Moniliophthora roreri*, so this fungus was cultured in a medium that would provide nutrients for its optimal growth and under certain conditions of temperature and stirring to produce organic compounds that could have a great potential of biological and/or industrial interest.

Once the fungi produced their metabolites, an extraction of the culture medium without cells with ethyl acetate was carried out to obtain a crude extract containing all metabolites produced by *Moniliophthora roreri*, starting from this crude extract, the separation and purification of the compounds was carried out by column chromatography, TLC and preparative plate.

Finally, with the pure compounds, the elucidation of their chemical structures was carried out by nuclear magnetic resonance spectroscopic methods: NMR ¹H, NMR ¹³C, HSQC, COSY and HR-MS.

1- INTRODUCCIÓN

Gracias al estudio de la química de productos naturales se han logrado grandes avances que contribuyen al desarrollo de la medicina y las ciencias agrícolas principalmente, ya que esta disciplina ha permitido la obtención de compuestos altamente útiles para la humanidad tal es el caso icónico de los antibióticos, pesticidas y una gran cantidad de compuestos que son la solución a muchos de los problemas que enfrenta la humanidad [1].

La disciplina que se aplica para la búsqueda de nuevos compuestos de origen natural que puede ser vegetal, animal, fúngico o bacteriano se le denomina química de productos naturales. Se consideran productos naturales a todos los compuestos orgánicos provenientes del metabolismo secundario, que se producen en ese organismo vivo como respuesta ante las condiciones externas ya sea estrés hídrico, térmico, de superpoblación y radiante, siendo en general señales químicas frente a plagas, patógenos y simbiosis con otros organismos. Estos son justamente compuestos de interés porque poseen en su estructura química algunas subestructuras que son bioactivas en organismos animales, incluido el hombre [2].

La mayoría de estos compuestos poseen bajo peso molecular o intermedio y están representados por algunos grupos principales como son: terpenoides y sus glicósidos, alcaloides y agliconas, O y C-glicósidos de flavonoides, o bien, O-glicósidos acilados en distintas posiciones, biflavonoides, proantocianinas diméricas y oligoméricas. También se incluyen compuestos de alto peso molecular, como, por ejemplo: glicopéptidos, péptidos y proteínas que se forman bajo circunstancias determinadas y que no son consecuencia del metabolismo de base o primario [2].

Para obtener los compuestos orgánicos de interés de la fuente natural identificada se requiere seguir las siguientes etapas: 1) Extracción, 2) Aislamiento, 3) Purificación y 4) Determinación estructural. Diversas técnicas extractivas y cromatográficas están involucradas en cada una de estas etapas, en particular en las tres primeras. En cuanto a la cuarta etapa, ha dado lugar al desarrollo de la

llamada Química Estructural, Química Orgánica Estructural, Química Orgánica Molecular, así como también Química Molecular Medicinal cuando se incluye la bioactividad y su relación con la estructura [2].

Los hongos se encuentran ampliamente distribuidos en el planeta, son responsables de causar el deterioro de diferentes productos industriales y comerciales, generando graves pérdidas económicas para el hombre. Varios de ellos en su condición de parásitos pueden incluso infectar y dar lugar a diversas enfermedades en plantas y animales. Pero no todo es perjudicial por parte de estos organismos, ya que ellos son responsables de ciclos naturales de recambio de nutrientes contribuyendo a una mayor fertilidad de la tierra. Además, su crecimiento y sus procesos metabólicos pueden ser usados para beneficio humano y ecológico en la elaboración de múltiples productos y síntesis de una variedad de moléculas con propiedades químico-biológicas interesantes y de un alto valor agregado como son: antibióticos, inmunomoduladores, antiolesterolémicos, antitumorales, agentes con actividad de superficie y agentes de biocontrol [3].

Hay una gran variedad de hongos que poseen actividad biológica en el mundo y de ellos se pueden extraer los metabolitos secundarios responsables y adecuados para el tratamiento de distintas enfermedades. Ejemplos de ellos son *Penicillium chrysogenum* (*P. chrysogenum*), *Ganoderma lucidum* (*G. lucidum*), *Trametes versicolor* (*T. versicolor*), *Schizophyllum commune* (*S. commune*), *Pleurotus mutilus* (*P. mutilus*), *Lentinula edodes* (*L. edodes*) que se han usado en el tratamiento de padecimientos físicos. Un ejemplo que ha adquirido gran relevancia es *Psilocybe cubensis* (*P. cubensis*) un hongo que tiene propiedades alucinógenas útiles en el tratamiento de enfermedades mentales. Los metabolitos secundarios de mayor importancia para la industria médica son la penicilina y la tiamulina como antibióticos los cuales han sido de los más vendidos desde su descubrimiento, los triterpenos por su actividad anticancerígena, diversos tipos de polisacáridos que tienen actividad antioxidante, antiparasitarios, estimulantes del sistema inmune y

reguladores del colesterol y el alucinógeno psilocibina con un gran potencial de efectividad en tratamientos de psicoterapia [4].

M. roreri es un hongo basidiomiceto fitopatógeno perteneciente a la familia Marasmiaceae del orden Agaricales y es el agente causal de moniliasis (enfermedad que afecta al cacao) por lo que tiene gran importancia en el ámbito agronómico ya que la presencia de este hongo en los cultivos de cacao representa grandes pérdidas del cultivo y por ende pérdidas económicas; sin embargo, poco se ha estudiado de los beneficios que este hongo podría contribuir a la humanidad ya que se ha demostrado la producción de metabolitos secundarios con un gran potencial de utilidad [5].

Poco se ha investigado de los metabolitos secundarios de *M. roreri* por lo que este proyecto contribuirá a generar más información al respecto para poder así contribuir a la química de productos naturales siendo el objetivo principal de este proyecto el aislar, caracterizar e identificar productos naturales de *M. roreri* mediante técnicas de RMN.

2- ANTECEDENTES.

2.1- Productos naturales

A lo largo de la historia se han descubierto una gran cantidad de compuestos útiles para el humano que han sido desarrollados a partir de productos naturales, es decir, de metabolitos derivados de seres vivos, tales como microorganismos, plantas o animales. Estos compuestos han sido utilizados para el beneficio del humano a lo largo de su existencia, y las plantas han sido la fuente principal de estos compuestos, sobre todo en el campo de la medicina. A partir de las plantas se han descubierto medicamentos ampliamente utilizados, como el ácido salicílico o la artemisinina, la conocida droga contra la malaria que fue aislada de *Artemisia annua*, una planta popular en la medicina china. De hecho, se estima que hay por lo menos 200,000 metabolitos naturales con propiedades bioactivas [6].

Los microorganismos empezaron a tomar mucha relevancia científica a partir de que Louis Pasteur descubrió el proceso de fermentación y poco tiempo después gracias al descubrimiento de la penicilina a partir del hongo *Penicillium notatum* por el científico Alexander Fleming, dio comienzo la era de los antibióticos y se les dio una gran importancia a los hongos como organismos capaces de producir compuestos útiles en medicina. Hay que recordar que los hongos son organismos superiores eucariontes en comparación con las bacterias que son organismos procariontes y mucho más sencillos en su metabolismo primario y secundario [7].

En la actualidad con la aparición de nuevas tecnologías en el área de la química y biología molecular que permiten el desarrollo de compuestos antimicrobianos, se ha propiciado que disminuya el interés en los productos naturales como fuente de medicamentos. Esto aunado a otras desventajas de trabajar con productos naturales como es que son procesos costosos y dispendiosos, ya que es difícil obtenerlos y cuando se obtienen ocurre en muy bajas concentraciones, además de que la química requerida para procesarlos es compleja y estos procesos demandan tiempo [8]. Sin embargo, esto no quiere decir que los esfuerzos para buscar nuevos compuestos antimicrobianos a partir de productos

naturales deban desaparecer. De hecho, cerca de la mitad de los fármacos aprobadas desde 1994 hasta 2007 se basaron en productos naturales [9].

Los hongos son potencialmente una gran fuente para la búsqueda de compuestos útiles para las industrias farmacéuticas y agroquímicas. Es así como seis de cada veinte de los fármacos más comúnmente prescritos son de origen fúngico pese a que tan sólo se han descrito 100,000 especies de hongos de un estimado total de 2.2 a 3.8 millones de especies [10, 11]. Además, son una gran fuente de metabolitos secundarios, aunque normalmente se definen como no esenciales para la vida, sus roles pueden variar bastante y pueden presentar bioactividad [12].

2.2- *Moniliophthora roreri* un hongo fitopatógeno

Moniliophthora roreri se considera un hongo basidiomiceto fitopatógeno, es decir que ataca a las plantas, perteneciente a la familia Marasmiaceae del orden Agaricales [13]. El organismo se caracteriza por atacar únicamente frutos de diversas especies de los géneros botánicos *Herrania* y *Theobroma*, que son las plantas productoras del fruto del cacao, por lo que se considera el agente causal de la enfermedad llamada moniliasis en el cacao (Figura 1).



Figura 1. Fruto de cacao tipo trinitario infectado por *M. roreri* en una plantación de cacao, Ranchería Galeana segunda sección, Jalpa de Méndez, Tabasco, México.

El interés por el rubro del cacao ha resurgido gracias a los buenos precios que registra el grano en el mercado internacional y al potencial del país y la región para producir cacao “fino” o de aroma para la producción de chocolates gourmet con destino a mercados nicho que están dispuestos a pagar un mejor precio por estos productos (Figura 2).



Figura 2. Plantación de cacao y su fruto

La Moniliasis, enfermedad que ataca únicamente el fruto, puede afectar la mayoría de éstos cuando las plantaciones están mal manejadas, principalmente con exceso de sombra, falta de poda y altura excesiva, que dificulta la realización de todas las prácticas de manejo de la plantación, incluyendo la cosecha y el retiro periódico de frutos afectados por la enfermedad (Figura 3). La infestación en plantas de cacao resulta evidente cuando la especie fitopatógena causa daños necróticos en el tejido interno del fruto, lo que culmina en la mayoría de los casos en la pérdida de éste [14, 15]. Debido a que el cacao es un cultivo costoso, la infestación de los plantíos por este hongo representa pérdidas millonarias para el sector agropecuario que cultiva estas plantas. En una plantación de cacao desatendida técnicamente la Moniliasis puede destruir hasta 95 de cada 100 frutos, lo que hace poco rentable el cultivo aun en épocas de precios adecuados en el mercado [16].



Figura 3. Moniliasis en los frutos de cacao

El patógeno causante de la Moniliasis es el hongo *Moniliophthora roreri*, un hongo de la clase Deuteromicete (Imperfectos) y del Orden Moniliales (Figura 4). Aún no se conoce su estado perfecto (sexual), por lo que se cree que su reproducción se realiza sólo asexualmente por conidios. Los conidios son las únicas estructuras (semillas) hasta ahora conocidas, capaces de causar infección [13].



Figura 4. El hongo *Moniliophthora roreri*, vista macroscópica y microscópica.

2.3- Importancia de *Moniliophthora roreri* en biotecnología.

Con el objetivo de tener una idea de los posibles compuestos que pudiera secretar este hongo se realizó una revisión bibliográfica, es decir cuántos genes y cuáles están relacionados con síntesis de compuestos importantes. Desde el punto de vista genético se ha estudiado lo suficiente para destacar que parte del genoma de *M. roreri* codifica proteínas relacionadas con fenómenos de retrotransposición, especies reactivas de oxígeno (ROS; Reactive Oxygen Species) y degradación de pared celular. Por otra parte, el considerable número de genes que codifica para las

enzimas citocromo P450 monooxigenasas, sugiere que el género *Moniliophthora* posee un gran potencial de detoxificación, al igual que síntesis de toxinas y distintos tipos de compuestos indólicos, lo que conferiría una alta capacidad de adaptación ambiental a sus especies fúngicas. El género en mención también es capaz de secretar polipéptidos ricos en cisteína, así como expresar genes involucrados en metilotropía y biosíntesis de hormonas de crecimiento vegetal (e.g. giberelinas y auxinas) [17].

Como se ha comentado este hongo es un fitopatógeno que causa daños profundos a la planta del cacao. Esto tiene que ver con algunos metabolitos y algunas proteínas o toxinas que sintetiza este hongo y que se involucran en rutas metabólicas que desencadenan respuestas sistémicas en la planta huésped. Todos estos compuestos están cobrando relevancia ya que se está investigando sobre ellos no solo desde el punto de vista de la biología molecular (síntesis intracelular) sino también en la funcionalidad que pueda tener cada metabolito aislado [18].

M. roreri recientemente ha tenido cierta relevancia en biotecnología ya que existen estudios que demuestran que puede ser útil en la degradación de microcontaminantes que comprenden sustancias disruptivas endocrinas, tóxicas, persistentes y bioacumulativas como los EDC (por sus siglas en inglés “endocrine disrupting chemicals”) y los AINE (fármacos Antiinflamatorios no esteroideos) ya que tienen la capacidad de producir una enzima lacasa, llamada Mrl2, altamente efectiva en la degradación de estos contaminantes y se está evaluando su utilización para resolver este problema de una manera eficiente y amigable con el medio ambiente [19]. Actualmente ya se han aislado y caracterizado algunos metabolitos secundarios que se muestran en la Figura 5 [20].

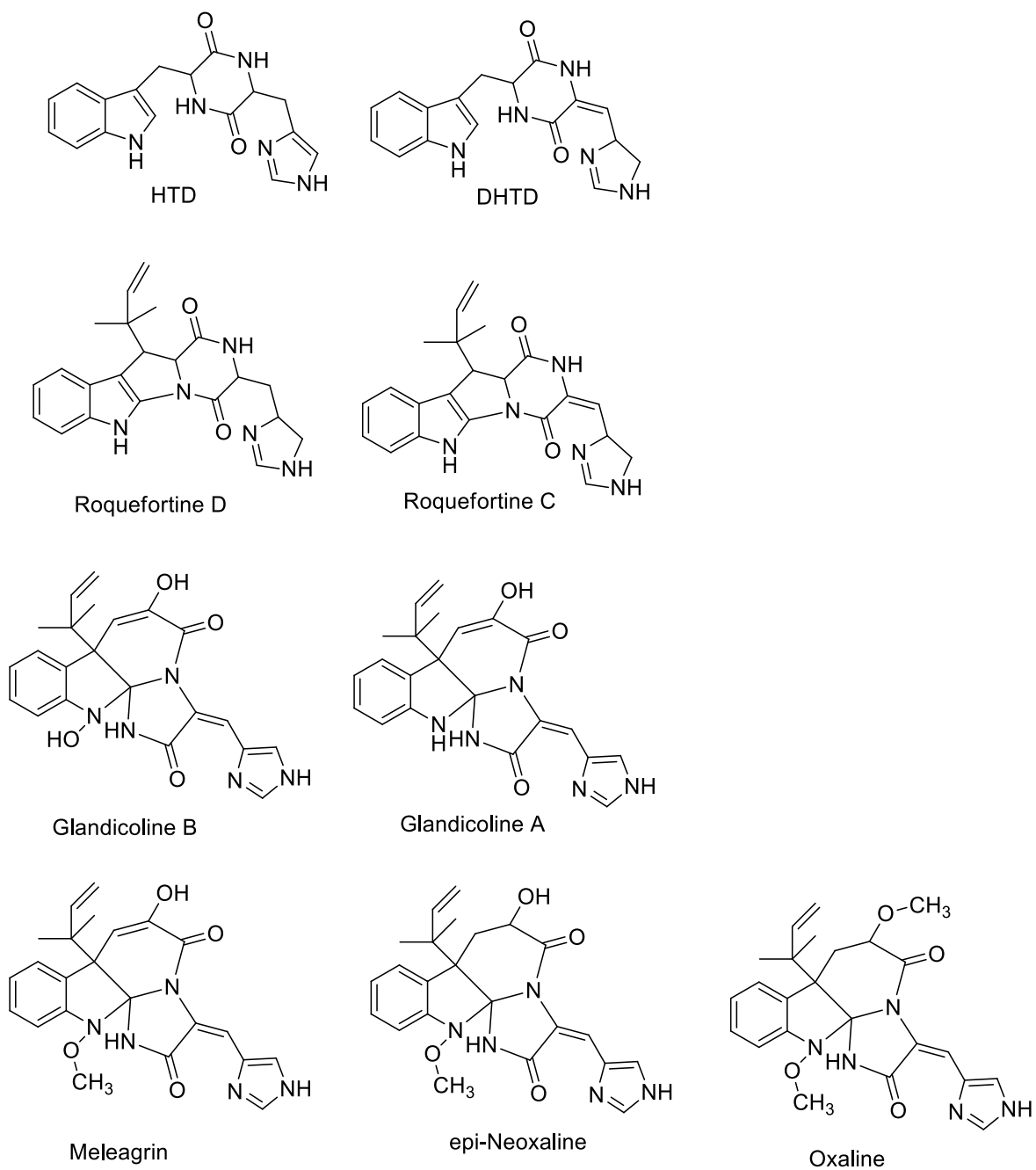


Figura 5. Metabolitos aislados en esporulación de *M. roreri* [20].

2.4- Importancia de los compuestos aislados en este trabajo

El benzoato de bencilo es el éster bencílico del ácido benzoico. Es un compuesto orgánico con la fórmula $C_6H_5CH_2O_2CC_6H_5$. Es el éster de alcohol bencílico y ácido benzoico. Forma un líquido viscoso o copos sólidos y tiene un olor balsámico dulce débil. Se presenta en varias flores (Nardos, jacintos) y es un componente del bálsamo del Perú y del bálsamo de Tolú.

El benzoato de bencilo es un compuesto orgánico que se utiliza como medicamento acaricida y repelente de insectos. El benzoato de bencilo está indicado para el tratamiento de piojos y liendres, enfermedad que se conocen científicamente como pediculosis y para la sarna conocida científicamente como escabiosis. Para la sarna, normalmente se prefiere la permetrina o el malatión. Se aplica sobre la piel en forma de loción. Normalmente se necesitan de dos a tres aplicaciones. También está presente en el bálsamo del Perú, el bálsamo de Tolú. El benzoato de bencilo se estudió médicamente por primera vez en 1918. Está en la Lista de medicamentos esenciales de la Organización Mundial de la Salud. Se utiliza como agente de carga de tintes, como solvente y en perfumería. También se utiliza como aroma en alimentación [21].

Existen varios métodos para la síntesis de benzoato de bencilo, uno es la reacción de ácido benzoico y alcohol bencílico; sin embargo, el complejo de $HfCl_4$ y tetrahidrofurano se utiliza como catalizador, que es caro y complejo [21].

Otro método para la síntesis directa de benzoato de bencilo es por autodiferenciación de benzaldehído. Usando $Al(OPh)_3$ y $ZnCl_2$ como catalizadores, el costo del catalizador es alto, el postratamiento es complejo y el rendimiento del producto objetivo es bajo. Otro método de síntesis directa de benzoato de bencilo por oxidación de alcohol bencílico a alta temperatura y presión tiene un alto precio, muchos subproductos y solo un 31% de rendimiento del producto objetivo, lo que es difícil de realizar a nivel industrial.

El benzoato de bencilo también se produce industrialmente por reacción de benzoato de sodio con alcohol bencílico en presencia de una base como la trietilamina. La trietilamina es inflamable, explosiva, tóxica, produce una fuerte

irritación y es peligrosa e insegura de usar. Por tanto, es urgente estudiar y solucionar la posibilidad de mejorar la tasa de conversión. También, se puede sintetizar mediante la reacción de Tishchenko, utilizando benzaldehído con bencilóxido de sodio como catalizador (Figura 6) [22].

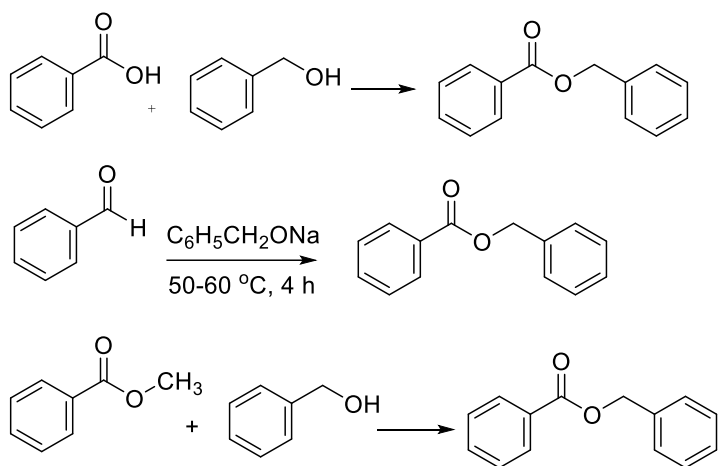


Figura 6. Diferentes síntesis empleadas para preparar benzoato de bencilo

Por otro lado, la piridina es un líquido incoloro de olor desagradable, similar al pescado en mal estado. Pertenece a la familia de los compuestos heterocíclicos aromáticos, y está estructuralmente relacionada con el benceno, siendo la única diferencia entre ellos el reemplazo de un grupo CH del anillo bencénico por un átomo de nitrógeno.

La piridina se presenta en un sinfín de compuestos relacionados con la vida (pero no en su forma pura), entre ellos el NAD, la nicotina, la vitamina B3 o niacina (cuya falta causa pelagra), y la vitamina B6 o piridoxina. Los derivados saturados de la piridina tales como la piperidina y las piperideínas también se encuentran presentes en compuestos tales como la conína, la manojirimicina, la peletierina, la mimosina, la anabasina y la anaferina. Algunas piridinas relacionadas con el ácido nicotínico son los alcaloides de la palma Areca (Arecolina, guvacina), la ricinina de las semillas del ricino, la hermidina de *Mercurialis annua* y la trigonelina de la alholva. Varias plantas de la familia Celastraceae producen ésteres del ácido

evonínico (ácido nicotínico enlazado con una molécula de ácido 2-metilbutírico) y sesquiterpenos tipo agarofurano [23].

Sin embargo, la piridina pura no está muy extendida en la naturaleza es una sustancia nociva si se la inhala, ingiere o si se absorbe por la piel. Reduce la fertilidad masculina y femenina y es considerada un carcinógeno. Los síntomas de exposición más comunes son: dolor de cabeza, tos, dificultad respiratoria, laringitis, náuseas y vómitos.

En la naturaleza, en su forma más perjudicial se la encuentra en las hojas y raíces de la belladona (*Atropa belladonna*) y en el malvavisco (*Althaea officinalis*) [23]. En la vida diaria se encuentran trazas de piridina como componentes volátiles de compuestos orgánicos que se generan en los procesos de tostación y enlatado.

Los métodos contemporáneos en la producción de piridina tienen un bajo rendimiento y una demanda creciente para el compuesto requiere de la búsqueda de nuevas rutas para sintetizarla. Un punto de inflexión ocurrió en 1924 cuando el químico ruso Alekséi Chichibabin desarrolló la Síntesis de piridina de Chichibabin, la cual utiliza reactivos relativamente baratos. En forma general, la reacción puede ser descrita como una reacción de condensación de aldehídos, cetonas, compuestos carbonílicos α,β -insaturados o cualquier combinación de las anteriores con amoníaco o aminas [24] (Figura 7). Específicamente, la piridina no sustituida se produce con formaldehído y acetaldehído los cuales son reactivos baratos y fácilmente disponibles. Primero, se forma la acroleína en una Condensación de Knoevenagel a partir del acetaldehído y el formaldehído. Es entonces cuando se condensa con acetaldehído y amoníaco formando dihidropiridina, luego se oxida con un catalizador en estado sólido a piridina. Este proceso ocurre en fase gaseosa a 400-450 °C. El producto, consiste de una mezcla de piridina, piridinas metiladas simples (picolina) y (lutidina); su composición depende del catalizador usado y por lo tanto, la reacción puede ser adaptada a las necesidades del que ejecuta la reacción. El catalizador es usualmente una sal de un metal de transición como fluoruro de cadmio (II) o fluoruro de manganeso (II), pero también pueden utilizarse compuestos de cobalto y talio. La piridina obtenida es separada de otros productos mediante un proceso de múltiples etapas.

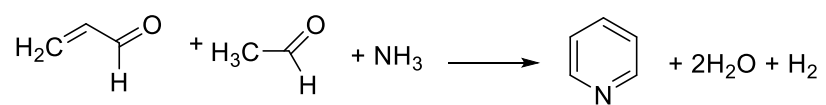
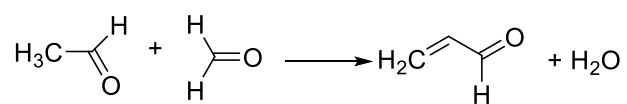


Figura 7. Síntesis de piridina de Chichibabin.

3- OBJETIVOS.

3.1- Objetivo general

Realizar la extracción, purificación e identificación de compuestos naturales del hongo llamado *Moniliophthora roreri*.

3.2- Objetivos particulares

- ❖ obtener un extracto crudo de un medio de cultivo inoculado con *Moniliophthora roreri*.
- ❖ Separar y purificar metabolitos secundarios mediante cromatografías en columna de gel de sílice a partir del extracto crudo.
- ❖ Identificar y elucidar estructuralmente los compuestos separados con técnicas espectroscópicas.

4- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Obtención del extracto crudo y purificación en columna

Se seleccionó una cepa del hongo fitopatógeno *Moniliophthora roreri* y se sembró en medio de cultivo líquido Czapek. Se obtuvo un preinóculo, se agregó al medio de cultivo líquido Czapek (1 L) y se incubó durante 30 días a 28 °C con agitación constante de 175 rpm.

Se filtró el medio y se realizó la extracción con acetato de etilo por triplicado. Posteriormente la fase orgánica recolectada se secó con sulfato de sodio y se concentró a presión reducida (con rotavapor) para obtener un extracto crudo oleoso (495 mg) de color café, el cual se procedió a separar y purificar los compuestos que contenía. Se utilizó una columna cromatográfica de gel de sílice como fase estacionaria y como fases móviles diferentes eluyentes de diferente polaridad tales como: hexano y acetato de etilo, como se muestra en la Tabla 1. Se identificaron dos fracciones interesantes que contenían dos compuestos que se pudieron elucidar.

Tabla 1: Sistemas empleados para fraccionar el extracto crudo

<i>FRACCIÓN</i>	<i>SISTEMA</i>	<i>PESO OBTENIDO (mg)</i>
1A	Hexano 100%	3
1B	Hexano 100%	0.4
2A	Hexano 90% AcOEt 10%	1
2B	Hexano 90% AcOEt 10%	213.3
3A	Hexano 80% AcOEt 20%	20.9
3B	Hexano 80% AcOEt 20%	24.7
4A	Hexano 70% AcOEt 30%	20
4B	Hexano 70% AcOEt 30%	11.2
5A	Hexano 50% AcOEt 50%	14.1
5B	Hexano 50% AcOEt 50%	18.6
6A	Hexano 20% AcOEt 80%	25.6
6B	Hexano 20% AcOEt 80%	12.3
7A	AcOEt 100%	13.1
7B	AcOEt 100%	8.4
8A	AcOEt 98% MeOH 2%	5.4
8B	AcOEt 98% MeOH 2%	10
9A	AcOEt 90% MeOH 10%	6.1
9B	AcOEt 90% MeOH 10%	21.8
10A	AcOEt 50% MeOH 50%	95.8
10B	AcOEt 50% MeOH 50%	41.1
11A	AcOEt 20% MeOH 80%	3.7
11B	AcOEt 20% MeOH 80%	0.2
12A	MeOH 100%	--
12B	MeOH 100%	--

4.2 Elucidación del compuesto 1

De una de las fracciones se pudo identificar el compuesto benzoato de bencilo (Figura 8).

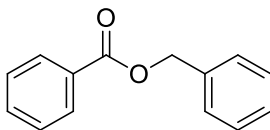


Figura 8. Benzoato de bencilo.

En la figura 9 se muestra el espectro de RMN de ^1H . Se observan varias señales en la zona de aromáticos. En 8.1 ppm se encuentra una señal doble que integra para dos hidrógenos. En 7.6 ppm se presenta una señal triple que integra para un hidrógeno, en 7.5 ppm se presenta un triplete que integra para dos hidrógenos. En 7.38 ppm se observa una señal múltiple que integra para cuatro hidrógenos y en 7.30 ppm una señal múltiple que integra para un hidrógeno. Esto da un total de 10 hidrógenos aromáticos diferentes ya que cinco están más desplazados. Además en 4.71 ppm se puede observar una señal simple que integra para dos hidrógenos que podría ser un CH_2 . Al estar más desplazado en esa posición hace suponer que podría estar unido a un átomo de oxígeno.

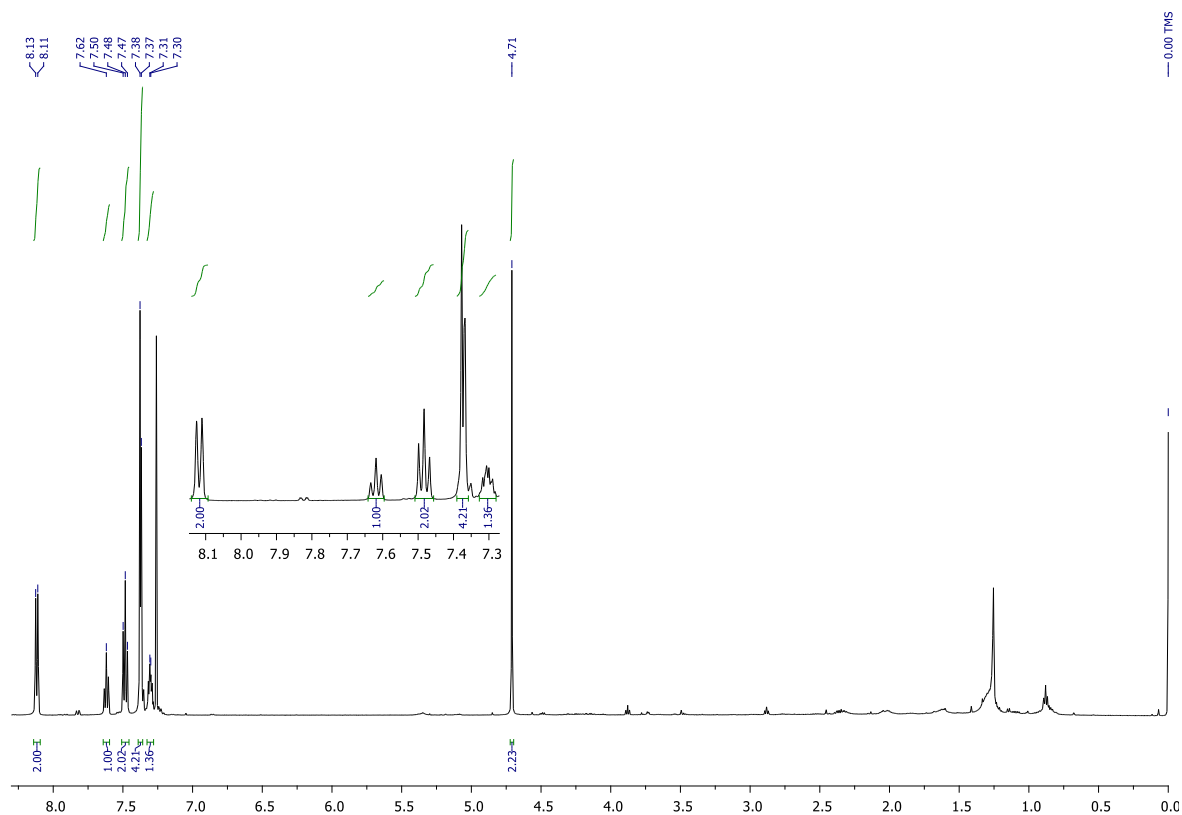


Figura 9. RMN de ^1H a 500 MHz en CDCl_3 del producto **1**.

En la figura 10 se muestra el espectro de RMN de ^{13}C . Se pueden apreciar diez carbonos diferentes. En 171 ppm se observa una señal característica de los carbonilos. En 141 y 129.4 ppm se observan dos señales que son características de carbonos cuaternarios. Entre 134 y 127 ppm se observan seis señales que podrían ser de aromáticos. Finalmente en 65.6 ppm se observa una señal simple que podría corresponder con el grupo CH_2 .

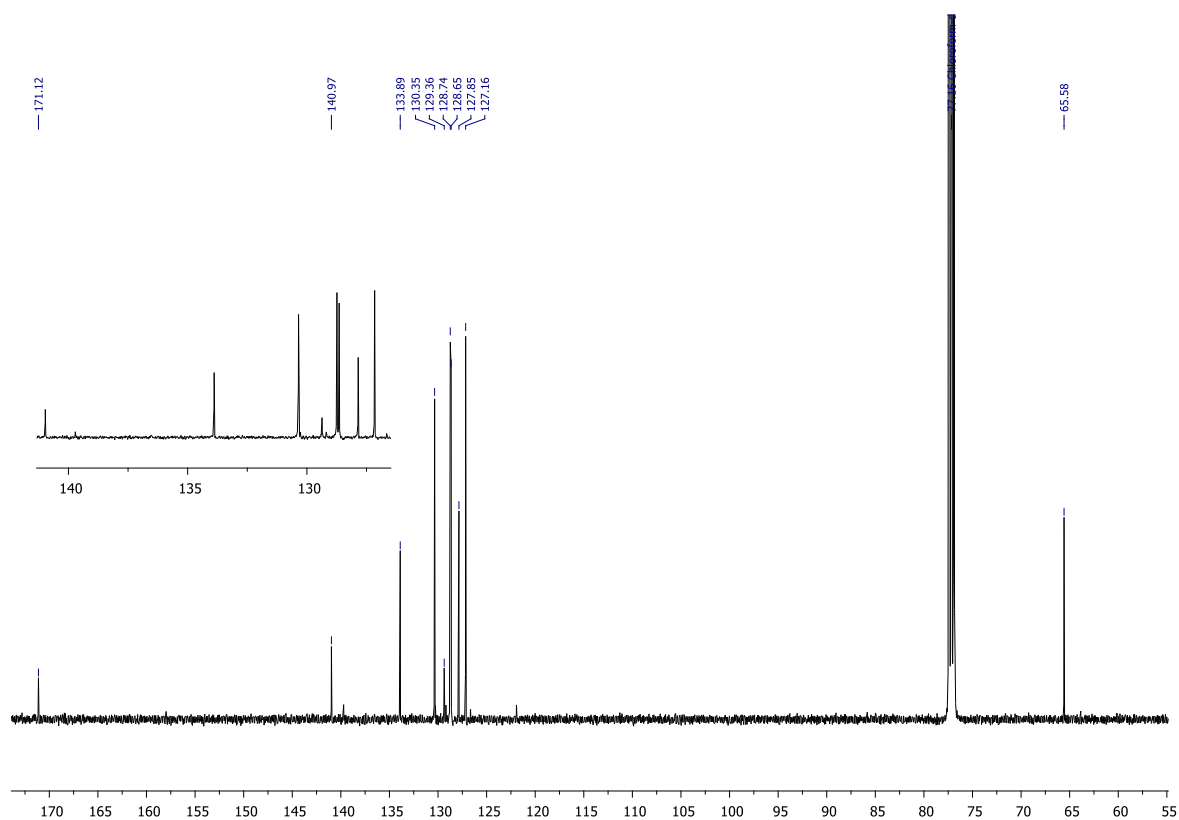


Figura 10. RMN de ^{13}C a 125 MHz en CDCl_3 del producto **1**.

Para poder establecer más claramente las señales si son CH o CH_2 se realizó un APT, como se observa en la figura 11, en donde los CH_2 , los carbonilos y los carbonos cuaternarios se encuentran hacia arriba y los CH y CH_3 hacia abajo. Esto ayuda a establecer qué carbonos son CH_2 en la molécula.

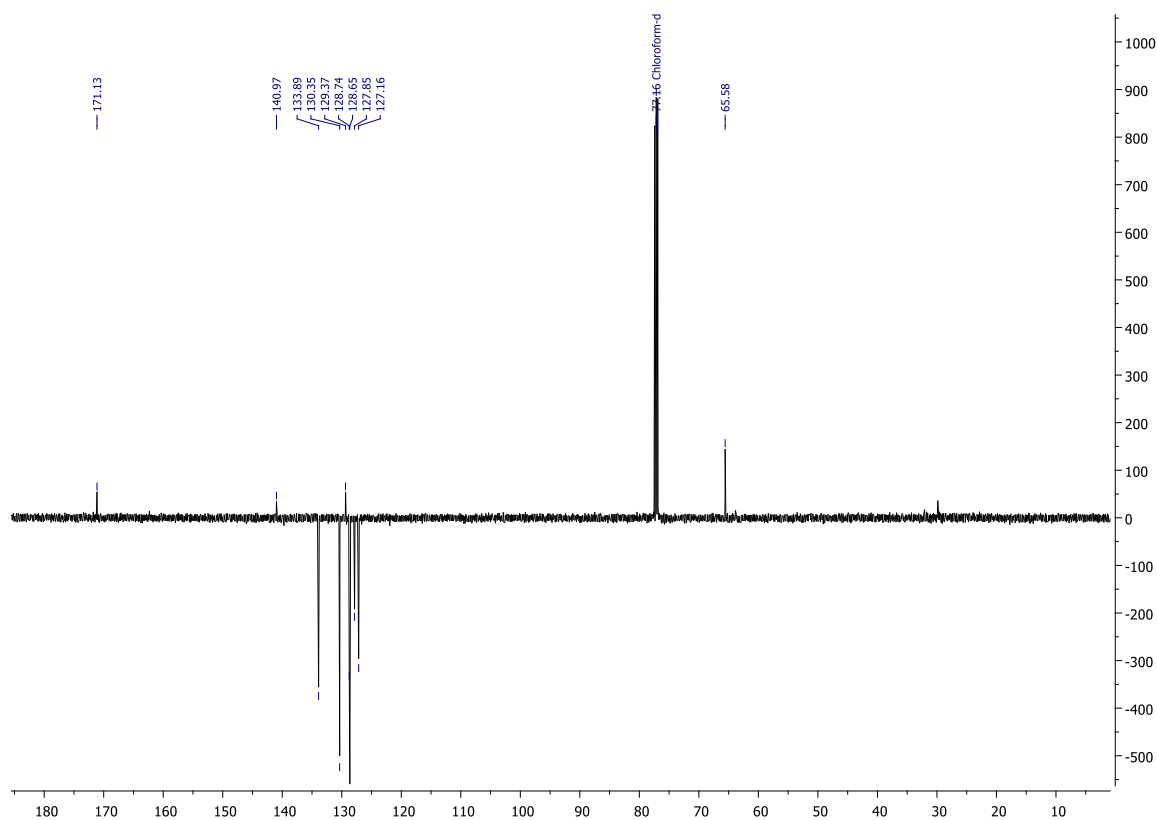


Figura 11. Espectro APT del producto **1**.

Para poder hacer una asignación inequívoca de los hidrógenos se procedió a obtener un espectro COSY, que se observa en la figura 12. Se puede observar que sólo los hidrógenos de los aromáticos se acoplan entre sí en cada sistema aromático.

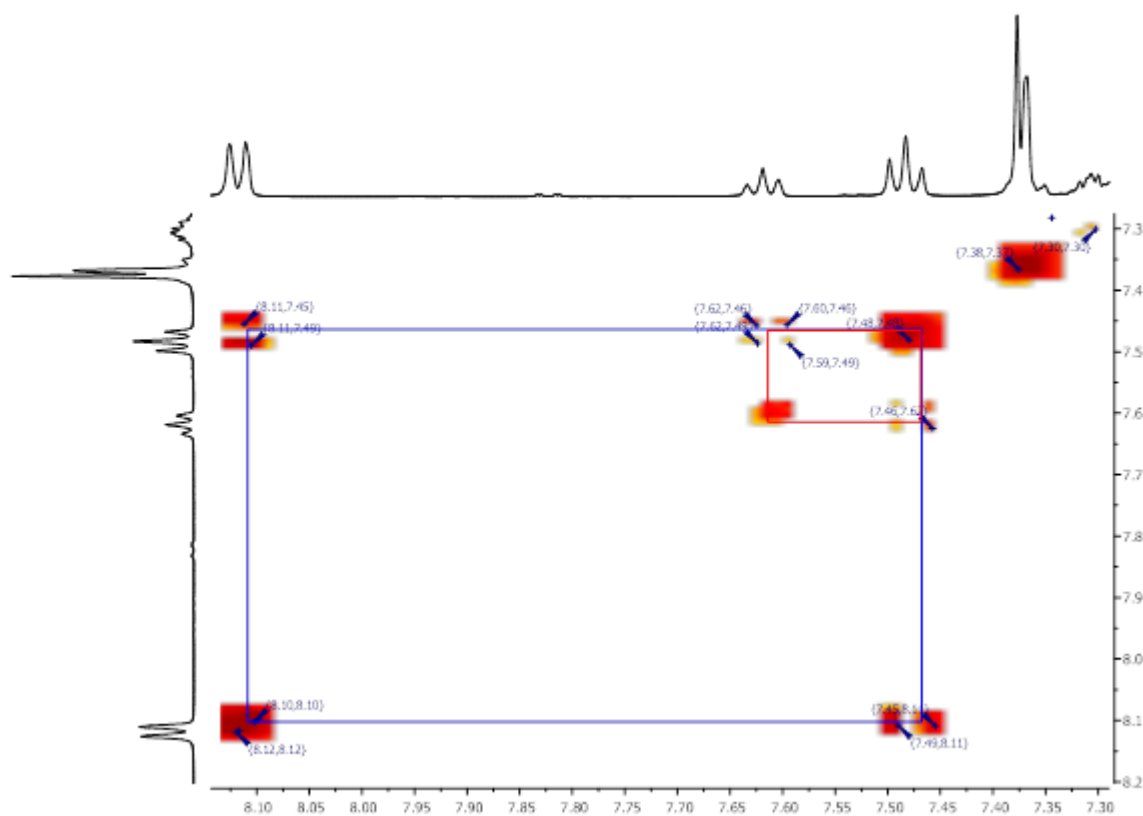


Figura 12. Espectro de RMN 2D COSY en CDCl_3 del producto **1**.

Con la idea de asignar también de manera inequívoca los carbonos de la molécula se obtuvo el espectro de RMN 2D HSQC, como se muestra en la figura 13. Se pueden observar como las señales de hidrógeno de los aromáticos se acoplan con los carbonos aromáticos en 134, 130.3, 128.7, 128.6, 127.8 y 127.2 ppm. La señal de hidrógeno de 4.7 ppm se acopla con la señal de carbono de 65.6 ppm que corresponde con un CH_2 .

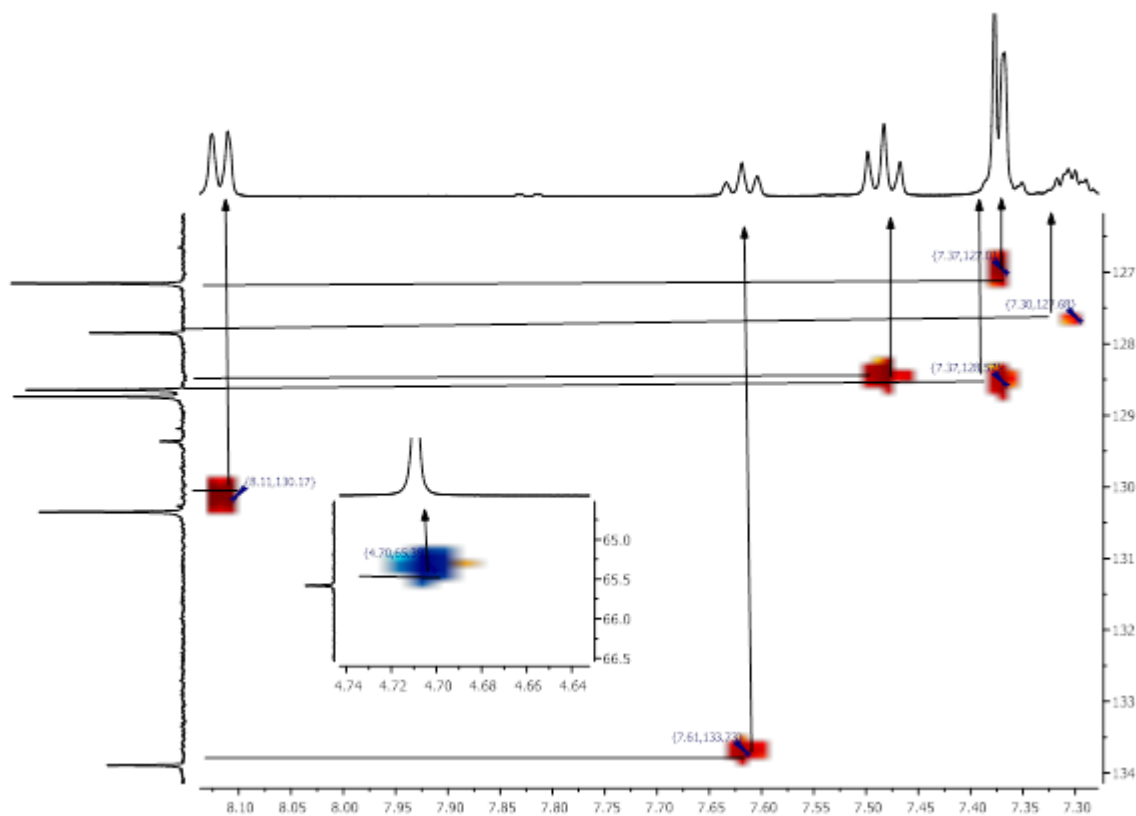


Figura 13. Espectro de RMN 2D HSQC en CDCl_3 del producto **1**.

Con todos los datos de espectroscopia, se logró elucidar el compuesto **1** como el benzoato de bencilo.

4.3 Elucidación del compuesto **2**

De otra de las fracciones se pudo identificar el compuesto piridina (figura 14). El procedimiento para poderlo identificar fue el mismo que con el compuesto **1** a través de los espectros de RMN de una y dos dimensiones.

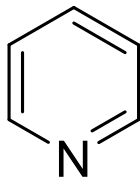


Figura 14. Estructura de la piridina

En la figura 15 se muestra el espectro de RMN de ^1H . Se observan sólo señales en la región de aromáticos y bastante desplazados lo que hace pensar en un átomo electronegativo cercano. En 8.1 ppm se observa una señal doble que integra para dos hidrógenos con una constante de acoplamiento $J = 7.5$ Hz. En 7.62 ppm se observa una señal triple que integra para un hidrógeno con una $J = 7.5$ Hz y finalmente en 7.48 ppm una señal triple que integra para dos hidrógenos con una $J = 7.5$ Hz.

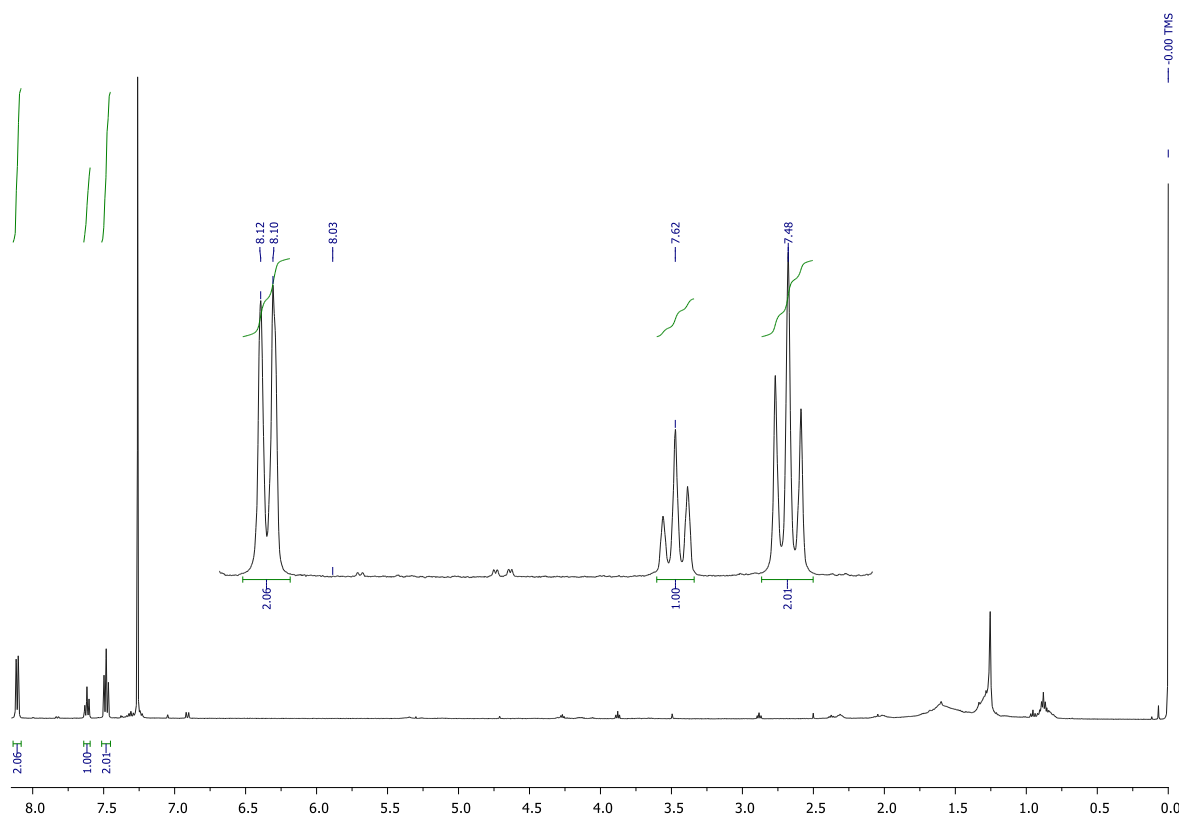


Figura 15. RMN de ^1H a 500 MHz en CDCl_3 del producto 2.

En la figura 16 se muestra el espectro de RMN de ^{13}C . Se pueden apreciar únicamente tres carbonos diferentes en 133.9, 130.3 y 128.7 ppm correspondientes a los carbonos aromáticos orto, meta y para. Esto hace que pensar que en el aromático se tiene un heteroátomo electronegativo como el nitrógeno.

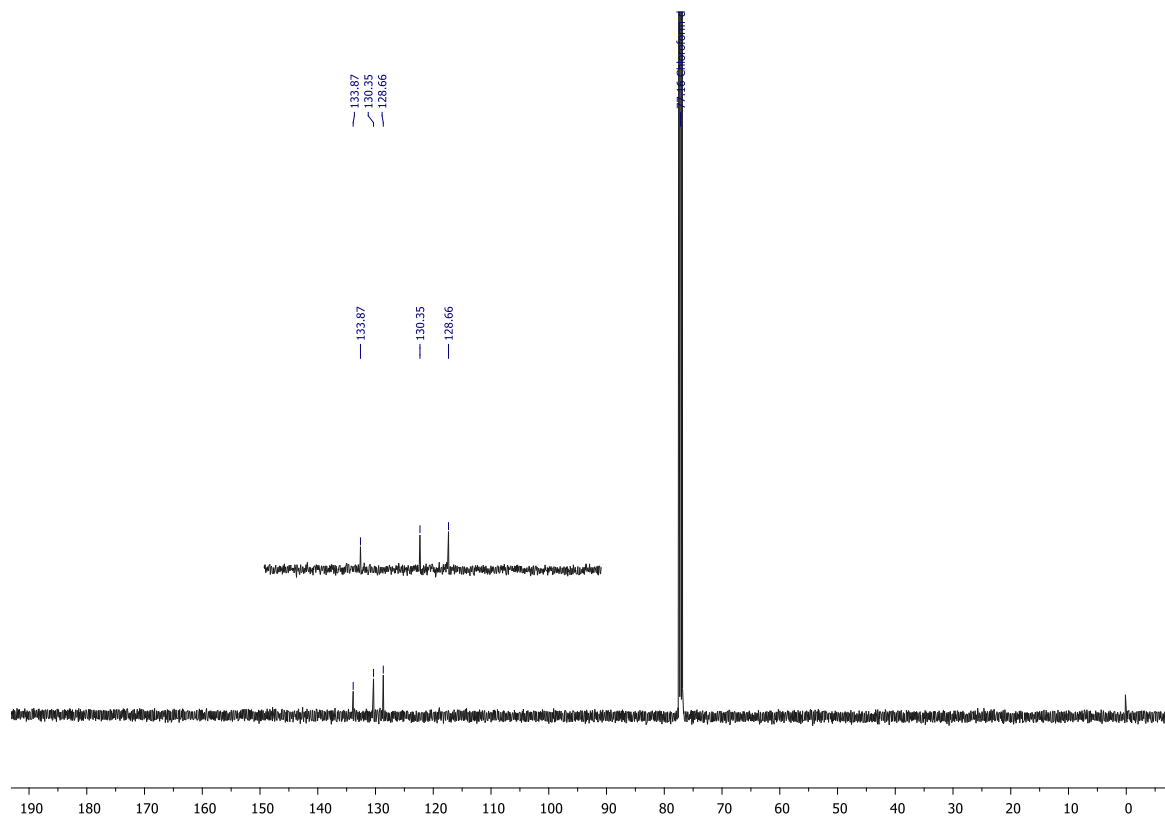


Figura 16. RMN de ^{13}C a 125 MHz en CDCl_3 del producto 2.

Para poder establecer más claramente las señales si son CH o CH₂ se realizó un APT, como se observa en la figura 17, corroborando que los CH están hacia abajo y no hay más señales.

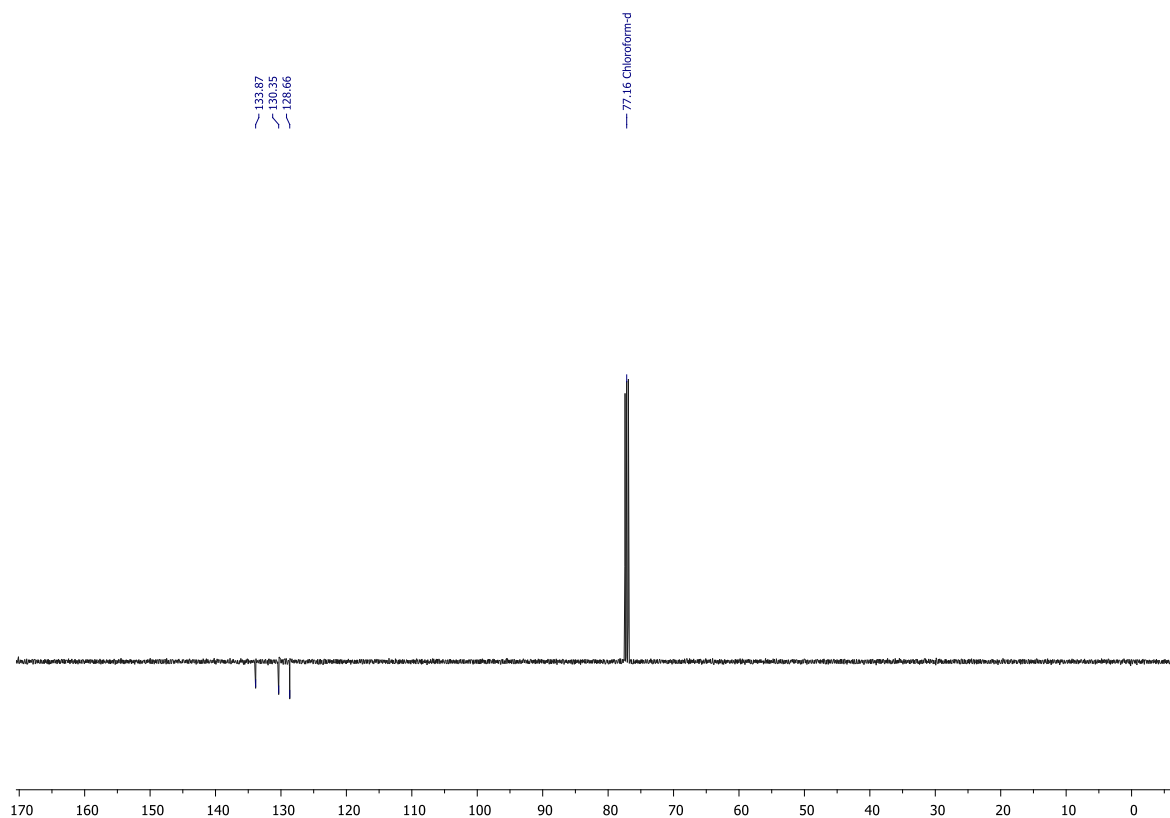


Figura 17. Espectro APT del producto **2**.

Para poder hacer una asignación inequívoca de los hidrógenos se procedió a obtener un espectro COSY, que se observa en la figura 18. Se puede observar que los hidrógenos de los aromáticos se acoplan entre sí.

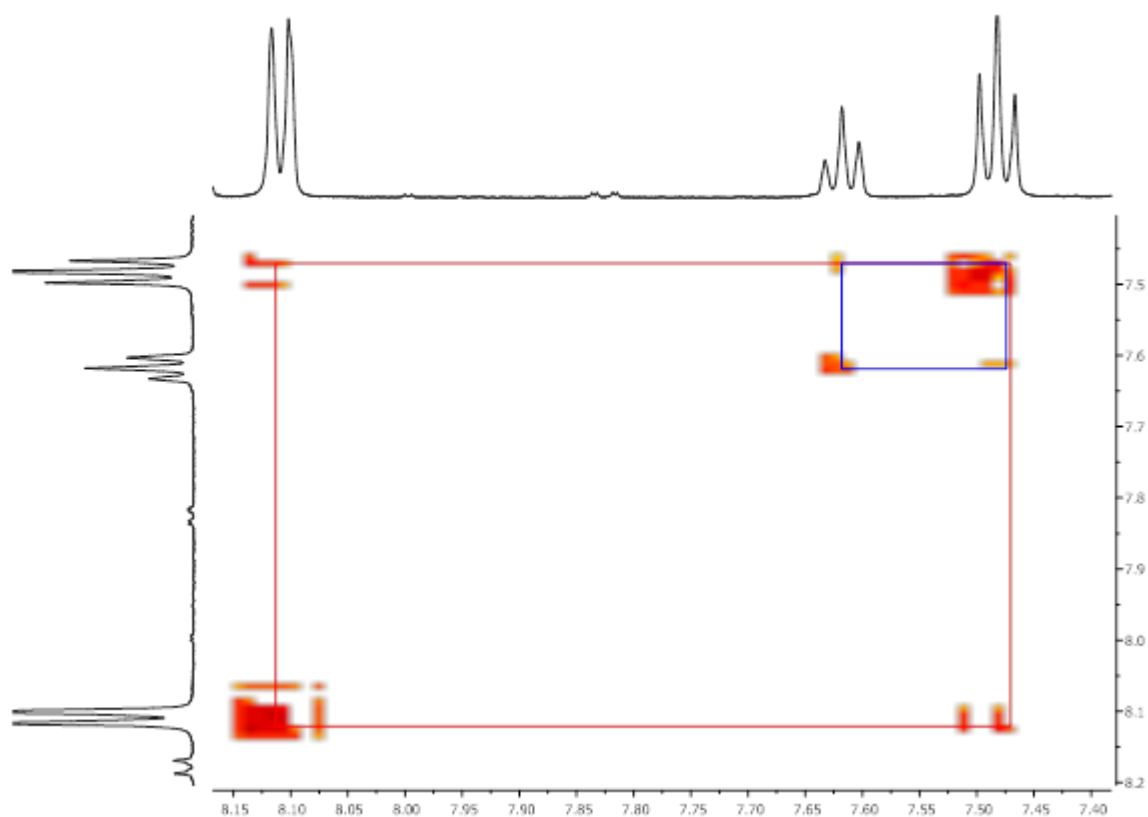


Figura 18. Espectro de RMN 2D COSY en CDCl_3 del producto **2**.

Con la idea de asignar también de manera inequívoca los carbonos de la molécula se obtuvo el espectro de RMN 2D HSQC, como se muestra en la figura 19. Se pueden observar como las señales de hidrógeno de los aromáticos se acoplan con los tres carbonos aromáticos.

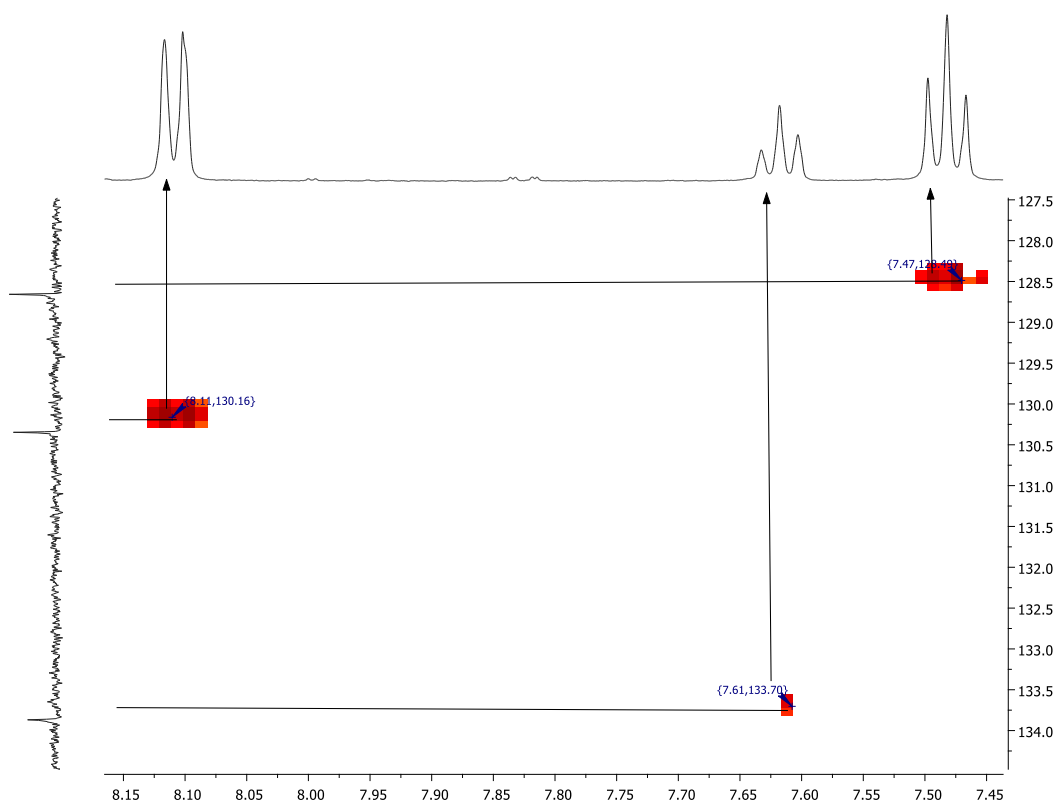


Figura 19. Espectro de RMN 2D HSQC en CDCl_3 del producto 2.

5- PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Elección de la cepa

Se tomó una cepa de un hongo fitopatógeno previamente identificada como *Moniliophthora roreri*, Esta cepa forma parte de una colección de cepas presentes en el laboratorio de biotecnología y se caracteriza por ser un patógeno de la planta del cacao como se ha descrito previamente en los antecedentes.

5.2 Incubación de la cepa

Se tomó una asada de micelio del hongo *M. roreri* y se sembró en medio de cultivo líquido Czapek y se incubó por 7 días a 28 °C con agitación constante de 175 rpm. Este medio Czapek es un medio nutritivo para propagar y crecer a los hongos con bastante eficacia. Una vez preparado el preinóculo se agregó al medio de cultivo líquido Czapek en una relación de 8 mL de preinóculo con 1 L de medio Czapek. Ya inoculado todo el medio de cultivo se colocó en incubación durante 30 días a 28°C con agitación constante de 175 rpm.

5.3 Extracción

Una vez transcurrido el tiempo necesario se procedió a realizar la extracción de los metabolitos secundarios que ahora están presentes en el medio de cultivo. El primer paso fué filtrar el medio de cultivo para quitar el micelio formado por el hongo. Posteriormente centrifugar el contenido de los matraces, con el objetivo de liberar del medio de cultivo la mayor parte de células. La centrifugación se efectuó durante diez minutos a 6000 revoluciones por minuto. Se conservó el medio de cultivo y las células se desecharon. Lugo se realizó una extracción con acetato de etilo con una relación 1:1, por triplicado. Una vez obtenida la fase orgánica se secó con sulfato de sodio y se evaporó el disolvente con un rotavapor

a presión reducida a temperatura inferior a 40°C. El resultado es un extracto crudo de color marrón y de un olor penetrante.

5.4 Fraccionamiento del extracto

Debido a que el extracto crudo resultante cuenta con varios metabolitos secundarios se debe hacer una separación de estos para que puedan ser analizados adecuadamente. El primer paso es analizar el extracto crudo en cuanto a solubilidad, se ha visto que los extractos presentan diferentes solubilidades, es preciso encontrar el disolvente o la combinación de disolventes en donde el extracto tenga un mejor corrimiento en una placa de TLC. En este caso se encontró que el extracto utilizado presenta una solubilidad óptima con el sistema de disolventes.

Con la información anterior se procede a realizar una cromatografía en columna de gel de sílice, para la fase móvil se empieza usando hexano al 100%, el sistema se va modificando para hacer una combinación de hexano y acetato de etilo hasta llegar al sistema metanol.

De este fraccionamiento se obtuvieron 24 fracciones, las cuales se analizaron en placas TLC para corroborar que las fracciones no fueran las mismas, en dado caso se debe seguir purificando el extracto hasta apreciar fracciones separadas. Se analizaron las fracciones individualmente y se purificaron por completo las fracciones 3B y 4B.

5.5 Elucidación de los compuestos

Para el análisis completo de los compuestos, se utilizó el equipo de resonancia magnética nuclear de protón (RMN ^1H) y de carbono (RMN ^{13}C), también se emplearon los experimentos bidimensionales COSY y HSQC. Para complementar la información requerida se utilizaron técnicas de espectrometría de masas y de infrarrojo.

Los espectros de RMN de ^1H y de ^{13}C se obtuvieron en espectrómetros Varian 300 MHz y Bruker 500 MHz, utilizando 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, (dq) doble de cuádruples, (ddq) doble de doble de cuádruples, (t) triple, (q) cuádruple, (m) múltiple, (sa) señal ancha.

6- CONCLUSIONES

- Se lograron separar diferentes fracciones por cromatografía en columna en gel de sílice de un extracto crudo del cultivo del hongo fitopatógeno *Moniliophthora roreri*.
- De una las fracciones se lograron aislar dos compuestos que fueron completamente identificados y caracterizados.
- Se pudo identificar el compuesto benzoato de bencilo un compuesto orgánico que se utiliza como medicamento acaricida y repelente de insectos.
- Se pudo identificar el compuesto piridina que no es usual encontrarlo en su forma pura sino en compuestos relacionados con la vida.
- Solo se pudieron identificar estos dos compuestos de todo el extracto crudo debido a la pandemia ya que no se tuvo el tiempo para purificar e identificar más compuestos.

7- BIBLIOGRAFÍA

- [1] Echeverri-López, L. F. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, **2003**, 27, 423.
- [2] Pomilio, A.B. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, **2012**, 46, 73-82.
- [3] Cortés-Sánchez, A. D. J.; Mosqueda-Olivares, T. *Química Viva*, **2013**, 12, 64-90.
- [4] Artavia, M. M.; Cordero, J. P.; Torres, L. F. A.; Díaz, I. G. *Tecnología en Marcha*, **2020**, 33, 80-89.
- [5] Aime, M. C.; Phillips-Mora, W. *Mycologia*, **2005**, 97, 1012-1022.
- [6] Berdy, J. *The Journal of antibiotics*, **2005**, 58(1), 1-26.
- [7] Strobel, G., & Daisy, B. *Microbiology and molecular biology reviews*, **2003**, 67(4), 491-502.
- [8] Harvey, A. L. *Drug discovery today*, **2008**, 13(19-20), 894-901.
- [9] Newman, D. J., & Cragg, G. M. *Journal of natural products*, **2007**, 70(3), 461-477.
- [10] Hawksworth, D. L., & Lücking, R. *Microbiology spectrum*, **2017**, 5(4), 5-4.
- [11] Schulz, B., Boyle, C., Draeger, S., Römmert, A. K., & Krohn, K. *Mycological research*, **2002**, 106(9), 996-1004.
- [12] Pusztahelyi, T., Holb, I. J., & Pócsi, I. *Frontiers in plant science*, **2015**, 6, 573.
- [13] Aime, M. C., & Phillips-Mora, W. *Mycologia*, **2005**, 97(5), 1012-1022.
- [14] Phillips-Mora, W., Aime, M. C., & Wilkinson, M. J. *Plant Pathology*, **2007**, 56(6), 911-922.
- [15] Hipólito-Romero, E., Carcaño-Montiel, M. G., Ramos-Prado, J. M., Vázquez-Cabañas, E. A., López-Reyes, L., & Ricaño-Rodríguez, J. *Revista argentina de microbiología*, **2017**, 49(4), 356-365.
- [16] La Moniliasis del Cacao: el enemigo a vencer / Proyecto Promoción de Sistemas Agroforestales de Alto Valor con Cacao en Honduras. — 1a ed. — La Lima, Cortés, Honduras: FHIA, 2012.

- [17] Hipólito-Romero, E.; Cocolletzi-Vásquez, E.; Ramos-Prado, J. M.; Espinoza, C.; Torres-de la Cruz, M.; Ricaño-Rodríguez, J. *Biotechnia*, **2020**. 22, 39-49.
- [18] Meinhardt, L.W.; et al. *BMC Genomics* **2014**. 15, 164.
- [19] Bronikowski, A.; Hagedoorn, P. L.; Koschorreck, K.; Urlacher, V. B. *AMB Express*, **2017**. 7, 73.
- [20] Tata, A.; Perez, C.; Campos, M. L.; Bayfield, M. A.; Eberlin, M. N.; Ifa, D. R. *Analytical chemistry*, **2015**. 87, 12298-12305.
- [21] Johnson, W.; Bergfeld, W.F.; Belsito, D.V.; Hill, R.A.; Klaassen, C.D.; Liebler, D.C.; Marks, J.G.; Shank, R.C.; Slaga, T.J.; Snyder, P.W.; Andersen, F.A. *Int J Toxicol*. **2017**, 36, 5S-30S.
- [22] Tang, S.; Li, S.; *Ind. Eng. Chem. Res.* **2004**, 43, 6931-6934
- [23] S. Shimizu, N. Watanabe, T. Kataoka, T. Shoji, N. Abe, S. Morishita, H. Ichimura *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*; Wiley-VCH: Weinheim, 2005.
- [24] Frank, R.L.; Seven, R. P. *J Am Chem Soc.* **1994**, 71, 2629-2635.