



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS  
DE GRAN CANARIA  
Departamento de Biología

---

## TESIS DOCTORAL

---

Productos Naturales de *Schizochytrium*  
*aggregatum*, *Paecilomyces variotii* y *Penicillium*  
*roqueforti*, hongos de interés acuícola



**Roberto Mioso**

Las Palmas de Gran Canaria, 2010

Servicio de Investigación y Tercer Ciclo

**TÍTULO TESIS DOCTORAL:**

**PRODUCTOS NATURALES DE SCHIZOCHYTRIUM AGGREGATUM, PAECILOMYCES VARIOTII Y PENICILLIUM ROQUEFORTI, HONGOS DE INTERÉS ACUÍCOLA.**

**AUTOR: ROBERTO MIOSO**

DEPARTAMENTO/INSTITUTO: BIOLOGÍA

La tesis doctoral ha sido defendida ante el tribunal compuesto por los siguientes doctores, en aplicación del Real Decreto 1393/2007, 29 de octubre, y el artº 9 del Reglamento para la elaboración, tribunal, defensa y evaluación de tesis doctorales de esta Universidad (BOULPGC, de 5 de noviembre de 2008).

PRESIDENTE: Dr. D./Dña. JAIME BERMEJO BARRERA

SECRETARIO: Dr. D./Dña. ELSA MARÍA RODRÍGUEZ PÉREZ

VOCAL: Dr. D./Dña. CARMEN MARÍA HERNÁNDEZ CRUZ

VOCAL: Dr. D./Dña. MARTIN BESSONART GONZÁLEZ

VOCAL: Dr. D./Dña. MARÍA SALHI ROMERO

Y se le ha otorgado la calificación de SOBRESALIENTE CUM LAUDE

En Las Palmas de Gran Canaria, a 17 de septiembre de 2010

El Presidente

JAIME BERMEJO BARRERA

El Vocal

El Vocal

El Vocal

CARMEN MARÍA HERNÁNDEZ CRUZ

MARÍA SALHI ROMERO

MARTIN BESSONART GONZÁLEZ

El Secretario

ELSA MARÍA RODRÍGUEZ PÉREZ

**PARA EL/LA INTERESADO/A.**

**Deberá personarse en la Subdirección de Tercer Ciclo y Postgrado para tramitar la solicitud del título de doctor**





**UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA**

**Departamento: BIOLOGIA**

**Programa de doctorado: ACUICULTURA**

**Título de la Tesis:**

**Productos Naturales de *Schizochytrium aggregatum*,  
*Paecilomyces variotii* y *Penicillium roqueforti*, hongos de interés  
acuícola.**

Tesis doctoral presentada por **D. Roberto Mioso**

Dirigida por el **Dr. D. Francisco Javier Toledo Marante**

**El Director**

**El Doctorando**

**Las Palmas de Gran Canaria, 18 de mayo de 2010**



D. FRANCISCO JAVIER TOLEDO MARANTE, CATEDRÁTICO DE ESCUELAS UNIVERSITARIAS POR EL ÁREA DE CONOCIMIENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

**HACE CONSTAR:**

Que la presente memoria titulada **Productos Naturales de *Schizochytrium aggregatum*, *Paecilomyces variotii* y *Penicillium roqueforti*, hongos de interés acuícola**, que presenta el doctorando **Don Roberto Mioso** para optar al grado de Doctor en Ciencias del Mar por la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, ha sido realizada en el laboratorio de "Química Orgánica II" del grupo de I+D+i de "Tecnología Química y Desarrollo Sostenible" adscrito al Departamento de Química bajo mi dirección, autorizando con esta fecha su presentación y defensa.

Y para que conste a los efectos oportunos firmo el presente en Las Palmas de Gran Canaria a 11 de mayo de 2010.



## Agradecimientos

Quiero aprovechar estas líneas para expresar mi agradecimiento a aquellas personas e instituciones que de uno u otro modo me han apoyado en la realización de este trabajo.

Quisiera expresar mis más sinceras gratitudes al Prof. Dr. Francisco Javier Toledo Marante por dirigir este trabajo. Yo me considero muy afortunado por ser uno de sus alumnos.

Especialmente, quiero agradecer al Dr. D. Jaime Bermejo Barrera, investigador científico del Instituto de Productos Naturales y Agrobiología del CSIC (IPBA, Tenerife) por su asesoramiento espectroscópico durante la realización de la presente Tesis.

Al Dr. D. Juan Emilio González González y al Dr. D. Juan José Santana Rodríguez, miembros del grupo CAFMA de la ULPGC, por su colaboración en los análisis de GC-MS.

A los profesores y personal integrante de los departamentos de Química y Biología de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria y del Instituto de Productos Naturales y Agrobiología del CSIC (IPNA, Tenerife) por su colaboración desinteresada.

A la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria y al Instituto de Productos Naturales y Agrobiología del CSIC (IPNA, Tenerife), por ofrecerme los medios técnicos y materiales necesarios.

A la Comunidad Económica Europea (FEDER), al gobierno de España (CICYT); Ministerio de Ciencia y Tecnología, al gobierno autónomo de Canarias (DGUI); Consejería Educación, Cultura y Deportes (ACIISI); por la financiación de los sucesivos proyectos que han hecho posible esta Tesis.

A la agencia CAPES, gobierno del Brasil, por concederme una beca sin la cual no hubiera sido posible este trabajo. Y a la Unión Europea por concederme una beca “Marie Curie” que me permitió realizar mi estancia en Aberdeen, UK.

Al Dr. Marcel Jaspars, profesor e investigador científico del Departamento de Química de la Universidad de Aberdeen, UK, así como al Dr. Richard Herbert, profesor emérito de la Universidad de Leeds, UK, por enseñarme elucidación estructural y a trabajar con el aparato de resonancia magnética nuclear.

Finalmente, a mi familia, por su paciencia y apoyo.

*Roberto Mioso*

*A Irma,*

*Paola y Amaya*

## Resumen

El estudio químico de un organismo, y la elucidación de las estructuras moleculares de sus componentes, puede dar lugar a descubrimientos que aconsejen una posterior producción industrial del mismo. Con este propósito, se seleccionaron tres microorganismos para ser investigadas químicamente, siendo estos: un hongo zoospórico, *Schizochytrium aggregatum*, y dos hifomicetos, *Paecilomyces variotii* y *Penicillium roqueforti*; estos últimos fueron aislados del medio marino del litoral canario. La exploración química de *Schizochytrium aggregatum* condujo a la identificación de 38 tipos de componentes volátiles, pertenecientes a los grupos de los *n*-alcanos, 1-alquenos, 1-alcanoles, 2-alquil-1-alcanoles, ácidos grasos libres saturados e insaturados, ésteres metílicos y etílicos de ácidos grasos saturados e insaturados, triglicéridos saturados, diglicéridos, monoglicéridos insaturados, ceras, esteroides, triterpenos, catabolitos lipídicos, mono- y sesquiterpenos de cadena cíclica y lineal, entre otros. En *Paecilomyces variotii* fueron identificados 46 grupos estructurales entre sus componentes volátiles que, mayoritariamente, son componentes lipídicos usuales implicados en la ruta de los ácidos grasos, fragmentos del catabolismo de los mismos, terpenoides y un metabolito de la ruta del ácido shikímico. Se aislaron e identificaron espectroscópicamente dos componentes no volátiles, a saber, oleína y peróxido de ergosterol. La mayor parte de estos componentes se describen aquí por primera vez para esta especie. La nueva cepa de *Penicillium roqueforti*, una vez cultivada y procesada, no ha suministrado ni un solo componente químico, ni volátil ni no volátil, que esté implicado en la ruta biogenética de la PR-toxina. Tampoco se ha encontrado indicio alguno de que produzca la micotoxina botriodiplodina. Se trata, pues, de una cepa marina que no produce toxinas. En su caldo de cultivo se identificaron 26 componentes volátiles pertenecientes a los grupos de los *n*-alcanos, 1-alcanoles, 2-alquil-1-alcanoles, ácidos grasos libres saturados e insaturados, amidas de ácidos grasos, ésteres metílicos de ácidos grasos poliinsaturados, monoglicéridos, ceras, alcoholes grasos libres, monoterenos de cadena lineal, dipéptidos cíclicos y ftalatos de dialquilo. En el micelio se identificaron 64 componentes volátiles pertenecientes a los grupos de los *n*-alcanos, 1-alquenos, 1-alcanoles, 2-alquil-1-alcanoles, ácidos grasos libres saturados e insaturados, amidas de ácidos grasos, ésteres metílicos y etílicos de ácidos grasos saturados e insaturados, triglicéridos insaturados, diglicéridos, monoglicéridos saturados e insaturados, ceras, éteres grasos, catabolitos lipídicos, mono-, sesqui- y diterpenos de cadena lineal, hidrocarburos aromáticos de la ruta del ácido shikímico y otros. También en el micelio se identificaron cinco componentes no volátiles, que se describen aquí por primera vez para la especie *P. roqueforti*, a saber: peróxido de ergosterol, (9,11)-dehidroperóxido del ergosterol, *p*-hidroxi-benzaldehído, el D-(-)-manitol y la novedosa 2-deoxi-2-fosfamino- $\alpha$ -D-glucopyranosa. Como consecuencia de estos resultados, se propone un modelo que ilustra el modo en que la glucosamina se incorpora a la ruta biogenética de la quitina. Estos resultados han demostrado que los tres hongos estudiados no son, en nuestras condiciones de cultivo, productores de micotoxinas; al contrario, producen importantes componentes nutricionales, lo cual supone que se pueden utilizar directamente para la nutrición animal en acuicultura. Por otra parte, también se pueden usar para producir industrialmente productos de alto valor añadido como oleína, peróxido de ergosterol, (9,11)-dehidroperóxido del ergosterol, *p*-hidroxi-benzaldehído, D-(-)-manitol y 2-deoxi-2-fosfamino- $\alpha$ -D-glucopyranosa. Esta última es nueva en la bibliografía.



## Índice

	Pág.
<b>Agradecimientos</b> .....	v
<b>Resumen</b> .....	vii
<b>Lista de Figuras</b> .....	x
<b>Lista de Tablas</b> .....	xiii
<b>Lista de Anexos</b> .....	xiv
<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	xvi
<b>CAPITULO 0</b>	
<b>0-1.</b> Introducción.....	1
<b>0-2.</b> Revisión bibliografica: historia y aplicaciones de los productos naturales en acuicultura.....	3
<b>0-2.1.</b> Definición de Productos Naturales.....	3
<b>0-2.2.</b> Acuicultura y productos de alto valor añadido.....	4
<b>0-3.</b> Perspectivas actuales de los productos naturales marinos en acuicultura.....	10
<b>0-3.1.</b> Perspectivas generales.....	10
<b>0-3.2.</b> Perspectivas de los PNM de origen fúngico.....	16
<b>0-4.</b> El método aplicado en esta tesis.....	20
<b>0.5.</b> Referencias bibliográficas.....	23
<b>CAPITULO I</b> <i>Schizochytrium aggregatum</i>	
<b>I-1.</b> Antecedentes.....	36
<b>I-2.</b> Objetivos.....	39
<b>I-3.</b> Resultados y discusión.....	39
<b>I-3.1.</b> Obtención de biomasa, extracción y fraccionamiento.....	39
<b>I-3.2.</b> Estudio químico de la biomasa fúngica.....	41
<b>I-3.2.1.</b> Componentes volátiles en la biomasa fúngica.....	41
<b>I-3.2.2.</b> Presencia de ésteres metílicos de ácidos grasos ramificados en la biomasa fúngica.....	50
<b>I-3.2.3.</b> Presencia de ftalatos de dialquilo en la biomasa fúngica.....	50
<b>I-4.</b> Conclusiones.....	51
<b>I-5.</b> Experimental.....	52
<b>I-5.1.</b> General.....	52
<b>I-5.2.</b> Obtención de la cepa.....	53
<b>I-5.3.</b> Análisis químico de la biomasa fúngica.....	53
<b>I-5.3.1.</b> Obtención del extracto y fraccionamiento por polaridad.....	53
<b>I-6.</b> Referencias bibliográficas.....	58

## CAPITULO II *Paecilomyces variotii*

II-1.	Antecedentes.....	65
II-2.	Objetivos.....	70
II-3.	Resultados y discusión.....	70
II-3.1.	Obtención de biomasa, extracción y fraccionamiento.....	70
II-3.2.	Estudio químico del micelio.....	72
II-3.2.1.	Componentes volátiles en el micelio.....	72
II-3.2.1.1.	Presencia de ésteres metílicos de ácidos grasos ramificados en la biomasa fúngica.....	81
II-3.2.1.2.	Presencia de ftalatos de dialquilo en la biomasa fúngica.....	81
II-3.2.2.	Componentes no volátiles identificados en el micelio de <i>P. variotii</i> .....	82
II-4.	Conclusiones.....	87
II-5.	Experimental.....	88
II-5.1.	General.....	88
II-5.2.	Aislamiento e identificación de la cepa.....	89
II-5.3.	Cultivo masivo del hongo.....	90
II-5.4.	Estudio químico del micelio.....	90
II-6.	Referencias bibliográficas.....	98

## CAPITULO III *Penicillium roqueforti*

III-1.	Antecedentes.....	103
III-2.	Objetivos.....	115
III-3.	Resultados y discusión.....	116
III-3.1.	Obtención de biomasa, extracción y fraccionamiento.....	116
III-3.2.	Estudio químico del caldo de cultivo.....	118
III-3.2.1.	Componentes volátiles en el caldo de cultivo.....	118
III-3.2.2.	Componentes no volátiles en el caldo de cultivo.....	118
III-3.2.3.	Ausencia de toxinas en el caldo de cultivo.....	125
III-3.2.4.	Presencia de dipéptidos en el caldo de cultivo.....	125
III-3.2.5.	Presencia de hidrocarburos y ácidos grasos libres en el caldo de cultivo.....	126
III-3.3.	Estudio químico del micelio.....	126
III-3.3.1.	Componentes volátiles en el micelio.....	127
III-3.3.1.1.	Presencia de ésteres metílicos de ácidos grasos ramificados en el micelio.....	130
III-3.3.1.2.	Presencia de ftalatos de dialquilo en el micelio.....	131
III-3.3.2.	Componentes no volátiles identificados y cuantificados en el micelio.....	132
III-4.	Conclusiones.....	149
III-5.	Experimental.....	151
III-5.1.	General.....	151
III-5.2.	Aislamiento e identificación de la cepa.....	154
III-5.3.	Cultivo masivo del hongo.....	154
III-5.3.1.	Análisis químico del caldo de cultivo.....	155
III-5.3.2.	Estudio del micelio.....	158
III-6.	Referencias bibliográficas.....	169
	<b>Anexos.....</b>	<b>182</b>

## Lista de Figuras

Figura	Pág.
0-1. Forskolina.....	7
0-2. Fitoecdisteroides.....	8
0-3. Rotenona.....	9
0-4. Eugenol, o 4-alil-2-metoxifenol.....	9
0-5. Isatina.....	11
0-6. El fagorrepelente/ fagoestimulador malingamida A.....	11
0-7. Un bactericida marino.....	11
0-8. Fosfolípido, inhibidor de la biogénesis del colesterol.....	12
0-9. El fagorrepelente chlorodesmina.....	13
0-10. El antiincrustante pachidictiol A.....	13
0-11. El antiincrustante fimbrolido.....	13
0-12. El fagorrepelente/ molusquicida telfairina.....	13
0-13. Prostaglandina (15R)-PGA <sub>2</sub> .....	14
0-14. Fagorrepelentes/ algicidas del coral espaguetti.....	14
0-15. Fungicida de <i>Thalassia testudinum</i> .....	15
0-16. Fagorrepelente de <i>Tambja abdere</i> .....	15
0-17. Hormona de <i>Tethys fimbria</i> .....	15
0-18. Cefalosporina C, de <i>Acremonium</i> sp. y <i>Emericellopsis</i> sp.....	17
0-19. Mactanamida de <i>Aspergillus</i> sp.....	18
0-20. Trichoharzina, de <i>Trichoderma harzianum</i> .....	18
0-21. Thraustochitrosido C, de <i>Thraustochytrium globosum</i> .....	19
0-22. Escualeno, de <i>Pseudozyma</i> sp.....	20
I-1. Esquema de partición aplicado al extracto del micelio de <i>Schizochytrium aggregatum</i> .....	40
I-2. Componentes lipídicos volátiles identificados en <i>S. aggregatum</i> .....	43
I-3. Componentes lipídicos volátiles identificados en <i>S. aggregatum</i> .....	44
I-4. Componentes lipídicos volátiles identificados en <i>S. aggregatum</i> .....	45
I-5. Fragmento lipídico volátil identificado en <i>S. aggregatum</i> .....	46
I-6. Terpenoides volátiles identificados en <i>S. aggregatum</i> .....	46
I-7. Otros componentes volátiles identificados en <i>S. aggregatum</i> .....	47
I-8. Comportamiento en CG de los <i>n</i> -alcanos de <i>S. aggregatum</i> (1; <i>n</i> = 10-12) y patrones comerciales (1; <i>n</i> = 9, y 13).....	47
I-9. Comportamiento en CG de los 1-alquenos de <i>S. aggregatum</i> (6; <i>n</i> = 12-13, y 15) y el patrón comercial 1-octadeceno (6; <i>n</i> = 15).....	48
I-10. Comportamiento en CG de los ácidos grasos saturados de cadena iso-metilramificada identificados en <i>S. aggregatum</i> (14; <i>n</i> = 8, y 12).....	48
I-11. Comportamiento en CG de los ácidos grasos saturados de cadena lineal identificados en <i>S. aggregatum</i> (4; <i>n</i> = 12, y 14).....	48
I-12. Comportamiento en CG de los ésteres metílicos de los ácidos grasos saturados de cadena lineal encontrados en <i>S. aggregatum</i> (5; <i>n</i> = 10-18) y patrones comerciales (5; <i>n</i> = 9, y 18).....	49
I-13. Comportamiento en CG de los ésteres etílicos de los ácidos grasos saturados de cadena lineal encontrados en <i>S. aggregatum</i> (7; <i>n</i> = 10-14, y 16).....	49



## Lista de Figuras

Figura	Pág.
II-1. Anhídrido (1), de <i>P. variotii</i> .....	65
II-2. Cornexistina (2), Hidroxicornexistina (3) y derivados (4).....	67
II-3. Semiviriditoxina (5) y ácido semiviriditóxico (6).....	67
II-4. Sphingofunginas E (7) y F (8).....	68
II-5. Ascofuranona (9).....	69
II-6. Biotransformación del ácido sináptico (10) en ácido siríngico (11).....	70
II-7. Esquema de partición aplicado al extracto del micelio de <i>Paecilomyces variotii</i> por extracción líquido-líquido.....	71
II-8. Componentes lipídicos identificados en <i>Paecilomyces variotii</i> .....	74
II-9. Componentes lipídicos identificados en <i>Paecilomyces variotii</i> .....	75
II-10. Componentes lipídicos identificados en <i>Paecilomyces variotii</i> .....	76
II-11. Fragmentos lipídicos – catabolitos - identificados en <i>Paecilomyces variotii</i> ....	77
II-12. Terpenoides identificados en <i>Paecilomyces variotii</i> .....	77
II-13. Componente de la ruta del ácido shikímico identificado en <i>Paecilomyces variotii</i> .....	77
II-14. Otros componentes identificados en el extracto del micelio de <i>P. variotii</i> .....	78
II-15. Componentes lipídicos identificados en <i>Paecilomyces variotii</i> .....	79
II-16. n-Alcanos identificados en <i>Paecilomyces variotii</i> y patrones.....	79
II-17. 1-Alquenos identificados en <i>Paecilomyces variotii</i> y patrones.....	79
II-18. 1-Alcanoles identificados en <i>Paecilomyces variotii</i> y patrones.....	80
II-19. Ácidos grasos saturados de cadena lineal identificados en <i>Paecilomyces variotii</i> y patrones.....	80
II-20. Ésteres metílicos de ácidos grasos saturados de cadena lineal identificados en <i>Paecilomyces variotii</i> y patrones.....	80
II-21. 5 $\alpha$ , 8 $\alpha$ -Epidioxiergosta-6,22-dien-3 $\beta$ -ol ( <i>Peróxido del ergosterol</i> ).....	85
II-22. Aislamiento y purificación de la cepa de <i>Paecilomyces variotii</i> .....	89
II-23. Vista del cultivo masivo de <i>P. variotii</i> en el laboratorio de la ULPGC.....	90
III-1. Roquefortina A - Isofumigaclavina A - (1); Roquefortina B -Isofumigaclavina B - (2) y Festuclavina (3).....	105
III-2. Roquefortinas C (4) y D (5).....	105
III-3. PR toxina (PRT).....	106
III-4. Eremofortinas A (7) y B (8).....	106
III-5. Eremofortinas C (9a/ 9b) y D (10).....	107
III-6. Eremofortina E - PR amida - (11), PR ácido (12) y PR imina (13).....	108
III-7. Marcfortinas A (14), B (15) y C (16).....	109
III-8. (+)-Aristolocheno (17) y esqueleto carbonado del eremofilano (18).....	109
III-9. Ácido penicílico (19), patulina (20) y ácido micofenólico (21).....	110
III-10. 4-Dodecanolido (22) y (Z)-6-Dodecen-4-olido (23).....	110
III-11. Botriodiplodina.....	111
III-12. Biogénesis de los sesquiterpenos volátiles implicados en la ruta de la PR toxina (6) en las cepas tóxicas de <i>P. roqueforti</i> .....	113
III-13. Trazadores volátiles típicos de las cepas tóxicas de <i>P. roqueforti</i> .....	114
III-14. Biogénesis de algunos trazadores volátiles encontrados en las cepas no tóxicas de <i>Penicillium roqueforti</i> .....	115
III-15. Esquema de partición aplicado al caldo de <i>Penicillium roqueforti</i> .....	116
III-16. Esquema de partición aplicado al extracto del micelio de <i>P. roqueforti</i> .....	117

## Lista de Figuras

Figura		Pág.
III-17.	Comportamiento en CG de los <i>n</i> -alcanos de <i>P. roqueforti</i> (40; n= 9, 11-12, 14-15, 17-20, 22-24) y patrones comerciales (40; n= 10, 13, 16 y 21).....	120
III-18.	Componentes lipídicos volátiles identificados en <i>P. roqueforti</i> .....	121
III-19.	Componentes lipídicos volátiles identificados en <i>P. roqueforti</i> .....	122
III-20.	Fragmentos lipídicos volátiles identificados en <i>P. roqueforti</i> .....	123
III-21.	Terpenoides volátiles identificados en <i>Penicillium roqueforti</i> .....	123
III-22.	Componentes volátiles, de la ruta del ácido shikímico, identificados en <i>Penicillium roqueforti</i> .....	124
III-23.	Componentes volátiles, de la ruta de los aminoácidos, identificados en <i>Penicillium roqueforti</i> .....	124
III-24.	Otros componentes volátiles identificados en <i>P. roqueforti</i> .....	125
III-25.	Comportamiento en CG de los <i>n</i> -alcanos de <i>Penicillium roqueforti</i> (40; n= 9, 11-12, 14-15, 17-20, 22-24) y patrones comerciales (40; n= 10, 13, 16 y 21)...	129
III-26.	Comportamiento en CG de los 1-alquenos de <i>P. roqueforti</i> (41; n= 12-13) y el patrón comercial 1-octadeceno (41; n= 15).....	129
III-27.	Comportamiento en CG de los 1-alcanoles de <i>P. roqueforti</i> (42; n= 10-11, 14, 18 y 20). La posición cromatográfica del 1-eicosanol (42; n= 18) se comprobó por inyección de una muestra comercial del mismo.....	129
III-28.	Comportamiento en CG de los ácidos grasos saturados de cadena lineal identificados en <i>P. roqueforti</i> (44; n= 12-13 y 18) y el ácido esteárico comercial (44; n= 16).....	130
III-29.	Comportamiento en CG de los ésteres metílicos de los ácidos grasos saturados de cadena lineal encontrados en <i>Penicillium roqueforti</i> (45; n= 12-16, 20 y 22) y varios patrones comerciales (45; n= 8-11, 17-18).....	130
III-30.	Fragmentaciones que presenta en espectrometría de masas el triglicérido trioleína.....	133
III-31.	Correlaciones <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H observadas en los espectros en dos dimensiones del triglicérido trioleína.....	134
III-32.	5 $\alpha$ , 8 $\alpha$ -Epidioxiergosta-6,22-dien-3 $\beta$ -ol ( <i>Peróxido del ergosterol</i> ).....	135
III-33.	5 $\alpha$ , 8 $\alpha$ -Epidioxiergosta-6, 9(11), 22-trien-3 $\beta$ -ol [ <i>9(11)-Dehidroperóxido del ergosterol</i> ].....	138
III-34.	Integración de las señales correspondientes a los hidrógenos C <sub>6</sub> -H y C <sub>7</sub> -H en el espectro de una mezcla de los endoperóxidos 86 (79%) y 87 (21%) a 400 MHz.....	138
III-35.	4-Hidroxibenzaldehído.....	140
III-36.	Ruta del ácido shikímico produciendo las alomonas 78 (en nuestra cepa de <i>Penicillium roqueforti</i> ) y 88 (en una cepa de <i>Penicillium olsonii</i> ).....	141
III-37.	D-(-)-Manitol.....	143
III-38.	Sal sódica de 2-deoxi-2-sulfoamino- $\alpha$ -D-glucopyranosa.....	145
III-39.	Epimerización de la $\alpha$ -D-glucosamina-1-fosfato.....	146
III-40.	2-Deoxi-2-fosfamino- $\alpha$ -D-glucopiranososa (estructura asignada a la hexosa cíclica aislada de <i>P. roqueforti</i> ).....	146
III-41.	Afloramiento rocoso en la Playa de La Laja, localidad de colecta de la cepa de <i>Penicillium roqueforti</i> .....	154
III-42.	Vista superior del cultivo masivo de <i>Penicillium roqueforti</i> .....	155
III-43.	Cromatografías analíticas en capa fina y HPLC, de la fracción Pr-L-1.....	155

## Lista de Tablas

Tabla	Pág.
0-1. Clasificación de los compuestos químicos usados en acuicultura que pueden llegar a ser contaminantes, sus fuentes, usos e impacto.....	1
0-2. Extractos pituitarios usualmente utilizados como inductores hormonales en la reproducción de peces de cultivo.....	6
I-1. Componentes volátiles identificados en el micelio de <i>Schizochytrium aggregatum</i> por GC-MS.....	41
II-1. Componentes volátiles identificados en el micelio de <i>P. variotii</i> por GC-MS.....	73
II-2. Espectros ( <sup>13</sup> C-RMN y <sup>1</sup> H-RMN, CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) del peróxido del ergosterol aislado de <i>Paecilomyces variotii</i> .....	86
II-3. Composición del medio de cultivo KMV utilizado para organismos heterotróficos y el KMV modificado.....	89
III-1. Componentes volátiles identificados/ cuantificados en el caldo de cultivo de <i>Penicillium roqueforti</i> .....	119
III-2. Componentes volátiles identificados y cuantificados en el micelio de <i>Penicillium roqueforti</i> .....	127
III-3. Espectros ( <sup>13</sup> C-RMN y <sup>1</sup> H-RMN, CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) del peróxido del ergosterol.....	136
III-4. Rotación óptica descrita para mezclas de peróxido del ergosterol y el 9(11)-dehidroperóxido del ergosterol.....	139
III-5. Espectros de <sup>13</sup> C-RMN y <sup>1</sup> H-RMN del 4-hidroxibenzaldehído (300 MHz).....	140
III-6. Espectros de <sup>13</sup> C-RMN y <sup>1</sup> H-RMN del D-(-)-Manitol (300 MHz).....	144
III-7. Datos de <sup>13</sup> C-RMN y <sup>1</sup> H-RMN de la α-D-glucosa, el clorhidrato de la α-D-glucosamina, la sal sódica de la α-D-glucosamina 2-sulfato, de la α-D-glucosamina-1-fosfato y del compuesto polihidroxílico mayoritario de <i>P. roqueforti</i> (DOCD <sub>3</sub> , 300 MHz).....	147
III-8. Factores de respuesta en GC-MS usados en la cuantificación de los componentes volátiles de <i>Penicillium roqueforti</i> .....	152
III-9. Composición del medio de cultivo KMV utilizado para organismos heterotróficos.....	154



## Lista de Anexos

Anexo		Pág.
1	Identificación de los hongos <i>Paecilomyces variotii</i> y <i>Penicillium roqueforti</i> .....	182
2	Espectro de <sup>1</sup> H-NMR del Peróxido del ergosterol (86).....	183
3	Espectro de <sup>1</sup> H-NMR del Peróxido del ergosterol (86).....	184
4	Espectro de <sup>13</sup> C-NMR del Peróxido del ergosterol (86).....	185
5	Espectro de <sup>1</sup> H-NMR del Peróxido del ergosterol y su 9(11)-Dehidroderivado..	186
6	Espectro HSQC del Peróxido del ergosterol y su 9(11)-Dehidroderivado.....	187
7	Espectro <sup>1</sup> H-NMR del Peróxido del ergosterol y su 9(11)-Dehidroderivado.....	188
8	Espectro HMBC del Peróxido del ergosterol y su 9(11)-Dehidroderivado.....	189
9	Espectro COSY del Peróxido del ergosterol (86) y el 9(11)-Dehidroperóxido del ergosterol (87).....	190
10	Espectro <sup>1</sup> H-NMR del Peróxido del ergosterol (86) y el 9(11)-Dehidroperóxido del ergosterol (87).....	191
11	Espectro HSQC del Peróxido del ergosterol (86) y el 9(11)-Dehidroperóxido del ergosterol (87).....	192
12	Espectro HMBC del Peróxido del ergosterol (86) y el 9(11)-Dehidroperóxido del ergosterol (87).....	193
13	Espectro de <sup>1</sup> H-NMR del Peróxido del ergosterol (86) y el 9(11)-Dehidroperóxido del ergosterol (87).....	194
14	Espectro de masas del Peróxido del ergosterol (86) y el 9(11)-Dehidroperóxido del ergosterol (87).....	195
15	Espectro de <sup>1</sup> H-NMR del Peróxido del ergosterol (86) y el 9(11)-Dehidroperóxido del ergosterol (87).....	196
16	Huella MS del 1-Metilnonil-benceno.....	197
17	Huella MS del (E)-3,7-Dimetil-2,6-octadienal (monoterpeno).....	198
18	Huella MS del Ftalato de dietilo.....	199
19	Huella MS del Benzoato de bencilo.....	200
20	Huella MS del Éster metílico del ácido 3-octiloxiranooctanoico.....	201
21	Huella MS del Tetrahidro-4-hidroxi-4-metil-2H-Piran-2-ona (Mevalonato).....	202
22	Huella MS del Éster metílico del ácido eicosanoico.....	203
23	Cromatograma de gases típico.....	204
24	Huella MS de la N-Butil-bencenosulfonamida.....	205
25	Huella MS del Oleato de etilo.....	206
26	Huella MS del Ftalato de dibutilo.....	207
27	Huella MS del Éster etílico del ácido tetradecanoico.....	208
28	Cromatografía GC-MS típico.....	209
29	Huella del 3,7-Dimetil-2,6-octadienal (74, monoterpeno), identificado por GC-MS.....	210
30	Huella del 2,4-Decadienal (catabolito de HUFAs), identificado por GC-MS.....	211
31	Huella del 4-Hidroxi-benzaldehído (78, ruta del ácido shikímico), identificado por GC-MS.....	212
32	Huella del Ftalato de dietilo (83, n= 1), identificado por GC-MS.....	213
33	Huella de la Benzofenona (79), identificada por GC-MS.....	214
34	Huella del Ácido pentadecanoico (44, n= 13), identificado por GC-MS.....	215
35	Huella del 6,10,14-Trimetil-2-pentadecanona (77, sesterterpeno degradado), identificado por GC-MS.....	216

## Lista de Anexos

Anexo		Pág.
36	Huella del Ftalato de dibutilo (83, n= 3), identificado por GC-MS.....	217
37	Huella del Ftalato de dioctilo (83, n= 7), identificado por GC-MS.....	218
38	Fracción Prm-L-3-1 enriquecida con D-(-)-manitol.....	219
39	Espectro de <sup>13</sup> C-NMR de la 2-Deoxi-2-fosfamino- $\alpha$ -D-glucopiranososa (92) impurificada por manitol (89).....	220
40	Espectro de <sup>1</sup> H-NMR de la 2-Deoxi-2-fosfamino- $\alpha$ -D-glucopiranososa (92) impurificada por manitol (89).....	221
41	Espectro de <sup>1</sup> H-NMR de la 2-Deoxi-2-fosfamino- $\alpha$ -D-glucopiranososa (92) impurificada por manitol (89).....	222
42	Espectro COSY de la 2-Deoxi-2-fosfamino- $\alpha$ -D-glucopiranososa (92) impurificada por manitol (89).....	223
43	Espectro TOCSY de la 2-Deoxi-2-fosfamino- $\alpha$ -D-glucopiranososa (92) impurificada por manitol (89).....	224
44	Espectro NOESY de la 2-Deoxi-2-fosfamino- $\alpha$ -D-glucopiranososa (92) impurificada por manitol (89).....	225
45	Espectro de <sup>1</sup> H-NMR de la $\alpha$ -D-Glucosamina-1-fosfato (91b).....	226
46	Espectro de <sup>1</sup> H-NMR de la $\alpha$ -D-Glucosamina-1-fosfato después de una semana en tubo de RMN (91a $\leftrightarrow$ 91b). La señal del DOCD <sub>3</sub> a 4,88 irradiada.....	227
47	Espectro NOESY de la $\alpha$ -D-Glucosamina-1-fosfato (91b).....	228
48	Espectro TOCSY de la $\alpha$ -D-Glucosamina-1-fosfato (91b).....	229
49	Espectro COSY de la $\alpha$ -D-Glucosamina-1-fosfato (91b).....	230
50	Espectro de <sup>1</sup> H-NMR del Ftalato de dibutilo (83, n= 3).....	231
51	Espectro de <sup>1</sup> H-NMR del Ftalato de dinonilo (83, n= 8).....	232
52	Espectro de <sup>1</sup> H-NMR del Manitol (89).....	233
53	Espectro de <sup>13</sup> C-NMR del Manitol (89).....	234
54	Espectro de <sup>1</sup> H-NMR de Trioleína (58).....	235
55	Espectro de masas (MS) de Trioleína (58).....	236
56	Espectro TOCSY de Trioleína (58).....	237
57	Espectro de <sup>1</sup> H-NMR de Trioleína (58).....	238
58	Espectro de infrarojos (IR) de Trioleína (58).....	239
59	Espectro de <sup>13</sup> C-NMR de Trioleína (58).....	240
60	Espectro DEPT-135 del 4-Hidroxibenzaldeído (78).....	241
61	Espectro de <sup>13</sup> C-NMR del 4-Hidroxibenzaldeído (78).....	242
62	Espectro TOCSY del 4-Hidroxibenzaldeído (78).....	243
63	Espectro de <sup>1</sup> H-NMR del 4-Hidroxibenzaldeído (78).....	244
64	Espectro de masas (MS) del 4-Hidroxibenzaldeído (78).....	245
65	Espectro de <sup>1</sup> H-NMR del 4-Hidroxibenzaldeído (78).....	246

## Abreviaturas

AA	Ácido araquidónico
°C	Grados Celsius
<sup>13</sup> C	Carbono – isótopo de masa 13
<sup>13</sup> C-RMN	Espectro de resonancia magnética nuclear de Carbono 13
CCF	Cromatografía en capa fina
CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo deuterado
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diclorometano ó cloruro de metileno
cm	Centímetro
COSY	Espectro de correlación de protones ( <i>COrrrelation SpectroscopY</i> )
d	Doblete, multiplicidad en RMN
dd	Doble doblete
ddd	Triple doblete
DEPT_135	Espectro para discriminación de tipos de carbonos, con excitación de 135° ( <i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i> )
DHA	Ácido docosahexaenóico
D <sub>2</sub> O	Agua deuterada
DOCD <sub>3</sub>	Metanol deuterado
EEAGs	Esters etílicos de ácidos grasos
EI	Modo de ionización electrónica en el detector de espectrometría de masas ( <i>Electrón Ionization</i> )
EFA	Ácidos grasos esenciales
EM	Espectrometría de masas
EMAGs	Esters metílicos de ácidos grasos
EPA	Ácido eicosapentaenoico
EtOAc	Acetato de etilo
EtOH	Etanol
eV	Electronvoltios
FAB	Ionización por bombardeo con átomos rápidos en EM ( <i>Fast Atom Bombardment</i> )
GnRH	Hormona liberadora de gonadotrofina
GC	Cromatografía de Gases ( <i>Gas Chromatography</i> )
GC-MS	Cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas
g x l <sup>-1</sup>	Gramo por litro
h	Hora
<sup>1</sup> H	Protón
<sup>1</sup> H-RMN	Espectro de resonancia magnética nuclear de protón
Hz	Hercios
HMBC	Experimento que permite determinar relaciones entre protones y carbonos separados por 2 o 3 enlaces ( <i>Heteronuclear Multiple Bond Coherence</i> )
HMQC	Experimento bidimensional determinar correlaciones C/ H a un enlace ( <i>Heteronuclear Multiple Quantum Coherente</i> )
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia ( <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )
HUFAs	Ácidos grasos poliinsaturados ( <i>Hight Unsaturated Fatty acids</i> )
IR	Espectroscopía de Infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento en RMN
k	kilo



## Abreviaturas

kcuenta	Kilocuenta
kDa	Kilodaltons
kg/ ha	Kilogramos por hectárea
LD <sub>50</sub>	Dosis letal para el 50 % de organismos ensayados
m	Multiplete, multiplicidad en RMN
MeOH	Metanol
min.	Minuto
mg.	Miligramo
ml	Mililitro
m/ z	Cociente masa/carga
MHz	Megahercios
nm	Nanómetro, unidad de longitud de onda
NOESY	Experimento 2D para determinar el Efecto Nuclear Overhauser ( <i>Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy</i> )
PNMs	Productos Naturales Marinos
p.f.	Punto de fusión
ppm	Partes por millón
Tr	Tiempo de retención, parámetro de la cromatografía de gases
RMN	Resonancia magnética nuclear
SiO <sub>2</sub>	Sílice (dióxido de silicio)
t	Triplete, multiplicidad en RMN
TCA	Ciclo del ácido tricarbóxico
TOCSY	Experimento bidimensional para determinar todas las correlaciones H/H de un sistema de espín -hasta 4, 5 enlaces- ( <i>Total Correlation Spectroscopy</i> )
Rf	Factor de retención, parámetro de la cromatografía en capa fina
s	Singlete
μm	Micrometro (10 <sup>-6</sup> metro)
UV	Espectroscopía ultravioleta
(w/ w)	Peso/peso
Å	Ångström
δ	Desplazamiento químico en RMN (ppm)
[α] <sub>D</sub>	Rotación óptica específica

# *CAPITULO 0*

## 0-1. Introducción

La acuicultura depende del uso de productos químicos para su desarrollo, en una proporción creciente a medida que se intensifica la naturaleza del sistema de cultivo empleado. Los productos químicos son responsables de una mejora en la productividad en los criaderos pues proporcionan una mayor supervivencia larvaria y una mejor eficiencia alimentaria, reducen el estrés en el transporte de animales, controlan a los agentes patógenos, combaten los epífitos y organismos adheridos responsables de la disminución del rendimiento de las conducciones de agua, al incrementar la relación carga/ peso de estructuras y materiales (Subasinghe y col., 2000). Sin embargo, gran parte de estos procedimientos operativos utilizan productos químicos sintéticos, los cuales acaban impactando de forma negativa en el medio ambiente y salud animal/humana por su ecotoxicidad (Tabla 0-1) (Alderman y Michel, 1992). Como es evidente, cualquier investigación dirigida hacia la obtención de productos menos agresivos es de interés general, tanto desde un punto de vista industrial como académico.

<i>Contaminante</i>	<i>Fuente/ uso</i>	<i>Impacto</i>
<b>Antibióticos</b>	Criaderos, tanques de cultivo	Acumulación en sedimentos y organismos, disminución diversidad genética de la microflora béntica.
<b>Pesticidas</b>	Jaulas, lechos algales	Muerte de invertebrados.
<b>Desinfectantes</b>	Criaderos, tanques de cultivo	Hipoxia, mortalidad.
<b>Antiincrustantes</b>	Jaulas	Muerte de invertebrados.
<b>Hormonas</b>	Criaderos	Desconocido.

**Tabla 0-1.** Clasificación de los compuestos químicos usados en acuicultura que pueden llegar a ser contaminantes, sus fuentes, usos e impacto (CBD, 1992, 2004).

En el contexto de un modelo de acuicultura racional y sostenible, los productos naturales empiezan a adquirir importancia, una vez que pueden ofrecer un amplio repertorio de componentes con diferentes aplicaciones. Se han aportado evidencias de que estos compuestos han jugado un papel nada despreciable dentro de la acuicultura contemporánea, y que representan un menor riesgo, cuando se les compara con los mencionados productos sintéticos. En este sentido, el 31 de diciembre de 2003, la Agencia de Protección Medioambiental de Estados Unidos

(EPA) prohibió la utilización de todos los conservantes de la madera conteniendo arsenato de cobre cromatado, resaltando la importancia de encontrar “alternativas naturales”. Hoy se sabe que las esponjas del orden *Verongida* no son incrustadas por macroorganismos por poseer mecanismos químicos de defensa; la más notable característica de estas esponjas es que biosintetizan alcaloides, derivados de la dibromotirosina, que son antimicrobianos, citotóxicos y antiincrustantes (Venkateswarlu y col., 1998; Ferriol y col, 2008).

Por otra parte, los antecedentes relacionados con la acuicultura informan del uso de los productos naturales como desinfectantes, herbicidas, pesticidas, parasiticidas y antibióticos (Weston, 2000), así como suplementos alimenticios, en forma de vitaminas, ácidos grasos, carotenoides, inmunoestimuladores, hormonas y atrayentes (Boonyaratpalin, 2000). Es evidente el interés fito y zootécnico que todo esto representa.

El estudio químico de un organismo, y la elucidación de las estructuras moleculares de sus componentes, puede dar lugar a una serie de aplicaciones que van desde la utilización del propio organismo estudiado como materia prima bruta, sin ningún tipo de tratamiento, hasta la producción masiva de éste para la posterior aplicación de procedimientos extractivos, en orden a la producción industrial, en “biofábricas”, de productos de alto valor añadido aplicables a sectores como el farmacéutico, cosmético, nutracéutico, agrario y, por supuesto, acuícola.

En esta tesis, con el propósito de descubrir organismos y productos naturales potencialmente aplicables a una acuicultura de carácter sostenible, se han planteado los siguientes objetivos:

- 1) Efectuar una revisión de los antecedentes bibliográficos de la química de los productos naturales en relación con la acuicultura.
- 2) Estudiar los metabolitos producidos por el hongo zoospórico *Schizochytrium aggregatum* suministrado por “Aquafauna Bio-Marine”.
- 3) Estudiar los metabolitos producidos por el hongo filamentoso *Paecilomyces variotii*, aislado del medio marino canario.
- 4) Estudiar los metabolitos producidos por el hongo filamentoso *Penicillium roqueforti*, aislado del medio marino canario.

La preferencia de estos organismos como objeto de estudio, un microhongo zoospórico y dos hongos filamentosos, responde a unos motivos concretos. En primer lugar, hay antecedentes de aplicación de los hongos zoospóricos con fines nutricionales en acuicultura (Lewis y col., 1999; Nichols y col., 1999). En segundo lugar, como parte de la línea de investigación en “Química Orgánica y Materiales Bioactivos” que ha sido desarrollada desde hace dos décadas por el grupo de investigación de “Tecnología Química y Desarrollo Sostenible” de la ULPGC, es deseable abrir una nueva frontera, dirigida a la obtención de productos naturales de microhongos aislados en los ecosistemas marinos del litoral canario, con especial énfasis en los de tipo filamentosos, por su potencial aplicabilidad en acuicultura.

## **0-2. Revisión bibliográfica: historia y aplicaciones de los productos naturales en acuicultura**

### **0-2.1. Definición de Productos Naturales**

La biosfera, con su inmensa diversidad, representa una fuente de productos naturales con aplicaciones nutricionales, farmacológicas y cosméticas (Hay y Fenical, 1996; Nichols y col., 1999). El hombre, conocedor de esta biodiversidad desde tiempos remotos, ha usado estos recursos en forma de organismos o sus extractos para alimentarse, curarse e incluso matarse (Herbert, 1989). Un ejemplo lo encontramos en el uso de microalgas en la nutrición, fechado hace 2000 años, cuando la cianobacteria *Nostoc flagelliforme* fue utilizada como alimento en China (Gao, 1998). Otro ejemplo, ahora de los tiempos modernos, lo constituye el uso del nutraceutico glucosamina, que se obtiene a partir de la quitina del exoesqueleto de los crustáceos marinos (Barrow y Shahidi, 2007).

Convencionalmente, los componentes orgánicos producidos por los organismos son considerados como productos naturales. Algunos autores consideran como “natural” sólo aquellas sustancias que, procediendo directamente de una fuente renovable, no se deriven de otra por modificación química (CBD, 1992).

En términos fisiológicos, todo ser vivo posee un metabolismo primario, el cual es responsable de la generación de energía metabólica y la elaboración de estructuras moleculares (Pietra, 1990). Tales estructuras están constituidas por unidades oligoméricas, como los aminoácidos, azúcares, ácidos grasos y nucleótidos que se combinan para producir los polímeros necesarios para la vida, como las proteínas, carbohidratos y lípidos complejos (Harborne, 1988; Mann y col., 1994).

Los metabolitos secundarios, sin embargo, son generados a través de rutas biogénicas específicas. Estas rutas son importantes, pero no críticas, para la vida del organismo, a saber: ruta de los terpenoides, ruta de los policétidos, ruta del nitrógeno (alcaloides, polipéptidos), ruta del ácido shikímico (shikimatos) y ruta de los ácidos grasos (Stone y Willians, 1992). En este contexto, y desde la óptica de la química, la definición de productos naturales marinos (PNMs) alude a los compuestos orgánicos producidos por microorganismos, algas, esponjas, cnidarios, plantas marinas, moluscos y peces en el medio marino (McClintock y Baker, 2001).

Buscando evitar dificultades semánticas, se ha optado en esta tesis por una definición más amplia de lo que se entiende por productos naturales. Se han considerado como tales, aquellos componentes orgánicos producidos por un organismo en su totalidad; por lo tanto, abarca tanto a los metabolitos primarios como a los derivados del metabolismo secundario, por ejemplo polisacáridos y terpenoides respectivamente.

## **0-2.2. Acuicultura y productos de alto valor añadido**

Históricamente, las actividades relacionadas con la práctica de la acuicultura se remontan a más de 3.000 años (Guo, 2000). Durante la edad media, ya se habían establecido en Europa algunas de estas prácticas de cultivo. No obstante, la acuicultura como actividad zootécnica solamente ha comenzado a perfilarse a partir del último siglo, con la introducción de técnicas depuradas de manejo, lo que permitió la intensificación de los sistemas de cultivo.



Técnicamente, esta actividad se desarrolla a través de prácticas operacionales que comprenden la preparación de estanques y estructuras de cultivo, el manejo del suelo, del agua y de la productividad acuática, el transporte de organismos vivos, control de la reproducción, promoción del crecimiento y nutrición, gestión de enfermedades, procesamiento y mejora del producto final (Bernabé, 1991; 1996).

El propósito fundamental de la acuicultura es, por lógica, la producción de materia viva a partir del elemento acuático. En este sentido, esta actividad consiste en la manipulación de los medios naturales o artificiales que puedan llevar a la producción de especies útiles al hombre. Entre sus principales vertientes destacan la piscicultura, la carcinocultura, la malacocultura y la talasiocultura (Pillay, 1997). Sin embargo, últimamente se ha introducido el término “Acuicultura de Organismos no Alimentarios” para describir una próspera actividad que acaba de aparecer (Liebezeit, 2005). Consiste en la producción de los productores de los “Productos de Alto Valor Añadido”. Así, invertebrados y peces marinos son ya fuentes de metabolitos de interés comercial. Es presumible que esta actividad crecerá en importancia a medida que el conocimiento de los productos naturales y la ecología química se desarrollen (Inglis, 2000; Galm y Shen, 2007). Entre los productores de estos componentes destacan las esponjas y sus organismos asociados, briozoos y moluscos, los cuales han recibido especial atención por parte de la investigación y desarrollo (Haefner, 2003). En este campo, la ULPGC, es pionera, pues está desarrollando en este momento un proyecto empresarial orientado a la producción de citotóxicos por maricultura de la esponja *Verongia aerophoba*, la cual se está cultivando en el archipiélago balear (Ferriol y col., 2008).

Por otro lado, la reproducción de los peces es regulada en el cerebro por medio de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), que se produce específicamente en el hipotálamo (Harvey y Hoar, 1980). Este decapeptido estimula la producción de gonadotropinas por parte de la hipófisis, y es uno de los primeros productos naturales de alto valor añadido aplicados en acuicultura para inducir la reproducción. En este sentido, los extractos pituitarios provenientes de la carpa (*Cyprinus carpio*) y del salmón (*Salmo salar*) se han utilizado con éxito (Sundararaj,

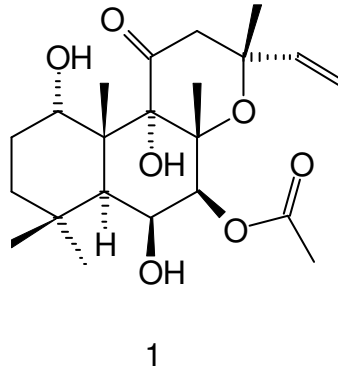
1981). Tal procedimiento, conocido como hipofisación, ha devenido en una práctica corriente en la piscicultura moderna. En la actualidad, maduración final, ovulación y espermiación se provocan en las especies de mayor interés acuícola, sobretodo en peces de agua dulce (Tabla 0-2).

<i>Fuente biológica del extracto</i>	<i>Especie inducida</i>	<i>Referencia</i>
<b>Rana</b>	<i>Clarias gariepinus</i>	(Adebayo y Fatoyinbo, 2008)
<b>Gallina</b>	<i>Tinca tinca</i> (cyprinideo)	(Amaral, 1995)
<b>Carpa común, <i>Cyprinus carpio</i></b>	<i>Esox lucius</i> (lucio)	(Billard y Marcel, 1980)
	<i>Clarias batrachus</i>	(Sahoo y col, 2008)
	<i>Colossoma mitrei</i>	(Godinho y Godinho, 1986)
	<i>Cyprinus carpio</i>	(Madu y col., 1990)
	<i>H. molitrix</i>	(Brzuska, 1999; Singh, 1989)
	<i>Silurus glanis</i>	(Kouril y Hamackova, 1982)
	<i>Ictalurus punctatus</i>	(Bidwell y col., 1985)
	<i>Aristichthys nobilis</i>	(Ufodike y Amadi, 1991)
<b>Carpa india, <i>Labeo rohita</i></b>	<i>Dicentrarchus labrax</i>	(Arcarese y Ravagnan, 1972)
<b>Carpa india, <i>Labeo rohita</i></b>	<i>Labeo rohita</i>	(Khan y col., 1992)
<b><i>Clarias gariepinus</i></b>	<i>Ctenopharyngodon idella</i>	(Schoonbee y Prinsloo, 1986)
<b><i>Clarias lazera</i></b>	<i>Clarias lazera</i>	(Hogendoorn y Vismans, 1980)
<b><i>Clarias macrocephalus</i></b>	<i>Clarias macrocephalus</i>	(Mollah y Tan, 1983)
<b>Salmón del Pacífico</b>	<i>Chanos chanos</i>	(Vanstone y col., 1977)
<b>Salmón</b>	<i>C. auratus</i> (carpa dorada)	(Suzuki y col., 1988)
<b>Trucha arco-iris</b>	<i>O. mykiss</i> (trucha arco-iris)	(Jalabert, 1978)
<b>Pez gato marino</b>	<i>H. molitrix</i>	(Varghese y Rao, 1976)
<b><i>Mugil cephalus</i></b>	<i>Mugil cephalus</i>	(Brasola y col., 1979)

**Tabla 0-2.** Extractos pituitarios usualmente utilizados como inductores hormonales en la reproducción de peces de cultivo.

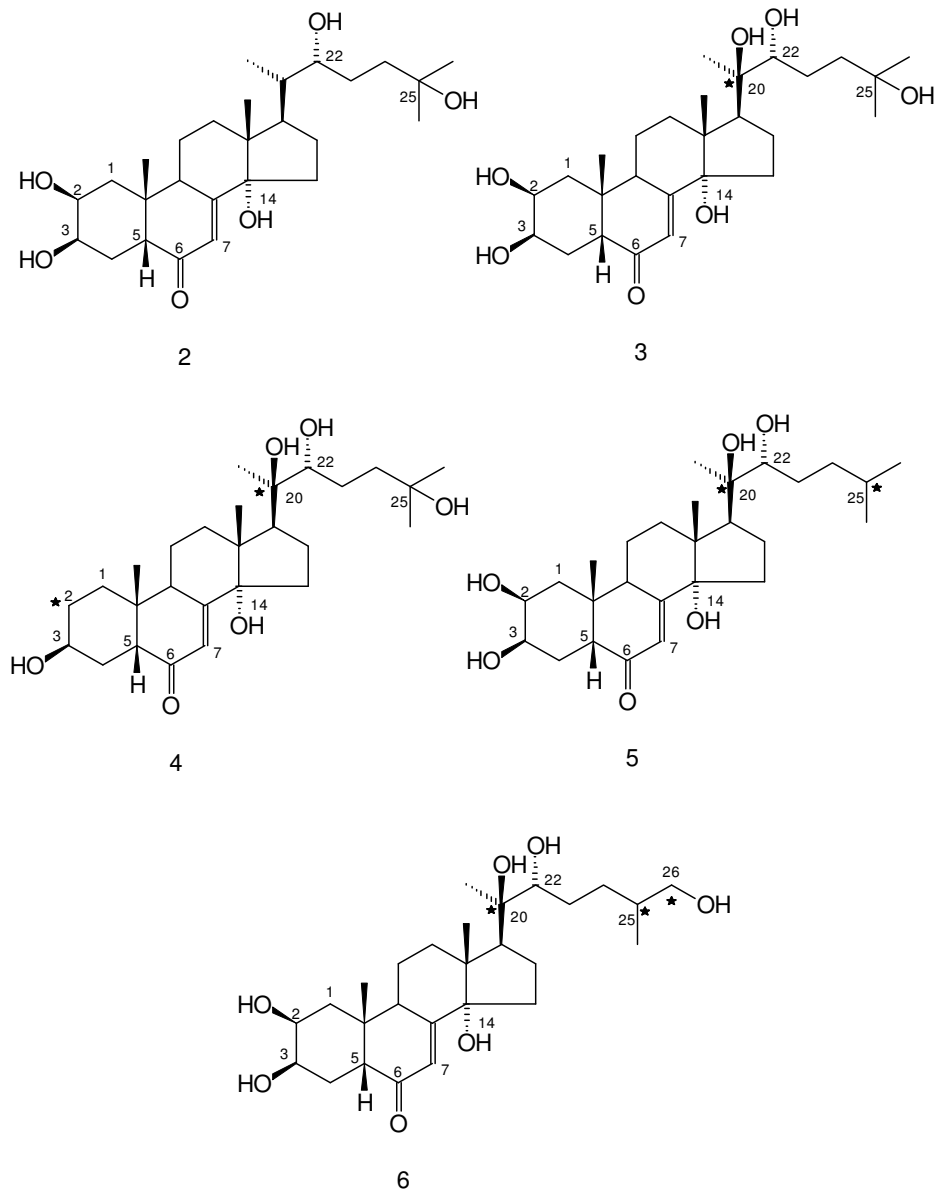
Algunos fisiólogos de la reproducción han mostrado interés por los metabolitos secundarios de una planta india conocida como cóleo (*Coleus forskohlii*). Su utilidad reside en la actividad de su componente principal, el diterpeno forskolina (**1**) (Bhat y col., 1983). Según Chaube y Haider (1997), este compuesto actúa estimulando la acción gonadotrópica, desencadenando la esteroidogénesis folicular y maduración ovocitaria final en peces. En concreto, se ha observado que la forskolina estimula la maduración ovocitaria en el pez medaka, *Oryzias latipes* (Iwamatsu y col., 1987); además, presenta un efecto aditivo sobre la disolución de la vesícula germinal en la perca, *Anabas testudineus* (Bhattacharyya y col., 2000); y estimula la

producción de  $17\beta$ -estradiol, hormona responsable de la síntesis de vitelogenina en el hígado de la trucha arco-iris, *Oncorhynchus mykiss* (Yeo, 1998).



**Figura 0-1.** Forskolina.

La hormona de la muda de los crustáceos marinos, al igual que la de los insectos, está constituida por mezclas de ecdisteroides como crustecdisona (**3**) (Horn y col., 1968), 2-deoxicrustecdisona (**4**) (Galbraith y col., 1968) y la inokosterona (**6**) (Faux y col., 1969). Esta familia de moléculas ha sido aislada del reino vegetal; así por ejemplo, la ponasterona A (**5**), se aisló de las hojas de *Podocarpus nakaii* (Nakanishi y col., 1966), crustecdisona (**3**) de *Podocarpus elata* (Galbraith y Horn, 1969) y, finalmente, 2-deoxicrustecdisona (**4**), y ecdisona (**2**) del helecho, *Blechnum minus* (Chong y col., 1970). Esto significa que se pueden utilizar determinadas fracciones de extractos vegetales, ricas en estos fitoecdisteroides, para modular la metamorfosis, crecimiento y reproducción de crustáceos como el cangrejo azul, *Callinectes sapidus* (Chan, 1995) o la langosta americana, *Homarus americanus* (Cheng y Chang, 1991).

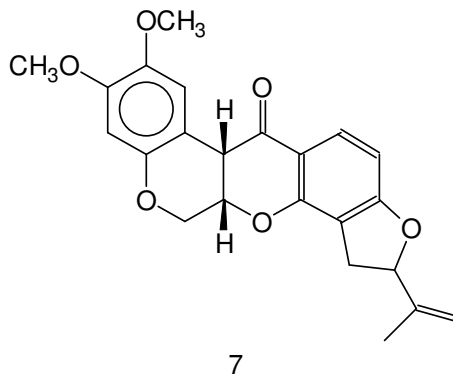


\* = Modificaciones estructurales con respecto a Ecdisona (2)

**Figura 0-2.** Fitoecdisteroides.

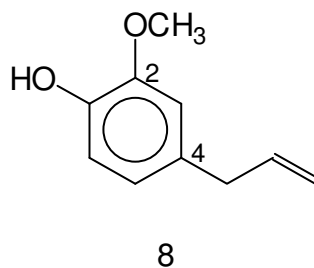
La rotenona (7) es una isoflavona biosintetizada por la ruta de los policétidos. Este metabolito secundario, que se extrae de las raíces de *Derris* sp. y otras variedades de plantas, se presenta como un potente inhibidor metabólico capaz de bloquear la respiración celular en seres vivos (Pires, 1978). Este compuesto tiene pues, un interés profiláctico, ya que sirve para la erradicación de especies ícticas indeseables presentes en estanques dedicados a la acuicultura (Amey, 1981). Posee, además, una fuerte acción en el control de invertebrados acuáticos,

especialmente de las ninfas de odonatos, las cuales son voraces depredadoras de larvas de peces y crustáceos (Beal y Anderson, 1993).



**Figura 0-3.** Rotenona.

Otro producto natural de interés acuícola es el aceite de clavo, el cual muestra propiedades anestésicas (Lee y Shibamoto, 2001). Se trata de un componente obtenido a partir del extracto de la flor de *Syzygium aromaticum*; según Della Porta y col. (1998), este aceite esencial contiene, entre otras sustancias, un shikimato de naturaleza fenólica conocido como eugenol (8), y se obtiene como un producto de bajo coste, reducida toxicidad y rápida degradación, lo que le aporta gran seguridad de aplicación y, por tanto, ventaja con respecto a otros anestésicos usados en acuicultura (Taylor y Roberts, 1999). Paralelamente, este material se ha utilizado como fungicida en la protección de los huevos de salmónidos (Bouchard y col., 2001).



**Figura 0-4.** Eugenol, o 4-alil-2-metoxifenol.

## 0-3. Perspectivas actuales de los productos naturales marinos (PNMs) en acuicultura

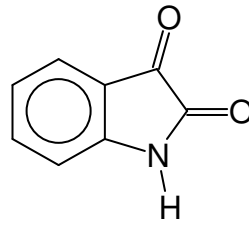
### 0-3.1. Perspectivas generales

Los organismos marinos biosintetizan los PNM para conseguir ventaja adaptativa o para mantener la homeostasis en su ambiente. Entre 1977 y 2009 se han descrito miles de metabolitos nuevos en organismos que abarcan desde microbios hasta peces. Todo ello supone aún menos del 1% de los organismos marinos totales. Una revisión de la literatura revela que incluso el agua de mar tiene propiedades bactericidas, probablemente debido a la producción de antibióticos por las bacterias, algas planctónicas y hongos (McClintock y Baker, 2001).

En el campo de la acuicultura, las enfermedades aparecen en todos los estadios, desde los huevos en adelante. El control de éstas mediante antibióticos tiene algunas limitaciones; así, no es de extrañar que organismos competentes hayan regulado el uso de ellos en el cultivo del camarón. Los problemas creados por el uso indiscriminado de estos compuestos incluyen: desarrollo de bacterias resistentes a las drogas, contaminación ambiental, y acumulación de residuos en los tejidos de la especie cultivada. Por otra parte, la gestión de la enfermedad usando vacunas tiene la limitación de que son demasiado específicas, es decir, si el agente que causa la enfermedad es otro, la vacuna no sirve (Brown, 1989). Considerando la potencialidad de los PNM para desarrollar nuevas drogas, con aplicación en la terapéutica de organismos acuáticos o como suplementos alimentarios, se ha considerado objetivo de esta tesis describir aquellos metabolitos que, por su actividad, han generado grandes expectativas.

Una experiencia en este campo la constituye el caso del camarón de estuario, *Palaemon macrodactylus*. Gil-Turnes y col. (1989) observaron que los huevos de *P. macrodactylus* poseen un epibionte bacteriano, el cual, cuando se elimina por tratamiento con antibióticos, produce un rápido ataque de los huevos por hongos patogénicos. Ello se debe a la ausencia del agente antifúngico producido por la bacteria, el shikimato isatina (9). Este caso demuestra que los estudios de PNM en los simbioses bacterianos beneficiosos son relevantes en acuicultura.

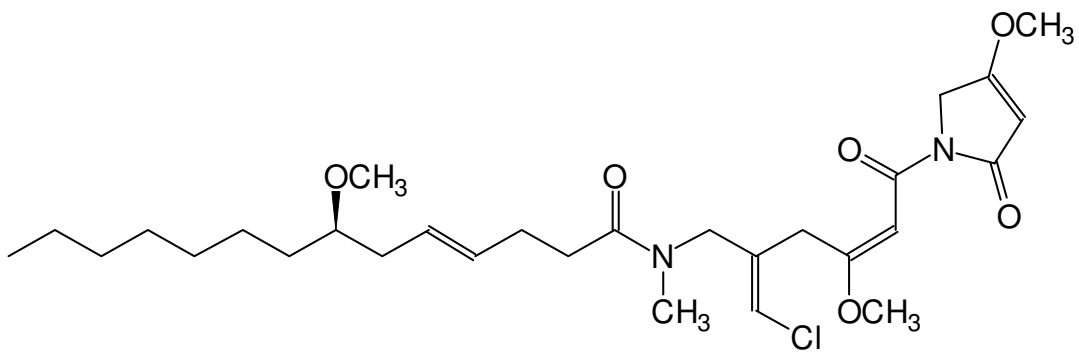




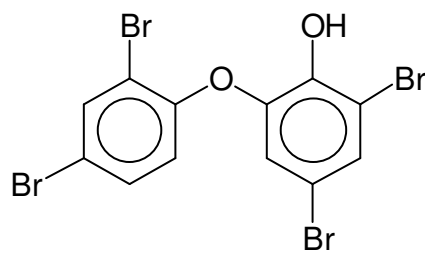
9

**Figura 0-5.** Isatina.

La cianobacteria filamentosa *Lyngbya majuscula* produce la malingamida A (**10**). Este metabolito resultó un fagorrepelente del pez cirujano y, sin embargo, fagoestimulador de la liebre marina, *Stylocheilus longicauda* (McClintock y Baker, 2001). Otra cianobacteria, la *Oscillatoria spongelliae* produce el difenil-éter bromado (**11**) con propiedades bactericidas (Unson y col., 1994).



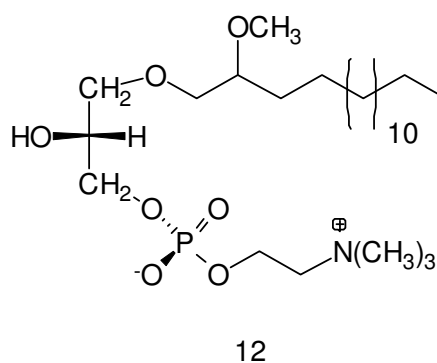
10

**Figura 0-6.** El fagorrepelente/ fagoestimulador malingamida A.

11

**Figura 0-7.** Un bactericida marino.

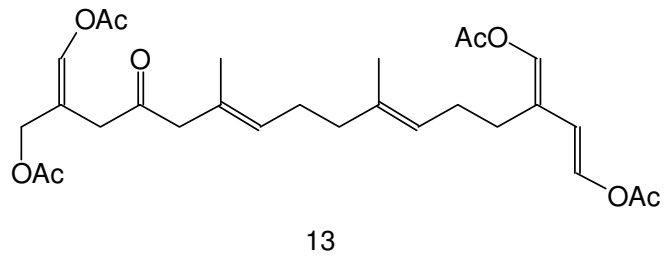
Las esponjas marinas suelen producir fagorrepelentes, antiincrustantes, antibióticos, (antibacterianos y fungicidas), antivirales, inhibidores del asentamiento larvario, fotoprotectores, factores alelopáticos e inhibidores de la biosíntesis del colesterol. Un ejemplo de este último grupo lo constituye el fosfolípido (**12**), aislado de la esponja *Crella incrustans* (Butler y col., 1996). Por otra parte, en un experimento concebido para controlar los patógenos bacterianos en camarones, se alimentaron éstos con extractos de la esponja marina *Dendrilla nigra*. Los resultados indicaron actividad vibriostática, demostrándose así que los metabolitos secundarios de *D. nigra* constituyen una alternativa a los antibióticos que actualmente se usan en carcinocultura (Selvin y col., 2004; Selvin y Lipton, 2004).



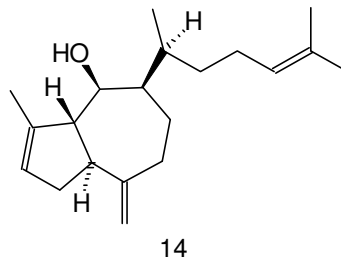
**Figura 0-8.** Fosfolípido, inhibidor de la biogénesis del colesterol.

Las macroalgas marinas suelen producir fagorrepelentes, antiincrustantes, factores alelopáticos y fitoalexinas (fungicidas). Así, el diterpeno chlorodesmina (**13**) es un fagorrepelente que elabora un alga del género *Chlorodesmis*; el pachidictiol A (**14**) es un diterpeno antiincrustante que fabrica el alga *Dictyota menstrualis* (protege al alga del asentamiento de las larvas de briozoos); el fimbrolido (**15**) es otro antiincrustante que biosintetiza el alga *Delisea pulchra*; y la telfairina (**16**) es un molusquicida fabricado por el alga *Plocamium telfairiae* (Watanabe y col., 1989; 1990; McClintock y Baker, 2001). Por otra parte, en Japón se ha utilizado la harina de una macroalga (*Ulva* sp.) como suplemento alimenticio para incrementar tanto la resistencia a enfermedades como la velocidad de crecimiento del besugo del Mar Muerto, *Acanthopagrus schlegeli* (Nakagawa y col., 1987). El alga le suministra al pescado tanto

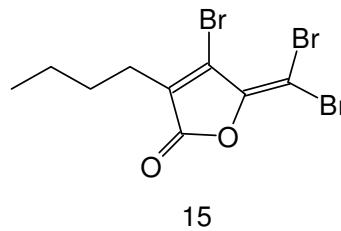
estimuladores del sistema inmunológico como hormonas de crecimiento, lo que indica que este macrófito es “proactivo” cuando se utiliza como suplemento alimenticio.



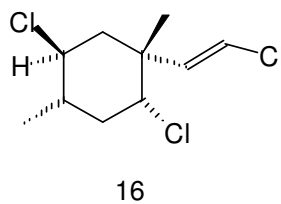
**Figura 0-9.** El fagorrepelente chlorodesmina.



**Figura 0-10.** El antiincrustante pachidictiol A.



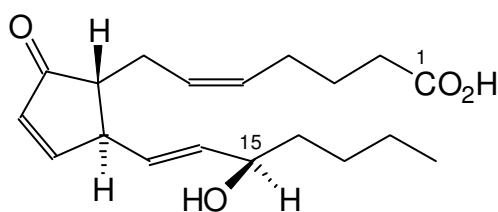
**Figura 0-11.** El antiincrustante fimbrolido.



**Figura 0-12.** El fagorrepelente/ molusquicida telfairina.

Los cnidarios: corales, gorgonias y otros, fabrican normalmente fagorrepelentes, antiincrustantes, factores alelopáticos, inhibidores del asentamiento/ metamorfosis larvaria y fotoprotectores. La excepción a esta regla la constituye la prostaglandina (15R)-PGA<sub>2</sub> (17), un

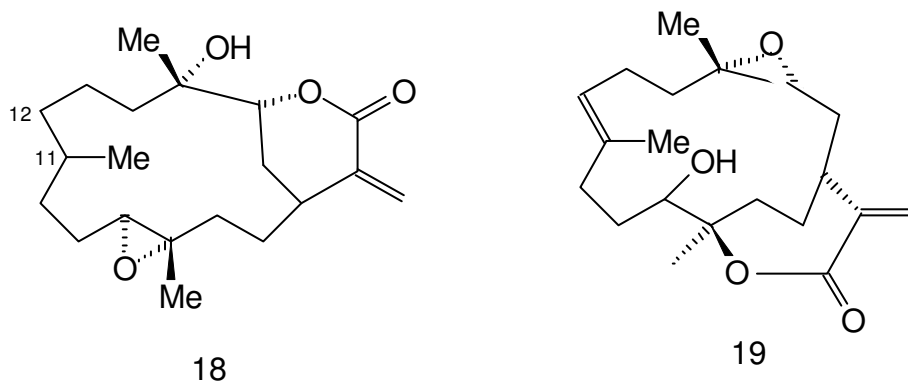
derivado de los ácidos grasos que fabrica la gorgonia *Plexaura hormomalla* (Braekman y Daloze, 1983). Las prostaglandinas son moléculas presentes al nivel traza en todos los tejidos animales, donde desempeñan un importante papel en la regulación de numerosos procesos bioquímicos, aunque en *P. hormomalla* se acumula la (15R)-PGA<sub>2</sub> al nivel del 1,5% (w/ w). A pesar de que estas sustancias suelen ser estimuladoras de la actividad de la musculatura lisa, hipotensoras y tranquilizantes, la (15R)-PGA<sub>2</sub> resultó inactiva. Sin embargo, por síntesis se transformó en su epímero (15S)-PGA<sub>2</sub> que sí resultó activa.



17

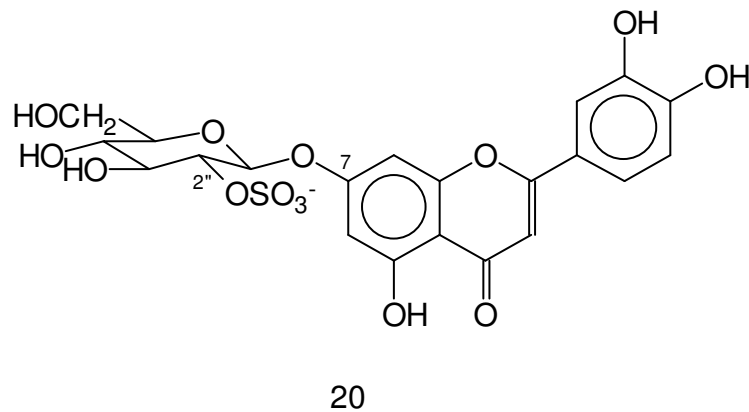
**Figura 0-13.** Prostaglandina (15R)-PGA<sub>2</sub>.

Los diterpenos 11,12-dihidroflexibilido (**18**) y sinulariolido (**19**) son compuestos producidos por el coral espagueti (*Sinularia flexibilis*); el primero resultó un fagorrepelente del pez mosquito (*Gambusia affinis*) y el segundo resultó con actividad algicida (Aceret y col., 2001; McClintock y Baker, 2001).

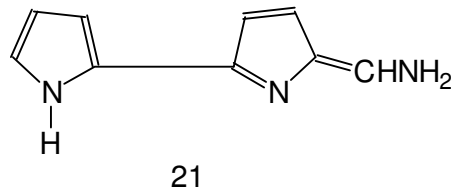


**Figura 0-14.** Fagorrepelentes/ algicidas del coral espagueti.

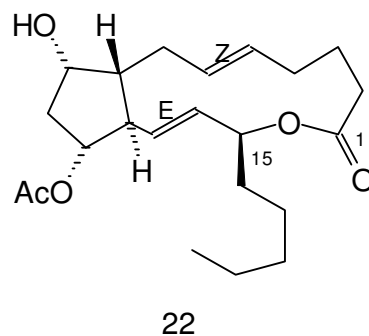
La fanerógama marina *Thalassia testudinum* fabrica la fitoalexina (fungicida) luteolin-7-O-β-D-glucopiranosil-2-sulfato (**20**) (Jensen y col., 1998); el molusco *Tambja abdere* produce la tambjamina A (**21**), un fagorrepelente y, al mismo tiempo, feromona de alarma (McClintock y Baker, 2001); finalmente, la prostaglandina F-1,15-lactonizada (**22**) es una hormona que influye en la reproducción y desarrollo de los estados juveniles del opistobranquio *Tethys fimbria* (Di Marzo y col., 1991; 1992).



**Figura 0-15.** Fungicida de *Thalassia testudinum*.



**Figura 0-16.** Fagorrepelente de *Tambja abdere*.



**Figura 0-17.** Hormona de *Tethys fimbria*.

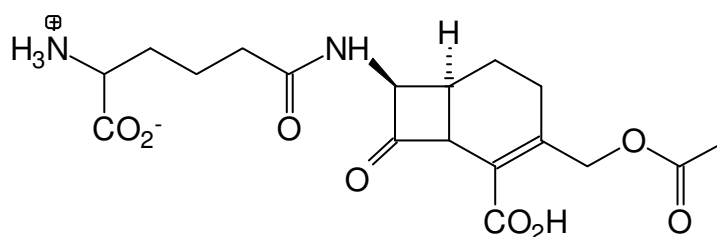
### 0-3.2. Perspectivas de los PNMs de origen fúngico

Aunque los hongos y sus metabolitos sean habitualmente conocidos por su toxicidad e influencia negativa en la salud humana, animal y vegetal (Bricknell y Dalmo, 2005), los últimos avances en la investigación de los PNMs han demostrado que estos organismos constituyen, además, una prometedora fuente de sustancias bioactivas con interesantes aplicaciones (Rasmussen y Morrissey, 2007). Sus características heterotróficas y frecuentemente saprofiticas les confieren gran capacidad para producir y degradar compuestos químicos (Verbist y col., 2000). Sus enzimas han sido incluso propuestos como alternativa a los agentes anti-incrustantes tradicionales (Kristensen y col., 2008).

El micelio del hongo filamentoso marino *Phoma herbarum* produce un polisacárido, de tamaño molecular  $2,4 \times 10^3$  kDa, que es responsable del incremento de la actividad fagocitaria en ratones, presentando además actividad inmunomoduladora (Yang y col., 2005). Los  $\beta$ -glucanos son conocidos polisacáridos, siendo las estructuras activas las del  $\beta$ -1,3 y  $\beta$ -1,6 glucano, las cuales son biosintetizadas principalmente por hongos y levaduras (Abad y Bermejo, 2001; Spiridon y Popa, 2008). La immunoestimulación, por suministro con la dieta de estos  $\beta$ -glucanos, ha resultado eficaz frente a *Aeromonas salmonicida*, bacteria responsable de algunas enfermedades que sufren los cultivos de la trucha arco-iris (*Oncorhynchus mykiss*) y el salmón atlántico, *Salmo salar* (Jeney y Anderson, 1993; Guttvik y col, 2002). También ha sido eficaz ante otras enfermedades infecciosas que golpean la carcinocultura (Fisher y col., 1978; Shimonoseki y Toshiaki, 1997). Por otro lado, suplementos alimenticios fabricados con el micelio del hongo *Paecilomyces japonica* han producido un incremento de la eficiencia alimentaria, mejor crecimiento y también mejor respuesta fagocitaria en juveniles de pez hirame, *Paralichthys olivaceus* (Lee y col., 2002).

Los dinoflagelados producen un impacto comercial negativo en los cultivos de moluscos ya que fabrican toxinas que, a través de éstos, transmiten hasta los consumidores finales (García Camacho y col., 2007). Por la misma razón, también las cianobacterias son responsables del

desagradable sabor y olor que suele adquirir la carne del pez gato *Ictalurus punctatus*, una de las principales especies dulceacuícolas cultivadas en Norte America (Martin y col., 1988; Smith y col., 2008). La inhibición de estos microorganismos en los cultivos es, pues, un objetivo prioritario en acuicultura, habiéndose usado para ello múltiples algicidas comerciales (Schrader, 2005). En un intento de encontrar PNMs que cumplan con la misma función, se han descubierto las clonostachisinas A y B, que fueron aisladas a partir del hongo marino *Clonostachys rogersoniana*. Se trata de dos nonapéptidos cíclicos ( $C_{54}H_{89}N_9O_{10}$  y  $C_{53}H_{87}N_9O_{10}$ ) que presentan un efecto inhibitorio selectivo frente al dinoflagelado *Prorocentrum micans* (Adachi y col., 2005). Por otra parte, Redhead y Wright (1978) descubrieron dos cepas fúngicas, *Acremonium* sp. y *Emericellopsis* sp., que inhibieron el crecimiento de cianofíceas, siendo el agente responsable de esta actividad algicida el antibiótico cefalosporina C (**23**), biosintetizado por ambos hongos.

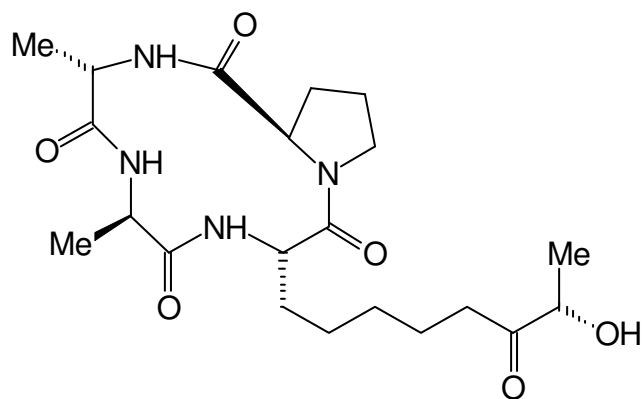


23

**Figura 0-18.** Cefalosporina C, de *Acremonium* sp. y *Emericellopsis* sp.

Del ascomiceto *Chromocleista* sp. se han aislado las dicetopiperazinas (Park y col., 2006). Se trata de polipéptidos cíclicos que se han mostrado activos frente a la vibriosis, una de las enfermedades que más pérdidas económicas causan en maricultura (Bordas y col., 1998). Esta enfermedad está causada por varias especies bacterianas pertenecientes al género *Vibrio*, siendo la especie *Vibrio anguillarum* la principal responsable del fenómeno en peces, crustáceos y moluscos (Fdhila y col., 2003). Otra dicetopiperazina, la mactanamida (**24**), ha sido aislada del hongo marino *Aspergillus* sp., y se ha manifestado con actividad fungistática (Lorenz y col., 2008).

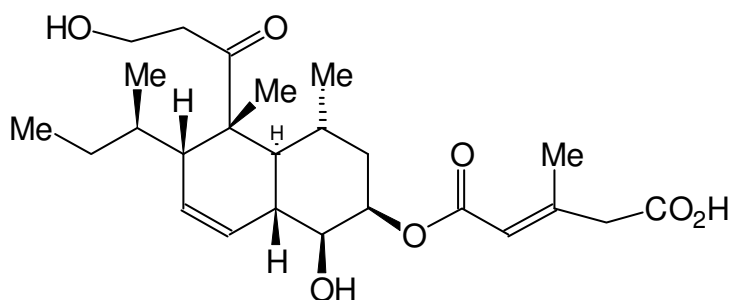




24

**Figura 0-19.** Mactanamida, de *Aspergillus* sp.

Kobayashi y col. (1993), estudiando el hongo imperfecto *Trichoderma harzianum*, un simbiote asociado a la esponja marina *Micale cecilia*, han aislado un nuevo policétido, la trichoharzina (**25**) con propiedades bactericidas.

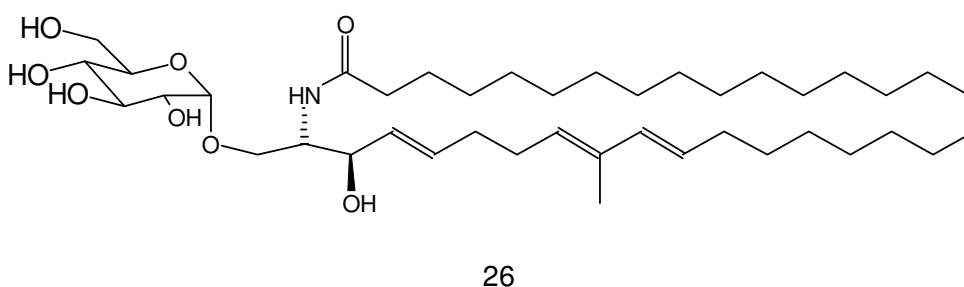


25

**Figura 0-20.** Trichoharzina, de *Trichoderma harzianum*.

Paralelamente, del fondo marino se ha aislado un nuevo Streptomiceto que produce otro policétido denominado SBR-22, el cual presentó actividad frente a la bacteria *Staphylococcus aureus* que, resistente a la methicillina (Sujatha y col., 2005), es responsable de la enfermedad que afecta a los ojos de la carpa plateada (*Hypophthalmichthys molitrix*) cuando se la cultiva en regiones tropicales (Shah y Tyagi, 1986).

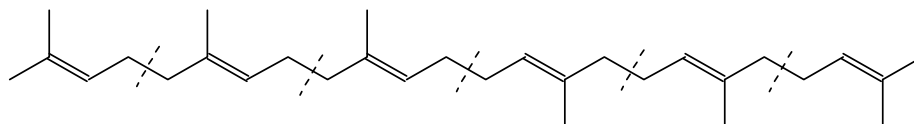
Los Thraustochytridos pertenecen a un grupo de microorganismos zoospóricos marinos que pueden ser descritos funcionalmente como hongos (Barr, 1992). Estos organismos producen moléculas de alto valor biológico, tales como los ácidos grasos poliinsaturados  $\omega 3$ , utilizados tanto en alimentación funcional humana como en acuicultura (Fan y Chen, 2006). También biosintetizan el thraustochitrosido C (**26**), el cual ha sido obtenido de una cepa de *Thraustochytrium globosum* (Jenkins y col., 1999). Esta inusual sustancia fúngica abre novedosas perspectivas en acuicultura, ya que la inclusión de este tipo de glicoesfingolípidos naturales en las dietas, es presumible que mejorará el crecimiento, tanto en larvas como en juveniles. Además, podría incrementar las tasas de supervivencia, disminuir la incidencia de malformaciones larvales y aumentar la resistencia al estrés (Tocher y col., 2008).



**Figura 0-21.** Thraustochitrosido C, de *Thraustochytrium globosum*.

El escualeno (**27**) es un triterpeno que se encuentra en el hígado de peces elasmobranquios, siendo éste su principal fuente (Xu y col., 2004). Este componente es un efectivo antioxidante natural, útil en nutraceutica (Yue y Jiang, 2009). En la actualidad, están siendo objeto de estudio una variedad de cepas de hongos Thraustochitridos y Labirintulomicetos, las cuales están siendo propuestas como potenciales substitutas de la fuente tradicional de escualeno (Jiang y col., 2004; Li y col., 2009). En este sentido, Chang y col. (2008) lograron aislar una nueva cepa de la levadura *Pseudozyma* sp., que fabrica al escualeno. La elevada tasa de producción de este metabolito hace que este organismo marino sea un firme candidato para la producción industrial de “escualeno microbiológico”. Por otro lado, se ha observado que la aplicación de la vacuna 763 con pequeñas dosis de escualeno es un remedio eficaz en la

prevención de la enfermedad causada por *Flavobacterium psychrophilum* en los cultivos de ayu *Plecoglossus altivelis*, uno de los mas importantes peces de agua dulce en Japón (Rahman y col., 2000).



27

**Figura 0-22.** Escualeno, de *Pseudozyma* sp.

Todos estos casos indican que el estudio de los PNM, en especial los de origen fúngico, es un campo prometedor en acuicultura ya que se trata de organismos que suministran nuevas drogas relacionadas con la estimulación del sistema inmunológico de las especies en cultivo o con la gestión de sus enfermedades (Bachère, 2003).

#### **0-4. El método aplicado en esta tesis**

El aislamiento e identificación de productos naturales requiere el uso de técnicas físicoquímicas de fraccionamiento y purificación. La exploración de estos productos es posible una vez se obtiene material biológico suficiente, bien sea a partir de organismos recogidos directamente de la naturaleza, bien cultivados a través de bioprocesos (fermentación, fotobiorreacción o maricultura). La biomasa obtenida puede ser conservada mediante congelación, liofilización o fijada químicamente en el seno de un disolvente. En el laboratorio de Química Orgánica II, del grupo de “Tecnología Química y Desarrollo Sostenible” de la UPLGC, el material biológico obtenido es habitualmente conservado congelado. Alternativamente, puede ser dejado en maceración en acetona o metanol varios días.

Las técnicas preliminares de separación empleadas en el laboratorio son aquellas realizadas a través de cromatografía de adsorción, por medio de columnas gravitatorias y a media presión, así como a través de métodos de partición líquido-líquido. Esta última técnica puede

aplicarse simplemente con la ayuda de un embudo de decantación, pudiendo realizarse de acuerdo con una variante del método establecido por Kupchan y col. (1973), el cual nos suministra fracciones de polaridad diferente.

A lo largo del proceso de separación de los componentes se podrá optar por una cromatografía de exclusión del tipo SEPHADEX, que permite separar familias de componentes con tamaño molecular similar. A continuación se podrán aplicar otras técnicas de separación; tal es el caso de la cromatografía de adsorción en columnas tipo *flash* o HPLC/ TLC preparativas. Finalmente, para la obtención de cristales puros se recurre a la cristalización del componente aislado (Leonard y col., 1998).

La elucidación estructural por métodos espectroscópicos requiere de sustancias perfectamente puras. Si hay éxito en la obtención de cristales, aún se podrá realizar un estudio de difracción de rayos X. En el caso contrario, si el componente purificado presenta una estructura no cristalina, entonces se recomienda la obtención de espectros de resonancia magnética nuclear de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , así como los espectros de masas. Con los espectros en mano, y una vez estudiados, el investigador propone la estructura del componente. Este proceso requiere de una revisión meticulosa de las estructuras ya descritas en la literatura.

Debido a la inmensa cantidad de productos conocidos, es muy conveniente recurrir a una base de datos potente. En la actualidad se encuentran al alcance de la comunidad científica, vía *on line*, numerosas bases de datos que tratan sobre el tema. Desde la más tradicional *Chemical Abstracts Registry*, ahora integrada en *Scifinder*, a otras más específicas como la *MarinLit*<sup>®</sup> editada por la Universidad de Canterbury (Nueva Zelanda), la cual abarca toda la literatura publicada sobre productos naturales marinos. Hay que citar también la *Antibase (Chemical Concepts)*, que trata exclusivamente sobre productos naturales aislados a partir de microorganismos y hongos superiores.

Una vez comprobados los antecedentes bibliográficos, y conjeturado que el componente aislado es novedoso, la elucidación estructural ha de realizarse de una forma más refinada. Para

tal fin, se necesita de un segundo espectro de masas de alta resolución para que se pueda determinar la fórmula molecular con exactitud, tanto de la molécula como de sus fragmentos. Con esta información en mano se puede deducir la estructura bidimensional del nuevo componente aislado (Colegate y Molyneus, 1993).

La obtención de la estructura tridimensional de las moléculas requiere de técnicas de resonancia magnética nuclear de alta resolución. Tales espectros aportan datos indirectos de acoplamiento entre núcleos cercanos en el espacio así como su dependencia angular a través de las constantes de acoplamiento  $J_{HH}$ . Complejos experimentos de resonancia bidimensional denominados COSY, HMBC, NOESY y TOCSY nos aportan el resto de la información (Crews y col., 1998).

Además de las técnicas anteriormente reseñadas, los métodos analíticos proporcionan herramientas relevantes en el análisis cualitativo y cuantitativo de las sustancias, permitiendo establecer su identidad así como la cantidad precisa de cada uno de los componentes presentes en una determinada mezcla (Valcárcel y Gómez, 1988). Entre las técnicas instrumentales destacan la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y la cromatografía de gases (GC). Tales herramientas, una vez conectadas a modernos detectores de espectrometría de masas, resuelven una infinidad de problemas analíticos (HPLC-MS; GC-MS).

La realización de este trabajo fue posible gracias al esfuerzo cooperativo entre los diversos laboratorios de investigación integrados en este proyecto. En este sentido, el laboratorio de Química Orgánica II, del grupo “Tecnología Química y Desarrollo Sostenible” de la ULPGC mantiene una colaboración permanente con el Instituto de Productos Naturales y Agrobiología (IPNA) del CSIC, Tenerife, y el grupo CAFMA de la ULPGC. Se realizaron, además, colaboraciones puntuales con el Laboratorio de Productos Naturales Marinos del Departamento de Química de la Universidad de Aberdeen y el Laboratorio de Química Bioorgánica de la Facultad de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Leeds, Reino Unido.

## 0-5. Referencias Bibliográficas

- Abad, M.J. and Bermejo, P. 2001 Bioactive natural products from marine sources. **Studies Nat. Prod. Chem.**, v. 25, n. 6, pp. 683-755.
- Aceret, T.L., Sammarco, P.W., Coll, J.C. and Uchio, Y. 2001 Discrimination between several diterpenoid compounds in feeding by *Gambusia affinis*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 128, n. 1, pp. 55-63.
- Adachi, K., Kanoh, K., Wisespong, P., Nishijima, M. and Shizuri, Y. 2005 Clonostachysins A and B, new anti-dinoflagellate cyclic peptides from a marine-derived fungus. **J. Antibiot.**, v. 58, pp. 145–150.
- Adebayo, O.T. and Fatoyinbo, O.A. 2008 Effect of storage period on the efficacy of african bull frog pituitary extract for induced spawning of *Clarias gariepinus*. **Int. J. Zool. Res.**, v. 4, n. 1, pp. 77-80.
- Alderman, D.J. and Michel, C. 1992 Chemotherapy in aquaculture today. *In: Chemotherapy in aquaculture: from theory to reality*. Office Intern. des Epizooties (Ed.), Paris, pp. 3-24.
- Amaral, H.Jr., 1995 Utilization of hen *Gallus domesticus* pituitary gland extract to induce spawning in the tench *Tinca tinca*. Development of a pituitary gland bank for the small rural producer. *In: Proceedings of the 6<sup>TH</sup> Rio Grande meeting of aquaculture experts and 3<sup>TH</sup> South Brazil meeting on aquaculture*, Zimmermann, S. (ed.), pp. 154-161.
- Amey, M.J. 1981 The application of liquid *Derris* (5 % rotenone) to a spring-fed upland pond to eradicate perch (*Perca fluviatilis* L.). **Fish. Manag.**, v. 12, n. 3, pp. 111-112.
- Arcarese, G. and Ravagnan, G. 1972 First positive results in the artificial propagation of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) on a large scale. **Riv. Ital. Piscic. Ittiopatol.**, v. 7, n. 2, pp. 27-33.
- Bachère, E. 2003 Anti-infectious immune effectors in marine invertebrates: potential tools for disease control in larviculture. **Aquaculture**, v. 227, n. 1-4, pp. 427-438.
- Barr, D.J.S. 1992 Evolution and kingdoms of organisms from the perspective of a mycologist. **Mycologia**, v. 84, n. 1, pp. 1–11.

- Barrow, C.J. and Shahidi, F. 2007 **Marine nutraceuticals and functional foods** (Nutraceutical Science and Technology). CRC Press (Ed.), Boca Raton, Fl., 494 p.
- Beal, D.L. and Anderson, R.V. 1993 Response of zooplankton to rotenone in a small pond. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 51, n. 4, pp. 551-556.
- Bernabé, G. 1991 **Acuicultura**. Omega (Ed.), Barcelona, v. I y II, 1099 p.
- Bernabé, G. 1996 **Bases biológicas y ecológicas de la acuicultura**. Acribia (Ed.), Zaragoza, 3ª ed., 519 p. (Traducción Eduardo Cuchillos Martínez).
- Bhat, S.V., Alihussein, N., Dohadwalla, A.N., Bajwa, B.S., Dadkar, N.K., Dornauer, H. and de Souza, N.J. 1983 The antyhipertensive and positive inotropic diterpene forskolin: effects of structural modifications on its activity. **J. Med. Chem.**, v. 26, n. 4, pp. 486-492.
- Bhattacharyya, S., Sen, U., Bhattacharyya, S.P. and Mukherjee, D. 2000 Identification of maturation-inducing steroid in a freshwater perch *Anabas testudineus* and differential responses of intact follicles and denuded oocytes to cyclic AMP in oocyte maturation. **J. Exp. Zool.**, v. 287, n. 4, pp. 294-303.
- Bidwell, C.A., Chrisman, C.L. and Libey, G.S. 1985 Polyploidy induced by heat shock in channel catfish. **Aquaculture**, v. 51, n. 1, pp. 25-32.
- Billard, R. and Marcel, J. 1980 Stimulation of spermiation and induction of ovulation in pike (*Esox lucius*). **Aquaculture**, v. 21, n. 2, 181-195.
- Boonyaratpalin, M. 2000 The use of chemicals in aquafed. *In: Use of chemicals in aquaculture in Asia. Proceedings of the meeting on the use of chemicals in aquaculture in Asia.* Arthur, J.R., Lavilla-Pitogo, C.R. and Subasinghe, R.P. (eds.), Tigbauan, Iloilo, Philippines: Southeast Asian Fisheries Development Centre, Aquac. Dep., pp. 35-54.
- Bordas, M.A., Balebona, M.C., Rodriguez-Maroto, J.M., Borrego, J.J. and Morinigo, M.A. 1998 Chemotaxis of pathogenic *Vibrio* strains towards mucus surfaces of gilt-head sea bream (*Sparus aurata* L.). **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, n. 4, pp. 1573-1575.

- Bouchard, L., Patel, J. and Lahey, L. 2001 The effect of clove oil on fungal infections of salmonid eggs. **Bull. Aquac. Assoc. Can.**, v. 4, pp. 110-112.
- Braekman, J.C. y Daloz, D. 1983 Los medicamentos del mar. **Mundo Científico**, v. 3, n. 26, pp. 600-609.
- Brasola, V., Kalfa, A.M. and Cannas, A. 1979 A positive result of artificial reproduction in *Mugil cephalus* (L.) obtained at the Lagoon of Orbetello. **Riv. Ital. Piscic. Ittiopatol.**, v. 14, n. 1, pp. 15-20.
- Bricknell, I. and Dalmo, R.A. 2005 The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. **Fish Shellfish Immunol.**, v. 19, pp. 457-472.
- Brown, J.H. 1989 Antibiotics: Their use and abuse in Aquaculture. **World Aquacult.**, v. 20, n. 2, pp. 34-43.
- Brzuska, E. 1999 Artificial spawning of herbivorous fish: use of an LHRH-a to induce ovulation in grass carp *Ctenopharyngodon idella* (Valenciennes) and silver carp *Hypophthalmichthys molitrix* (Valenciennes). **Aquacult. Res.**, v. 30, n. 11-12, pp. 849-856.
- Butler, A.J., Van Altena, I.A. and Dunne, S.J. 1996 Antifouling activity of lyso-platelet-activating factor extracted from australian sponge *Crella incrustans*. **J. Chem. Ecol.**, v. 22, n. 11, pp. 2041-2062.
- CBD, 1992 **Convention on Biological Diversity** is the first global agreement on the conservation and sustainable use of biological diversity. Rio de Janeiro, Brazil.
- CBD, 2004 Seventh Ordinary **Meeting of the Conference of the Parties to the Convention on Biological Diversity**. Kuala Lumpur, Malaysia.
- Chan, S.M. 1995 Possible roles of 20-hydroxyecdysone in the control of ovary maturation in the white shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 112, n. 1, pp. 51-59.



- Chang, M.H., Kim, H.J., Jahng, K.Y. and Hong, S.C. 2008 The isolation and characterization of *Pseudozyma* sp. JCC 207, a novel producer of squalene. **Appl. Microb. Biotechnol.**, v. 78, n. 6, pp. 963-972.
- Chaube, S.K. and Haider, S. 1997 Effects of cAMP forskolin and cyanoketone on in vitro oocyte maturation in the catfish, *Clarias batrachus*. **J. Biosci.**, v. 22, n. 2, pp. 255-265.
- Cheng, J.H. and Chang, E.S. 1991 Ecdysteroid treatment delays ecdysis in the lobster, *Homarus americanus*. **The Biol. Bull.**, v. 181, n. 1, pp. 169-174.
- Chong, Y.K., Galbraith, M.N. and Horn, D.H.S. 1970 Isolation of Deoxycrustecdysone, Deoxyecdysone and  $\alpha$ -Ecdysone from the fern, *Blechnum minus*. **J. Chem. Soc. D: Chem. Comm.**, pp. 1217-1218.
- Colegate, S.M. and Molyneux, R.J. 1993 Bioactive Natural Products: Detection, Isolation and Structural Determination. CRC Press (Ed.), Boca Raton, 528 p.
- Crews, P., Rodriguez, J. and Jaspars, M. 1998 **Organic Structure Analysis**. Oxford University Press (Ed.), New York, 576 p.
- Della Porta, G., Taddeo, R., D'Urso, E. and Reverchon, E. 1998 Isolation of clove bud and star anise essential oil by supercritical CO<sup>2</sup> extraction. **Lebensm. Wiss. U. Technol.**, v. 31, pp. 454-460.
- Di Marzo, V., Cimino, G., Crispido, A., Minardi, C., Sodano, G. and Spinella, A. 1991 A novel multifunctional metabolite pathway in a marine mollusc leads to unprecedented prostaglandin derivatives (prostaglandin 1,15-lactones). **Biochem. J.**, v. 273, pp. 593-600.
- Di Marzo, V., Minardi, C., Vardaro, R.R., Mollo, E. and Cimino, G. 1992 Prostaglandin F-1,15-lactone fatty acyl esters: A prostaglandin lactone pathway branch developed during the reproduction and early larval stages of a marine mollusc. **Comp. Biochem. Physiol. B**, v. 101, n. 1-2, pp. 99-104.

- Fan, K.W. and Chen, F. 2006 Production of high-value products by marine microalgae Thraustochytrids. *In: Bioprocessing for value-added products from renewable resources.* Yang, S.T. (ed.), New York, Chapter 11, pp. 293-323.
- Faux, A., Horn, D.H.S., Middleton, E.J., Fales, H.M. and Lowe, M.E. 1969 Molting hormones of a crac during ecdysis. **J. Chem. Soc. D: Chem. Comm.**, pp. 175-176.
- Fdhila, F., Vázquez, V., Sánchez, J.L. and Riguera, R. 2003 DD-Diketopiperazines: Antibiotics active against *Vibrio anguillarum* isolated from marine bacteria associated with cultures of *Pecten maximus*. **J. Nat. Prod.**, v. 66, pp. 1299-1301.
- Ferriol, B.P., Mediavilla, P.M.J., Estévez, R.F.J., Toledo, M.F.J. and Bermejo, B.J. 2008 DISCan-2007 tractor project. An example: cytotoxic factors of *Verongia aerophoba*. *In: Poster presented at the 5<sup>th</sup> meeting young cancer investigators of the Canary Islands - 5<sup>th</sup> YCIC-3<sup>rd</sup> YBIM.* La Laguna, Tenerife, 13-15 november (2008).
- Fisher, W.S., Nilson, E.H., Steenbergen, J.F. and Lightner, D.V. 1978 Microbial diseases of cultured lobsters: a review. **Aquaculture**, v. 14, n. 2, pp. 115-140.
- Galbraith, M.N. and Horn, D.H.S. 1969 Insect molting hormones: crustecdysone (20-hydroxyecdysone) from *Podocarpus elata*. **Austral. J. Chem.**, v. 22, n. 5, pp. 1045-1057.
- Galbraith, M.N., Horn, D.H.S., Middleton, E.J. and Hackney, R.J. 1968 Structure of deoxycrustecdysone, second crustacean moulting hormone. **J. Chem. Soc. D: Chem. Comm.**, pp. 83-85.
- Galm, U. and Shen, B. 2007 Natural product drug discovery: The times have never been better. **Chem. Biol.**, v. 14, n. 10, pp. 1098-1104.
- Gao, K. 1998 Chinese studies on the edible blue-green alga *Nostoc flagelliforme*: a review. **J. App. Phycol.**, v. 10, n. 1, pp. 37-49.
- Garcia Camacho, F., Rodríguez, J.G, Mirón, A.S., García, M.C.C., Belarbi, E.H., Chisti, Y. and Molina Grima, E. 2007 Biotechnological significance of toxic marine dinoflagellates. **Biotech. Advances**, v. 25, n. 2, pp. 176-194.

- Gil-Turnes, M.S., Hay, M.E. and Fenical, W. 1989 Symbiotic marine bacteria chemically defend crustacean embryos from a pathogenic fungus. **Science**, v. 246, n. 4926, pp. 116-118.
- Godinho, H.P. and Godinho, A.L. 1986 Induced spawning of the pacu *Colossoma mitrei*, by hypophysation with crude carp pituitary extract. **Aquaculture**, v. 55, n. 1, pp. 69-73.
- Guo, X. 2000 Aquaculture in China: two decades of rapid growth. **Aquacult. Magazine**, v. 26, n. 3, pp. 27-36.
- Guttvik, A., Paulsen, B., Dalmo, R.A., Espelid, S., Lund, V. and Børgwald, J. 2002 Oral administration of lipopolysaccharide to Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fry. Uptake, distribution, influence on growth and immune stimulation. **Aquaculture**, v. 214, n. 1, pp. 35-53.
- Haefner, B. 2003 Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. **Drug Discov. Today**, v. 8, n. 12, pp. 536-544.
- Harborne, J.B. 1988 **Introduction to ecological biochemistry**. 3<sup>th</sup> ed., Academic Press (Ed.), London, 356 p.
- Harvey, B.J. and Hoar, W.S. 1980 **Teoría y practica de la reproducción inducida en los peces**. CIID (Ed.), Ottawa, 48 p.
- Hay, M. and Fenical, W. 1996 Chemical ecology and marine biodiversity: Insights and products from the sea. **Oceanography**, v. 9, pp. 10-20.
- Herbert, R.B. 1989 **The biosynthesis of secondary metabolites**. 2<sup>th</sup> ed., Chapman and Hall (eds.), London, 231 p.
- Hogendoorn, H. and Vismans, M.M. 1980 Controlled propagation of the african catfish *Clarias lazera* (C. and V.). Artificial reproduction. **Aquaculture**, v. 21, n. 1, pp. 39-53.
- Horn, D.H.S., Fabbri, S., Hampshire, F. and Lowe, M.E. 1968 Isolation of Crustecdysone (20R-Hydroxyecdysone) from a crayfish (*Jasus lalandei* H. Milne-Edwards). **Biochem. J.**, v. 109, n. 3, pp. 399-406.

- Inglis, V. 2000 Antibacterial chemotherapy in aquaculture: Review of practice, associated risks and need for action. *In: Use of chemicals in aquaculture in Asia. Proceedings of the meeting on the use of chemicals in aquaculture in Asia.* Arthur, J.R., Lavilla-Pitogo, C.R. and Subasinghe, R.P. (eds.), Tigbauan, Iloilo, Philippines: Southeast Asian Fisheries Development Centre, Aquac. Dep., pp. 7-22.
- Iwamatsu, T., Takahashi, S.Y., Sakay, N., Nagahama, Y. and Onitake, K. 1987 Induction and inhibition of *in vitro* oocyte maturation and production of steroids in fish follicles by Forskolin. **J. Exp. Zool.**, v. 241, n. 1, pp. 101-111.
- Jalabert, B. 1978 Production of fertilizable oocytes from follicles of rainbow trout (*Salmo gairdnerii*) following *in vitro* maturation and ovulation. **Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.**, v. 18, n. 2, pp. 461-470.
- Jeney, G. and Anderson, D.P. 1993 Glucan injection or bath exposure given alone or in combination with a bacterin enhance the non-specific defence mechanisms in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 116, n. 4, pp. 315-329.
- Jenkins, K.M., Jensen, P.R. and Fenical, W. 1999 Thraustochytriosides A-C, new glycosphingolipids from a unique marine protist, *Thraustochytrium globosum*. **Tetrahedron Lett.**, v. 40, n. 43, pp. 7637-7640.
- Jensen, P.R., Jenkins, K.M., Porter, D. and Fenical, W. 1998 Evidence that a new antibiotic flavone glycoside chemically defends the sea grass *Thalassia testudinum* against zoosporic fungi. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, n. 4, pp. 1490-1496.
- Jiang, Y., Fan, K.W., Wong, R.T.Y. and Chen, F. 2004 Fatty acid composition and squalene content of the marine microalga *Schizochytrium mangrovei*. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, pp. 1196-1200.
- Khan, H.A., Gupta, S.D. and Tantiya, M.S. 1992 A new method to induce spermiation, ovulation and spawning by hypophysation in the indian major carp *Labeo rohita*. **J. Aquacult. Trop.**, v. 7, n. 2, pp. 143-150.

- Kobayashi, M., Uehara, H., Matsunami, K., Auki, S. and Kitagawa, I. 1993 Trichoharzin, a new polyketide produced by the imperfect fungus *Trichoderma harzianum* separated from the marine sponge *Micale cecilia*. **Tetrahedron Lett.**, v. 34, pp. 7925-7928.
- Kouril, J. and Hamackova, J. 1982 Artificial spawning, egg incubation and forced fry rearing of the sheat-fish *Silurus glanis* L. **Prace VURH Vodnany**, v. 2, pp. 119-126.
- Kristensen, J.B., Meyer, R.L., Laursen, B.S., Shipovskov, S., Besenbacher, F. and Poulsen, C.H. 2008 Antifouling enzymes and the biochemistry of marine settlement. **Biotech. Adv.**, v. 26, n. 5, pp. 471-481.
- Kupchan, S.M, Briton, R.W., Ziegler, M.F. and Siegel, C.W. 1973 Bruceatin, a new potent antileukemic simaroubolide from *B. antidysenterica*. **J. Org. Chem.**, v. 38, pp. 178-179.
- Lee, C.H., Paek, N.S., Kim, D.S. and Kim, K.H. 2002 Effects of a *Paecilomyces japonica*-supplemented diet on the chemiluminescent response of phagocytes and growth in juvenile olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). **Aquaculture**, v. 208, n. 1-2, pp. 51-57.
- Lee, K.G. and Shibamoto, T. 2001 Antioxidant property of aroma extract isolated from clove buds *Syzygium aromaticum* (L.). **Food Chem.**, v. 74, n. 4, pp. 443-448.
- Leonard, J., Lygo, B. and Procter, G. 1998 **Advanced practical organic chemistry**, 2<sup>th</sup> ed., Stanley Thornes (ed.), Cheltenham, 298 p.
- Lewis, T.E., Nichols, P.D. and McMeekin, T.A. 1999 The biotechnological potential of thraustochytrids. **Mar. Biotechnol.**, v. 1, n. 6, pp. 580-587.
- Li, Q., Chen, G.Q., Fan, K.W., Lu, F.P., Aki, T. and Jiang, Y. 2009 Screening and characterization of Squalene-producing from Hong Kong mangroves. **Agric. Food Chem.**, v. 57, n. 10, pp. 4267-4272.
- Liebezeit, G. 2005 Aquaculture of "non-food organisms" for natural substance production. **Adv. Biochem. Eng. Biotech.**, v. 97, pp. 1-28.
- Lorenz, P., Jensen, P.R. and Fenical, W. 2008 Mactanamide, a new fungistatic Diketopiperazine produced by a marine *Aspergillus* sp. **Nat. Prod. Lett.**, v. 12, pp. 55-60.

- Madu, C.T., Ita, E.O., Amaatimin, C.Y., Nwaiku, R.C. and Igwe, P.N. 1990 Induced breeding of the common carp *Cyprinus carpio*. **Annu. Rep. Natl. Inst. Freshwat. Fish. Res. (Nigeria)**, v. 1988-1989, pp. 53-60.
- McClintock, J.B. and Baker, B.J. 2001 **Marine chemical ecology**. CRC Press (Ed.), Boca Raton, 624 p.
- Mann, J., Banthorpe, D.V., Davidson, R.S., Harborne, J.B. and Hobbs, J.B. 1994 **Natural Products: Their chemistry and biological significance**. Wesley, A. (ed.), Logman, Harlow, 464 p.
- Martin, J.F., Bennett, L.W. and Graham, W.H. 1988 Off-flavor in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) due to 2-methylisoborneol and its dehydration products. **Water Sci. Technol.**, v. 20, pp. 99–105.
- Mollah, M.F.A. and Tan, E.S.P. 1983 HCG-induced spawning of the catfish, *Clarias macrocephalus* (Gunther). **Aquaculture**. v. 35, n. 3, pp. 239-247.
- Nakagawa, H., Kasahara, S. and Sugiyama, T. 1987 Effect of *Ulva* meal supplementation on lipid metabolism of black sea bream, *A. schlegeli* (Bleeker). **Aquaculture**, v. 62, p. 109-121.
- Nakanishi, K., Koreeda, M., Sasak, S., Chang, M.L. and Hsu, H.Y. 1966 Insect hormones. The structure of Ponasterone A, insect-moulting hormona from the leaves of *Podocarpus nakaii* Hay. **Chem. Comm.**, pp. 915-917.
- Nichols, D., Bowman, J., Sanderson, K., Nichols, C.M., Lewis, T., McMeekin, T. and Nichols, P.D. 1999 Developments with Antarctic microorganisms: culture collections, bioactivity screening, taxonomy, PUFA production and cold-adapted enzymes. **Curr. Opin. Biotech.**, v. 10, p. 240-246.
- Park, Y.C., Gunasekera, S.P., Lopez, J.V., McCarthy, P.J. and Wright, A.E. 2006 Metabolites from the marine-derived fungus *Chromocleista* sp. isolated from a deep-water sediment sample collected in the Gulf of Mexico. **J. Nat. Prod.**, v. 69, n. 4, pp. 580-584.

- Pietra, F. 1990 **A secret world: natural products of marine life**. 1<sup>th</sup> ed., Birkhäuser Verlag (Ed.), Basel, 279 p.
- Pillay, T.V.R. 1997. **Acuicultura: Principios y prácticas**. 1<sup>a</sup> ed., Limusa (Ed.), Balderas, 699 p.
- Pires, R. 1978 Plantas ictiotóxicas: aspecto da Botânica sistemática. *In: Anais do 5º Simpósio de plantas medicinais do Brasil*. Campinas. Sao Paulo: SBPC, pp. 37-41.
- Rahman, M.H., Ototake, M., Iida, Y., Yokomizo, Y. and Nakanishi, T. 2000 Efficacy of oil-adjuvanted vaccine for coldwater disease in ayu, *Plecoglossus altivelis*. **Fish Pathol.**, v. 35, n. 4, pp. 199-203.
- Rasmussen, R.S. and Morrissey, M.T. 2007 Marine biotechnology for production of food ingredients. **Adv. Food Nutr. Res.**, v. 52, pp. 237-292.
- Redhead, K. and Wright, S.J. 1978 Isolation and properties of fungi that lyse blue-green algae. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 35, n. 5, pp. 962-969.
- Sahoo, S.K., Giri, S.S. and Chandra, S. 2008 Effects of latency periods and injection doses with carp pituitary extract on spawning performance and egg quality of asian catfish, *Clarias batrachus* (Linn.). **J. Appl. Aquacult.**, v. 20, n. 4, pp. 295-303.
- Schoonbee, H.J. and Prinsloo, J.F. 1986 Use of pituitary glands of the sharptooth catfish *Clarias gariepinus* in the induced spawning of the european common carp *Cyprinus carpio* and the chinese grass carp *Ctenopharyngodon idella*. **Water S.A.**, v. 12, n. 4, pp. 235-237.
- Selvin, J., Huxley, A.J. and Lipton, A.P. 2004 Immunomodulatory potential of marine secondary metabolites against bacterial diseases of shrimp. **Aquaculture**, v. 230, n. 1-4, pp. 241-248.
- Selvin, J. and Lipton, A.P. 2004 *Dendrilla nigra*, a marine sponge, as potential source of antibacterial substances for managing shrimp diseases. **Aquaculture**, v. 236, n. 1-4, pp. 277-283.
- Schrader, K.K. 2005 Evaluation of several commercial algicides for control of odor-producing cyanobacteria. **J. Aquat. Plant Managen.**, v. 43, pp. 100-102.

- Shah, K.L. and Tyagi, B.C. 1986 An eye disease in silver carp *Hypophthalmichthys molitrix* held in tropical ponds, associated with the bacterium *Staphylococcus aureus*. **Aquaculture**, v. 55, n. 1, pp. 1-4.
- Shimonoseki, J.P. and Toshiaki, I. 1997 Preventive agent against infectious disease of crustacea. **US Patent** n° 5641761.
- Singh, W. 1989 Fecundity of silver carp *Hypophthalmichthys molitrix* (Val.). **Indian J. Anim. Sci.**, v. 59, n. 3, pp. 392-394.
- Smith, J.L., Boyer, G.L. and Zimba, P.V. 2008 A review of cyanobacterial odorous and bioactive metabolites: impacts and management alternatives in aquaculture. **Aquaculture**, v. 280, n. 1-4, pp. 5-20.
- Spiridon, J. and Popa, V.I. 2008 Hemicelluloses: major sources, properties and applications. *In: Monomers, polymers and composites from renewable resources*. Belgacem, M.N. and Gandini, A. (eds.), pp. 289-304.
- Stone, M.J and Williams, D.H. 1992 On the evolution of functional secondary metabolites (natural products). **Mol. Microbiol.**, v. 6, n. 1, pp. 29-34.
- Subasinghe, R.P., Barg, U. and Tacon, A. 2000 Chemicals in asian aquaculture: need, usage, issues and challenges. *In: Use of chemicals in aquaculture in Asia. Proceedings of the meeting on the use of chemicals in aquaculture in Asia*. Arthur, J.R., Lavilla-Pitogo, C.R. and Subasinghe, R.P. (eds.), Tigbauan, Iloilo, Philippines: Southeast Asian Fisheries Development Centre, Aquac. Dep., pp. 1-5.
- Sujatha, P., Bapi Raju, K.V.V.S.N. and Ramana, T. 2005 Studies on a new marine streptomycete BT-408 producing polyketide antibiotic SBR-22 effective against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **Microb. Res.**, v. 160, n. 2, pp. 119-126.
- Sundararaj, B.I. 1981 Reproductive physiology of teleost fishes. A review of present knowledge and needs for future research. FAO, Rome (Italy). 88 p. **Project: FAO-FIO-ADCP/REP/81/16**. Aquaculture Development and Coordination Programme.



- Suzuki, Y., Kobayashi, M., Nakamura, O., Aida, K. and Hanyu, I. 1988 Induced ovulation of the goldfish by oral administration of salmon pituitary extract. **Aquaculture**, v. 74, n. 3-4, pp. 379-384.
- Taylor, P.W. and Roberts, S.D. 1999 Clove oil: an alternative anaesthetic for aquaculture. **N. Am. J. Aquacult.**, v. 61, n. 2, pp. 150-155.
- Tocher, D.R., Bendiksen, E.Å., Campbell, P.J. and Bell, J. G. 2008 The role of phospholipids in nutrition and metabolism of teleost fish. **Aquaculture**, v. 280, n. 1-4, pp. 21-34.
- Ufodike, E.B.C. and Amadi, A.O. 1991 Comparative assessment of the effects of homoplastic and heteroplastic hypophysation on ovogenesis, fecundity and fertility of the mirror carp. **J. Aquat. Sci.**, v. 6, pp. 35-38.
- Unson, M.D., Holland, N.D. and Faulkner, D.J. 1994 A brominated secondary metabolite synthesized by the cyanobacterial symbiont of a marine sponge and accumulation of the crystalline metabolite in the sponge tissue. **Marine biology**, v. 119, n. 1, pp. 1-11.
- Valcárcel, C.M. y Gómez, H.A. 1988 **Técnicas analíticas de separación**. Reverté (Ed.), Barcelona. 778 p.
- Vanstone, W.E., Tiro, L.B., Villaluz, A.C., Singh, D.C.R., Kumagni, S., Dulduco, P.J., Barnes, M.M.L. and Duenas, C.E. 1977 Breeding and larval rearing of the milkfish *Chanos chanos* (Pisces: Chanidae). **SEAFDEC Tech. Rep.**, n. 3, pp. 1-17.
- Varghese, T.J. and Rao, G.P.S. 1976 On the use of marine catfish pituitary glands for induced spawning of silver carp and catla. **Curr. Sci.**, v. 45, n. 8, pp. 302.
- Venkateswarlu, Y., Rama Rao, M. and Venkatesham, U. 1998 A new dibromotyrosine-derived metabolite from the sponge *P. purpurea*. **J. Nat. Prod.**, v. 61, n. 11, pp. 1388-1389.
- Verbist, J.F., Sallenave, C. and Pouchus, Y.F. 2000 Marine fungal substances. **Stud. Nat. Prod. Chem.**, v. 24, n. 5, pp. 979-1092.

- Watanabe, K., Miyakado, M., Ohno, N., Okada, A., Yanagi, K. and Moriguchi, K. 1989 A polyhalogenated insecticidal monoterpene from the red alga *Plocamium telfairiae*. **Phytochemistry**, v. 28, n. 1, pp. 77-78.
- Watanabe, K., Umeda, K., Kurita, Y., Takayama, C. and Miyakado, M. 1990 Two insecticidal monoterpenes, telfairine and aplysiaterpenoid A, from the red alga *Plocamium telfairiae*: structure elucidation, biological activity, and molecular topographical consideration by a semiempirical molecular orbital study. **Pest. Biochem. Physiol.**, v. 37, n. 3, pp. 275-286.
- Weston, D.P. 2000 Ecological effects of the use of Chemicals in aquaculture. *In: Use of chemicals in aquaculture in Asia. Proceedings of the meeting on the use of chemicals in aquaculture in Asia.* Arthur, J.R., Lavilla-Pitogo, C.R. and Subasinghe, R.P. (eds.), Tigbauan, Iloilo, Philippines: Southeast Asian Fish. Development Centre, pp. 23-30.
- Xu, R., Fazio, G. and Matsuda, S.P.T. 2004 On the origins of triterpenoid skeletal diversity. **Phytochemistry**, v. 65, n. 3, pp. 261-291.
- Yang, X.B., Gao, X.D., Xu, F.H., Song, Y.C. and Tan, R.X. 2005 Purification, characterization and enzymatic degradation of YCP, a polysaccharide from marine filamentous fungus *Phoma herbarum* YS4108. **Biochimie**, v. 87, n. 8, pp. 747-754.
- Yeo, I.K. 1998 Stimulatory effects of cyclic AMP on vitellogenin induction by estradiol 17- $\beta$  in the primary culture of hepatocytes in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **J. Fish. Sci. Tech.**, v. 1, n. 2, pp. 153-158.
- Yue, C.J. and Jiang, Y. 2009 Impact of methyl jasmonate on squalene biosynthesis in microalga *Schizochytrium mangrovei*. **Process Biochem.**, v. 44, n. 8, pp. 923-927.

# *CAPITULO I*

## - CAPITULO I -

### **Composición lipídica del hongo *Schizochytrium aggregatum* por cromatografía de gases – espectrometría de masas (GC-MS).**

#### **I-1. Antecedentes**

El hongo heterotrófico *Schizochytrium aggregatum* es un organismo zoospórico perteneciente al Phylum Labyrinthulomycota, un conocido grupo de protistas abundantes en el medio estuarino y marino (Porter y Kirk, 1986; Porter, 1990).

Recientemente se ha dado una particular atención a este grupo de protistas, desde que se ha demostrado que son una fuente muy productiva de importantes metabolitos primarios de interés industrial (Yongmanitchai y Ward, 1989). Estos organismos son capaces de biosintetizar ácidos grasos poliinsaturados, conocidos como HUFAs, a partir de fuentes no lipídicas convencionales (Barclay y col., 1994; Yokochi y col., 1998; Bowles y col., 1999). Su relevancia se ha incrementado por la demanda creciente de estos productos naturales de origen marino (Pomponi, 1999), potencialmente capaces de generar aplicaciones comerciales en nutraceutica, farmacéutica y acuicultura (Lewis y col., 1999; Nichols y col., 1999; Lewis y col., 2000). Los ensayos clínicos revelan la importancia de su valor terapéutico-nutricional, sobre todo en la prevención y tratamiento de enfermedades como la arterioesclerosis, trombosis, artritis y diversos tipos de cáncer (Simopoulos, 1991; Conner, 1997; Horrocks y Yeo, 1999; Tapiero y col., 2002).

Los HUFAs son generalmente clasificados en dos grupos principales: los de la serie omega-3 ( $\omega_3$  o n-3) y los de la serie omega-6 ( $\omega_6$  o n-6). Dentro de los HUFAs  $\omega_3$  se encuentran los de cadena muy larga como el ácido docosahexaenoico [DHA, 22:6 (n-3)] y el ácido eicosapentaenoico [EPA, 20:5 (n-3)], los cuales desempeñan un importante papel estructural en los organismos vivos, ya que son constituyentes de las membranas celulares (Sargent y col., 1995). Dentro de los  $\omega_6$  HUFAs, el ácido araquidónico [AA, 20:4 (n-6)] es de particular interés, ya que es el precursor de muchos eicosanoides: prostaglandinas y leucotrienos (Vas Dias, 1995).

Para los organismos marinos, tanto el EPA como el DHA son considerados ácidos grasos esenciales (EFAs), sobre todo durante las fases iniciales de los desarrollos larvarios (Watanabe y Kiron, 1994; Izquierdo, 1996). Se ha observado que la carencia nutricional de estos ácidos afecta directamente a la viabilidad larvaria, actuando negativamente sobre su crecimiento, metamorfosis y supervivencia (Rainuzzo y col., 1992; Sargent y col., 1999).

Tradicionalmente, las fuentes más económicas y de gran disponibilidad de HUFAs han sido los aceites de pescado de origen marino, ya que los peces suelen acumular estos ácidos grasos eficientemente y en cantidades considerables bajo la forma esterificada (Ackman, 1982; Van der Wielen y Cabatingan, 1999). Sin embargo, dada la gran diversidad de ácidos grasos presentes en la composición de estos ésteres, y para mejorar los perfiles de HUFAs, el aceite crudo pasa por un proceso de refinamiento que incrementa los contenidos de EPA y DHA (Stout y col., 1990). No obstante, tales productos suelen retener un color y olor desagradable, limitando su uso como aditivo alimenticio humano y en fines farmacéuticos (Zaldívar, 1992; Kiffe y col., 1995). Además, la baja relación DHA/ EPA proporcionada por estas fuentes lipídicas ha demostrado ser nutricionalmente insuficiente como enriquecedor de organismos marinos, ya que éstos tienen preferencia por altos contenidos de DHA (Sargent y col., 1995). Aunque por síntesis química se pueden producir ácidos grasos (Rosu y col., 1998; Robles Medina y col., 1999), la extracción a partir de fuentes naturales parece ser lo más económico hasta el presente (Nilsson, 1996). En este sentido, la producción y extracción de HUFAs a partir de organismos autotróficos, como las microalgas, podría suponer la vía alternativa capaz de suplir el mercado (Balaban y col., 1996; Cohen, 1996). Sin embargo, los elevados costes de producción (Benemann, 1992; Coutteau y Sorgeloos, 1992) y los constantes riesgos de contaminación, suponen incertidumbre permanente en los sistemas de cultivo (Molina Grima y col., 1994). Con ello, la producción de estos microfitos se ha restringido a unas pocas especies muy resistentes capaces de producir determinados metabolitos para fines específicos. No obstante, la producción de estos bioproductos por fermentación exhibe una perspectiva prometedora ya que permite la obtención de buenos

perfiles de HUFAs a bajo coste (Swaaf y col., 1999; Fan y col., 2001). Así, los Labyrinthulomycotas podrían suponer respuestas a corto plazo de carácter renovable, frente a las tradicionales fuentes extractivas de origen marino (Bajpai y col., 1991; Bowles y col., 1999).

En este momento, *Schizochytrium aggregatum* es la base de algunos productos destinados a la acuicultura. Utilizándose como enriquecedor de rotíferos (*Brachionus* sp.) y de Artemia (*Artemia* sp.) transfiriendo a las larvas de peces marinos perfiles de HUFAs compatibles con sus requerimientos nutricionales (Barclay y Zeller, 1996; Luizy y col., 1999; Harel y col., 2002). Además, también se presenta como sustituto parcial o total de las tradicionales microalgas utilizadas en larvicultura de moluscos (Boeing, 1997; Langdon y Önal, 1999) y crustáceos (Figueiredo y Narciso, 2006).

Aparte de la importancia reseñada con estos HUFAs, *S. aggregatum* puede ser igualmente productor de interesantes metabolitos secundarios. De tal forma que, aunque sus perfiles de ácidos grasos estén descritos (Barclay y Zeller, 1996; Ashford y col., 2000), los antecedentes bibliográficos indican la presencia de glicolípidos, fosfolípidos, esfingolípidos y esteroides (colesterol, brasicasterol y estigmasterol) (Kendrick y Ratledge, 1992).

Así pues, se ha seleccionado este interesante organismo para realizar un barrido de su fracción lipídica, buscando confirmar las sustancias anteriormente descritas en la literatura y aislar nuevas estructuras que proporcionen algún tipo de aprovechamiento industrial, o incluso demostrar algún tipo de bioactividad interesante.

## **I-2. Objetivos de este trabajo**

En este capítulo, y como consecuencia de haber adquirido una muestra del eucariota marino *S. aggregatum*, se han planteado los siguientes objetivos:

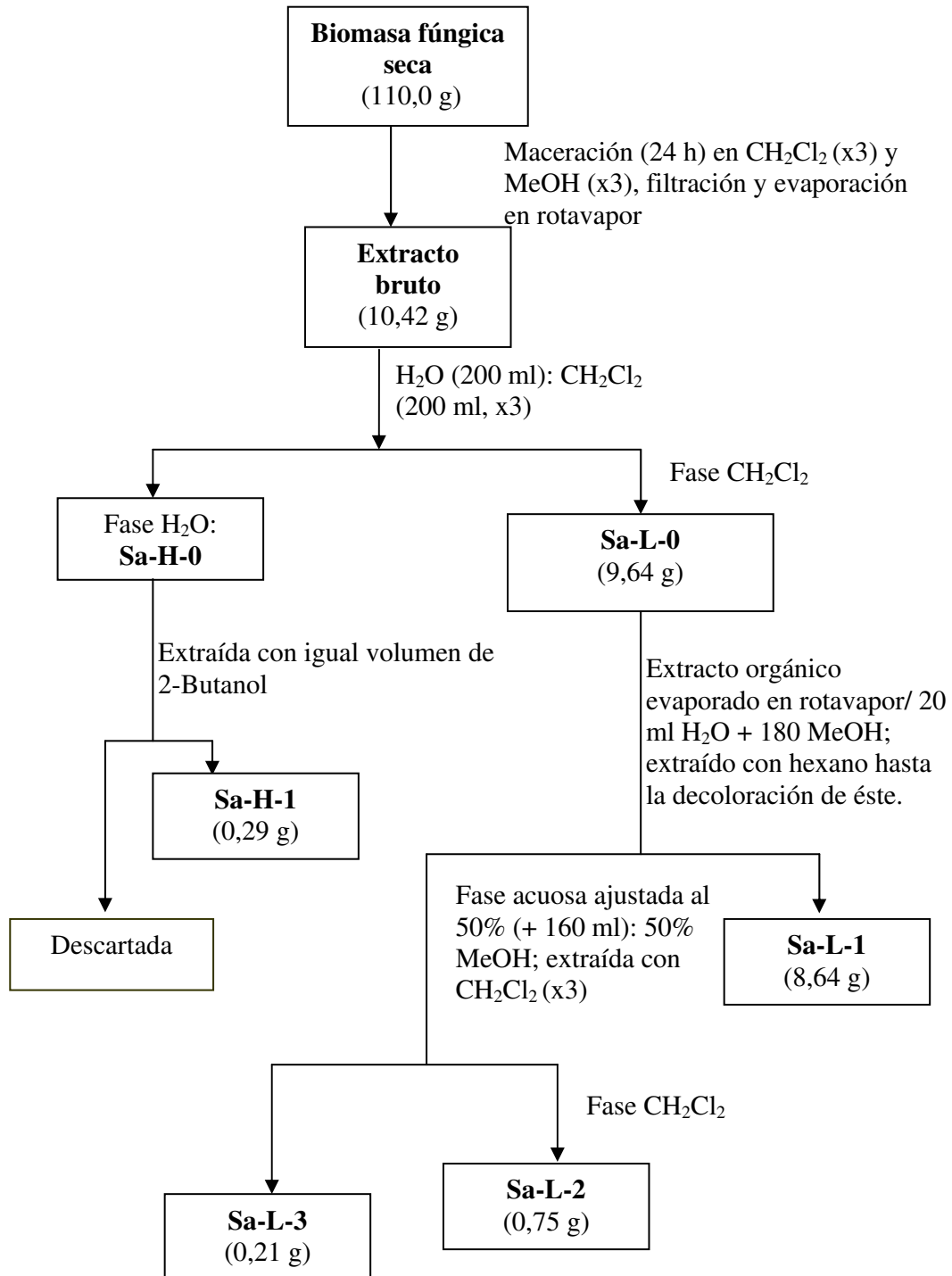
**I-2.1.** Realizar un estudio de los productos naturales que dicha cepa es capaz de biosintetizar en el mencionado producto comercial, realizando un minucioso barrido de sus fracciones liposolubles e hidrosolubles, tanto en lo que se refiere a sus componentes volátiles como a los que no lo son; todo ello en orden a encontrar componentes quimiotaxonómicos que nos permitan correlacionarla con alguna de las cepas descritas previamente en la bibliografía, esclareciendo si se trata de una cepa productora de micotoxinas o no.

**I-2.2.** Estudiar la futura aplicabilidad biotecnológica de nuestro organismo orientada hacia la alimentación animal (acuicultura) y humana. Esto se apoyaba en los antecedentes anteriormente comentados.

## **I-3. Resultados y Discusión**

### **I-3.1. Obtención de biomasa, extracción y fraccionamiento**

En lo que se refiere a la producción de la biomasa de *S. aggregatum*, comentar que el material biológico objeto de este estudio fue adquirido desecado bajo el nombre comercial “Algamac 2000” a partir de la empresa Aquafauna Bio-Marine. La biomasa fúngica se extrajo y fraccionó según la Figura I-1.



**Figura I-1.** Esquema de partición aplicado al extracto de la biomasa fúngica de *Schizochytrium aggregatum*.



### I-3.2. Estudio químico de la biomasa fúngica

Después de extraer la biomasa fúngica y fraccionarla según la Figura I-1 se rastrearon minuciosamente todas las fracciones, tanto por GC-MS para sus componentes volátiles como por refraccionamiento: CCF, cromatografía en columna, cromatografía de exclusión por tamaño molecular, y estudio espectroscópico (RMN), identificándose las siguientes sustancias:

#### I-3.2.1. Componentes volátiles en la biomasa fúngica

Se identificaron por GC-MS, lo que rindió los datos de la Tabla I-1. Si se reúnen dichas sustancias por criterios estructurales (Figuras I-2 hasta I-7) se puede deducir que se han identificado *n*-alcanos (**1**), 1-alquenos (**6**), 1-alcanoles (**2**), 2-alquil-1-alcanoles (**3**), ácidos grasos libres - saturados (**4**) e insaturados (**8, 9**), ésteres metílicos y etílicos de ácidos grasos - saturados (**5, 7**) e insaturados (**10, 11, 12**), triglicéridos saturados (**15, 16, 17**), diglicéridos (**18, 19**), monoglicéridos insaturados (**20**), ceras - ésteres de ácidos y alcoholes grasos (**21, 22, 23, 24**), esteroides (**25, 26**), triterpenos (**27**) catabolitos lipídicos (**28**), mono- y sesquiterpenos de cadena cíclica y lineal (**29-33**), ftalatos de dialquilo (**36, 37**) y otros (**13, 34, 35, 38**).

---

Ácido erúxico (**8**; **n= 7**, **m= 11**; Tr= 19,775)

Ácido hexadecanoico (**4**; **n= 14**; Tr= 16,316 ± 0,089)

Ácido (E)-9-octadecenoico (**9**; Tr= 16,399)

Ácido tetradecanoico (**4**; **n= 12**; Tr= 14,812 ± 0,066)

Ácido (Z)-7-tetradecenoico (**8**; **n= 5**, **m= 5**; Tr= 16,403 ± 0,072)

N-Butil-bencenosulfonamida (**38**; Tr= 16,721 ± 0,066)

Colesterol (**25**; Tr= 18,870)

1-Eicosanol (**2**; Tr= 16,330)

Éster bis(2-metilpropílico) del ácido 1,2-bencenodicarboxílico (**37**; Tr= 17,028 ± 0,060)

Éster bis(2-metilpropílico) del ácido hexanodioico (**35**; Tr= 15,601)

Éster dibutilico del ácido hexanodioico (**34**; Tr= 15,597)

Éster eicosílico del ácido (Z)-9-hexadecenoico (**24**; Tr= 18,764)

Éster etílico del ácido dodecanoico (**7**; **n= 10**; Tr= 14,885)

Éster etílico del ácido pentadecanoico (**7**; **n= 13**; Tr= 17,071 ± 0,026)

Éster etílico del ácido hexadecanoico (**7**; **n= 14**; Tr= 17,702 ± 0,044)

Éster etílico del ácido octadecanoico (**7**; **n= 16**; Tr= 18,954)

Éster etílico del ácido tetradecanoico (**7**; **n= 12**; Tr= 16,378 ± 0,046)

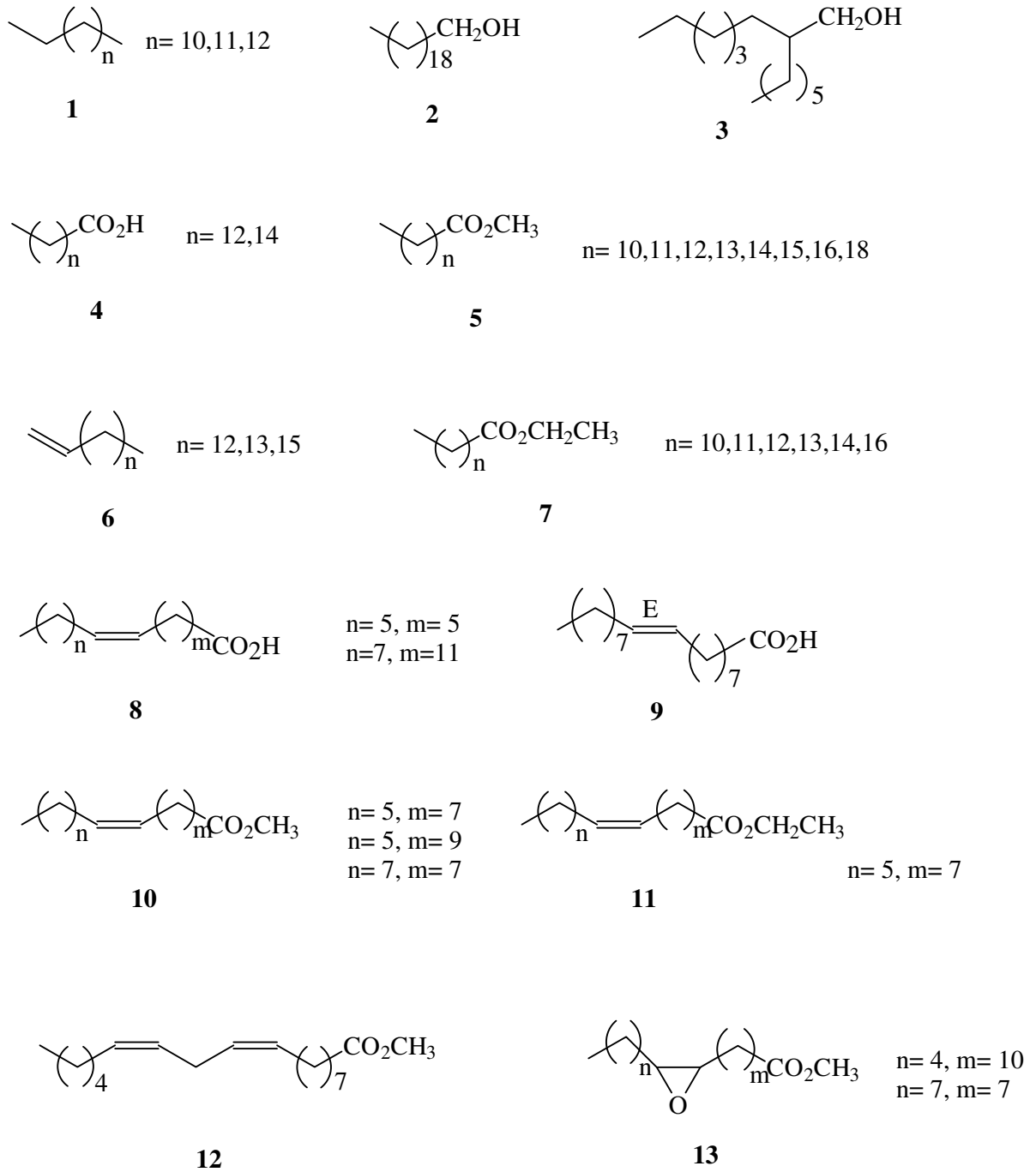
Éster etílico del ácido tridecanoico (**7**; **n= 11**; Tr= 15,632)

Éster 2-hidroxi-1-(hidroximetil) etílico del ácido (Z)-9-octadecenoico (**20**; Tr= 18,459 ± 0,046)

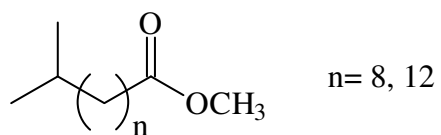
Éster 1-(hidroximetil)-1,2-etanodiílico del ácido hexadecanoico (**19**; Tr= 17,735 ± 0,179)

Éster metílico del ácido dodecanoico (**5**; **n= 10**; Tr= 14,396 ± 0,053)  
 Éster metílico del ácido heptadecanoico (**5**; **n= 15**; Tr= 17,904)  
 Éster metílico del ácido hexadecanoico (**5**; **n= 14**, Tr= 17,303 ± 0,044)  
 Éster metílico del ácido (Z)-9-hexadecenoico (**10**; **n= 5**, **m= 7**; Tr= 17,193 ± 0,053)  
 Éster metílico del ácido 14-metil-pentadecanoico (**14**; **n= 12**; Tr= 17,311 ± 0,044)  
 Éster metílico del ácido 10-metil-undecanoico (**14**; **n= 8**; Tr= 14,412)  
 Éster metílico del ácido nonadecanoico (**5**; **n= 18**; Tr= 20,024)  
 Éster metílico del ácido (Z,Z)-9,12-octadecadienoico (**12**; Tr= 18,413)  
 Éster metílico del ácido octadecanoico (**5**; **n= 16**; Tr= 18,533)  
 Éster metílico del ácido 9-octadecenoico (**10**; **n= 7**, **m= 7**; Tr= 18,416)  
 Éster metílico del ácido 11-octadecenoico (**10**; **n= 5**, **m= 9**; Tr= 18,423)  
 Éster metílico del ácido (Z)-11-octadecenoico (**10**; **n= 5**, **m= 9**; Tr= 18,514)  
 Éster metílico del ácido 3-octil-oxiranooctanoico (**13**; **n= 7**, **m= 7**; Tr= 18,286)  
 Éster metílico del ácido pentadecanoico (**5**; **n= 13**; Tr= 16,629 ± 0,036)  
 Éster metílico del ácido 3-pentil-oxiranoundecanoico (**13**; **n= 4**, **m= 10**; Tr= 19,732)  
 Éster metílico del ácido tridecanoico (**5**; **n= 11**; Tr= 15,128)  
 Éster 1,2,3-propanotriilico del ácido docosanoico (**17**; Tr= 19,206)  
 Éster 1,2,3-propanotriilico del ácido esteárico (**16**; Tr= 14,590)  
 Éster tetradecilico del ácido (Z)-9-hexadecenoico (**21**; Tr= 15,609)  
 Éster 2-(octadeciloxi) etílico del ácido hexadecanoico (**22**; Tr= 15,016)  
 Éster 3-(octadeciloxi) propílico del ácido esteárico (**23**; Tr= 13,862 ± 0,231)  
 Estigmasterol (**26**; Tr= 15,672)  
 Ftalato de dibutilo (**36**; Tr= 17,684 ± 0,012)  
 Germanicol (**27**; Tr= 17,427)  
 1-Hexadeceno (**6**; **n= 13**; Tr= 14,875 ± 0,024)  
 9-Hexadecenoato de etilo (**11**; **n= 5**, **m= 7**; Tr= 17,607 ± 0,037)  
 2-Hexil-1-octanol (**3**; **n= 3**, **m= 5**; Tr= 13,977)  
 2-Hidroxi-1,3-propanodiil éster del ácido octadecanoico (**18**; Tr= 17,735)  
 Lactona del ácido 4-hidroxi-3,4,6-trimetilhept-5-enoico (**32**; Tr= 12,803)  
 (1 $\alpha$ , 2 $\beta$ , 5 $\beta$ )-2-Metil-5-(1-metiletil)-ciclohexanol (**31**; Tr= 12,789)  
 4-Metil-1-(1-metiletil)-ciclohexanol (**30**; Tr= 12,837 ± 0,009)  
 1-Octadeceno (**6**; **n= 15**; Tr= 16,388)  
 Pentadecano (**1**; **n= 12**; Tr= 14,145 ± 0,012)  
 1-Pentadeceno (**6**; **n= 12**; Tr= 13,230 ± 0,006)  
 Tetradecano (**1**; **n= 11**; Tr= 13,287 ± 0,012)  
 Tetradecanoato de metilo (**5**; **n= 12**; Tr= 15,924 ± 0,055)  
 Tetrahidro-4-hidroxi-4-metil-2H-piran-2-ona (Mevalonato) (**29**; Tr= 12,484)  
 3,7,11-Trimetil-1-dodecanol (**33**; Tr= 19,038)  
 Tridecano (**1**; **n= 10**; Tr= 12,377 ± 0,009)  
 Trinonanoína (**15**; Tr= 14,260)  
 10-Undecenal (**28**; Tr= 13,125)

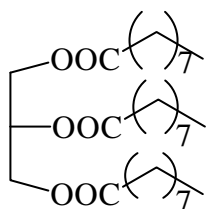
**Tabla I-1.** Componentes volátiles identificados en *Schizochytrium aggregatum* por GC-MS.



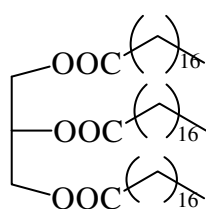
**Figura I-2.** Componentes lipídicos volátiles identificados en *Schizochytrium aggregatum*.



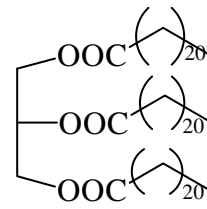
**14**



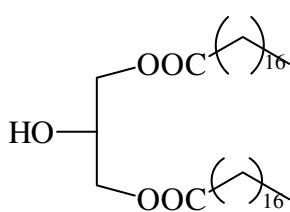
**15**



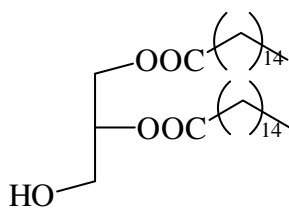
**16**



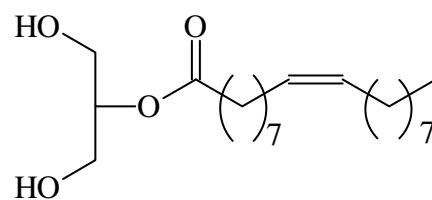
**17**



**18**

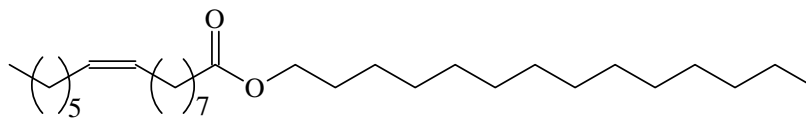


**19**

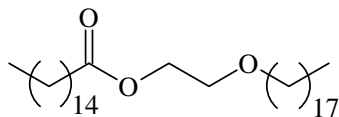


**20**

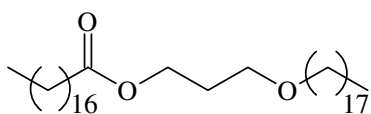
**Figura I-3.** Componentes lipídicos volátiles identificados en *Schizochytrium aggregatum*.



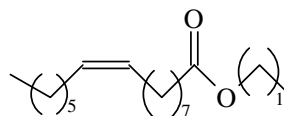
21



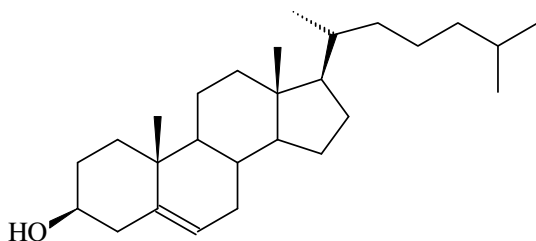
22



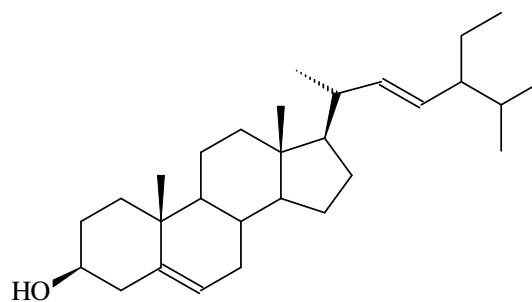
23



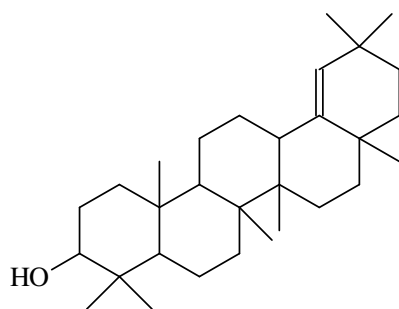
24



25

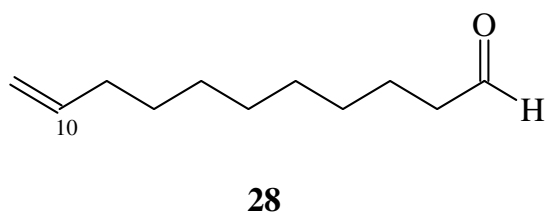


26

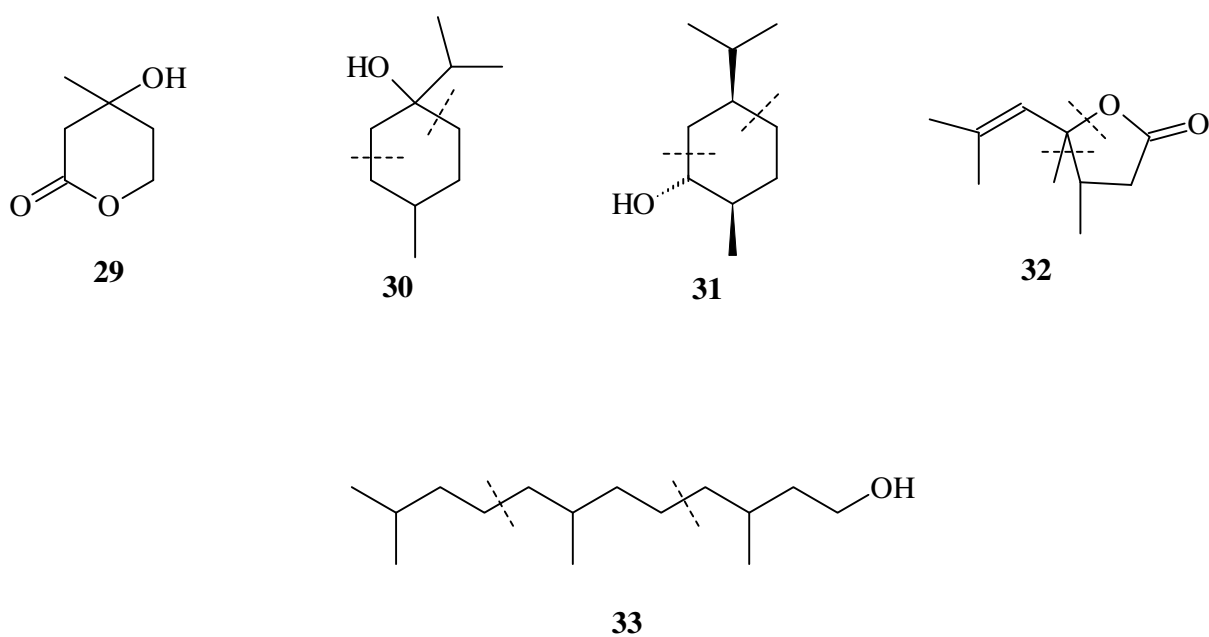


27

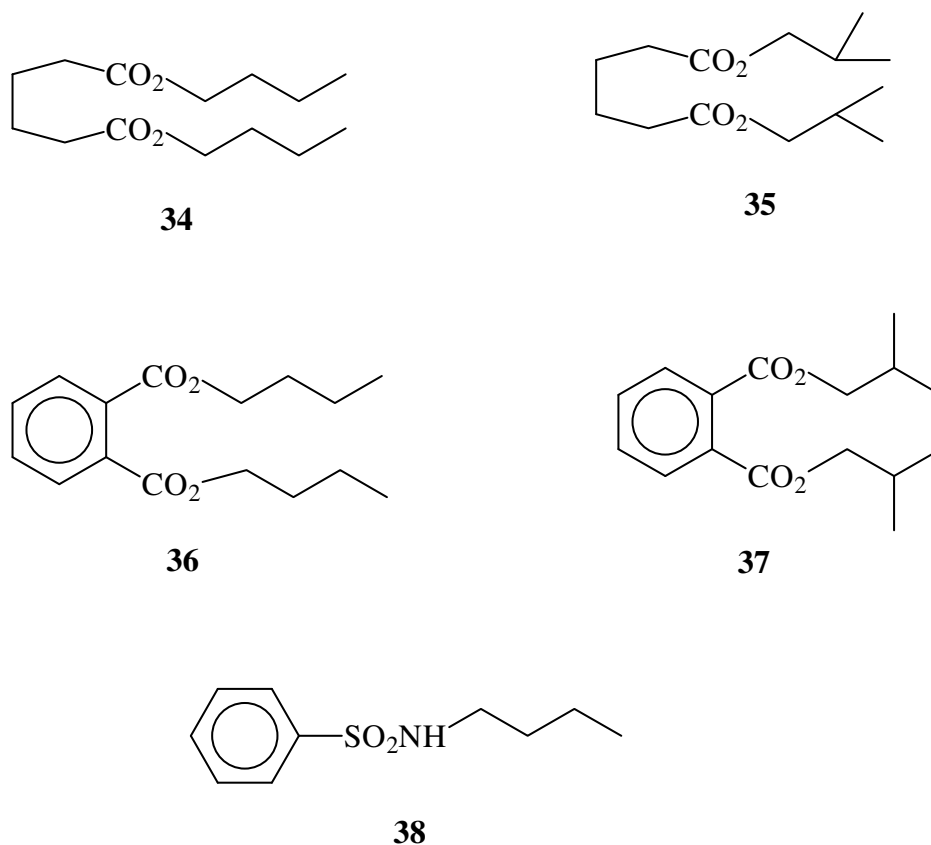
Figura I-4. Componentes lipídicos volátiles identificados en *Schizochytrium aggregatum*.



**Figura I-5.** Fragmento lipídico volátil identificado en *Schizochytrium aggregatum*.

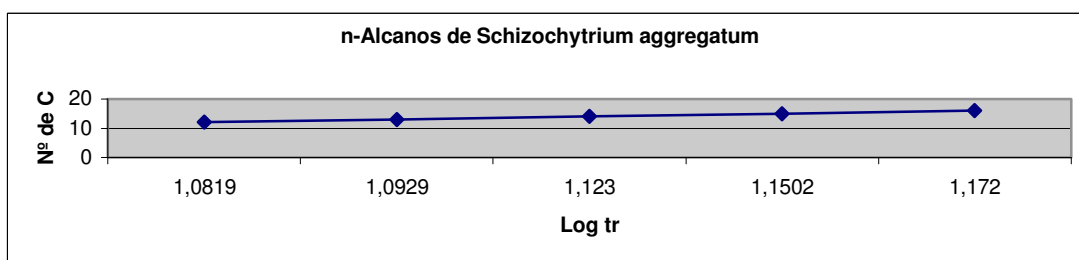


**Figura I-6.** Terpenoides volátiles identificados en *Schizochytrium aggregatum*.

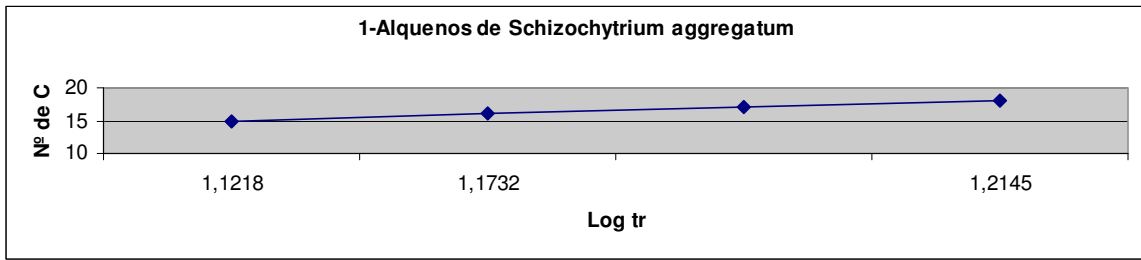


**Figura I-7.** Otros componentes volátiles identificados en *Schizochytrium aggregatum*.

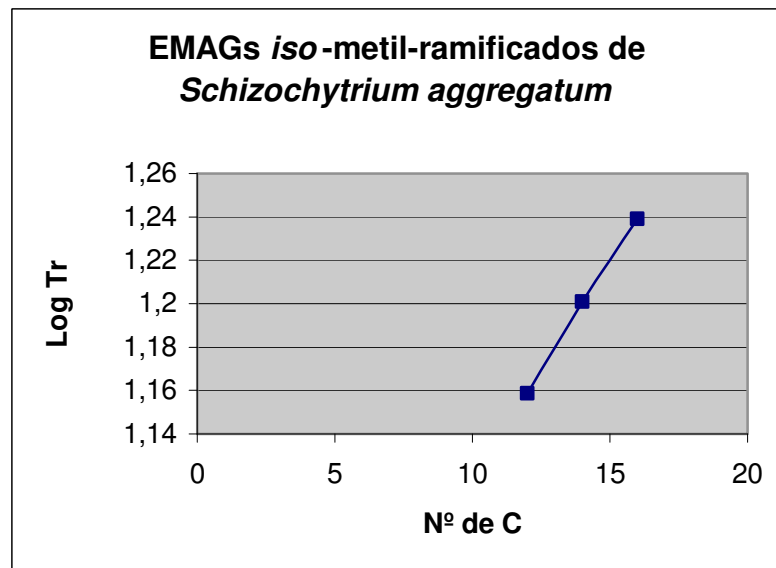
Obsérvese cómo las series homólogas de los componentes volátiles identificados se comportan de forma lineal en los gráficos que resultan de representar el tamaño de la cadena hidrocarbonada (Nº de C) frente al logaritmo del tiempo de retención (log Tr) (Figuras I-8 a I-13).



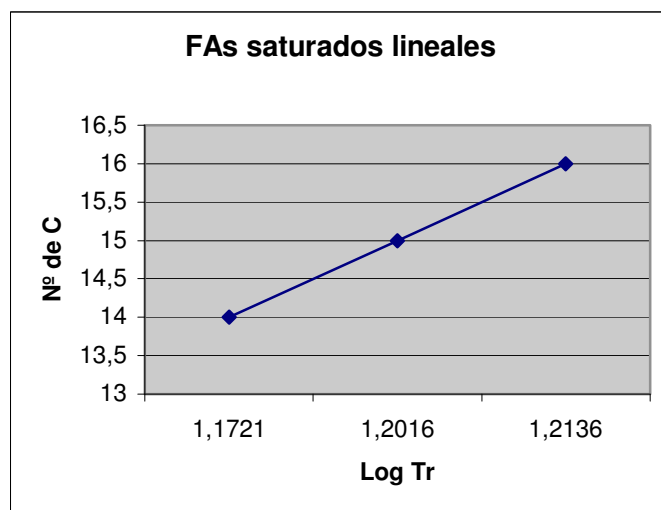
**Figura I-8.** Comportamiento en CG de los *n*-alcanos de *Schizochytrium aggregatum* (1; n= 10-12) y patrones comerciales (1; n= 9, y 13).



**Figura I-9.** Comportamiento en CG de los 1-alquenos de *Schizochytrium aggregatum* (6; n= 12-13, y 15) y el patrón comercial 1-octadeceno (6; n= 15).

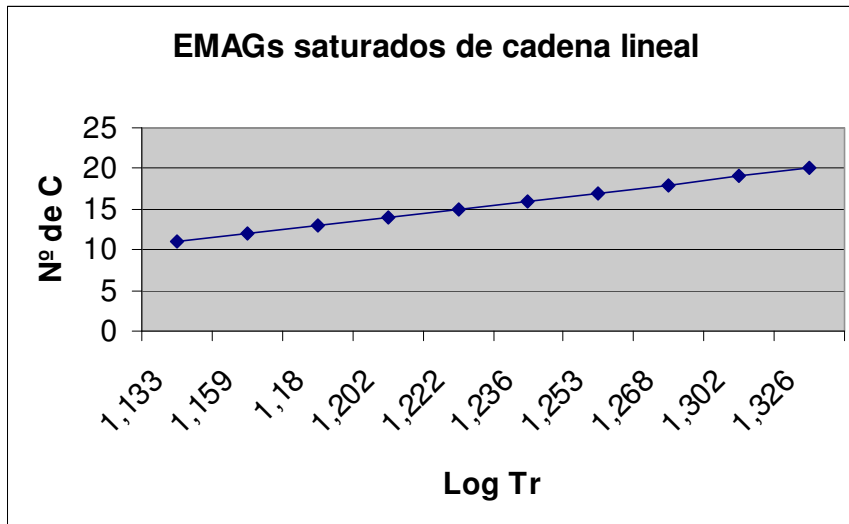


**Figura I-10.** Comportamiento en CG de los ácidos grasos saturados de cadena iso-metil-ramificada identificados en *Schizochytrium aggregatum* (14; n= 8, y 12).

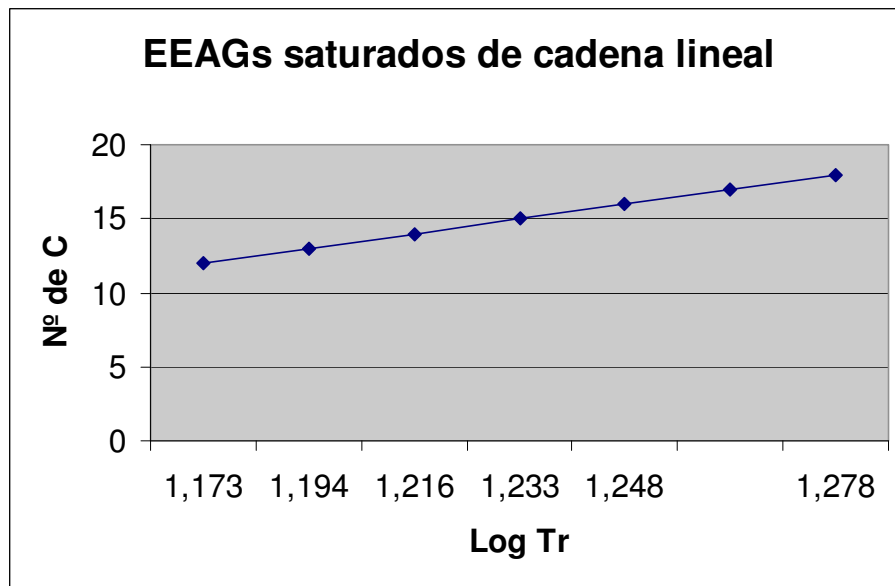


**Figura I-11.** Comportamiento en CG de los ácidos grasos saturados de cadena lineal identificados en *Schizochytrium aggregatum* (4; n= 12, y 14).





**Figura I-12.** Comportamiento en CG de los ésteres metílicos de los ácidos grasos saturados de cadena lineal encontrados en *Schizochytrium aggregatum* (5; n= 10-18) y patrones comerciales (5; n= 9, y 18).



**Figura I-13.** Comportamiento en CG de los ésteres etílicos de los ácidos grasos saturados de cadena lineal encontrados en *Schizochytrium aggregatum* (7; n= 10-14, y 16).

### I-3.2.2. Presencia de ésteres metílicos de ácidos grasos ramificados en la biomasa fúngica

Los ácidos grasos metilramificados (**14**) están ampliamente distribuidos en la naturaleza (Duncan y col., 1974; Perry y col., 1979; Seyama y col., 1983; Thiel y col., 1999; Carballeira y col., 2001; Nechev y col., 2002). Ahora se sabe que se forman por incorporación selectiva del metilmalonil-CoA por el enzima “ácido-graso-sintetasa” (Seyama y col., 1981) y que este paso biogénético es característico de bacterias que producen relativamente altas concentraciones de estos ácidos grasos *iso*- y *anteiso*-metilramificados, los cuales son, por tanto, aceptados como marcadores moleculares de la materia orgánica de origen bacteriano (Leo y Parker, 1966; Cooper y Blumer, 1968, Cranwell, 1973; 1974; Grimalt y Albaigés, 1990; Kaneda, 1991; Carballeira y col., 2001). Es por ello que la identificación en *S. aggregatum* de los ésteres metílicos de los ácidos que como el 14-metilpentadecanoico (**14**, **n= 12**) y 10-metilundecanoico (**14**, **n= 8**), dos derivados de ácidos grasos *iso*-metilramificados, es un indicio de la presencia de bacterias del genero *Mycobacterium* asociadas a este hongo (Lambert y col., 1986; Chou y col., 1996, Carballeira y col., 2001; Nechev y col., 2002). Aparte de su identificación por la huella dactilar en GC-MS, las *iso*-metilsustituciones propuestas en **14** se confirmaron por los fragmentos relativamente intensos que se observan en GC-MS para  $M^+$ -43 junto a la disminución de las intensidades de los fragmentos  $M^+$ -29 (Anderson, 1978).

### I-3.2.3. Presencia de ftalatos de dialquilo en la biomasa fúngica

El ftalato de bis-(2-etilhexilo) se ha propuesto anteriormente como un auténtico metabolito en el hongo *Penicillium olsonii* (Amade y col., 1994). Sin embargo, esta sustancia, conocida tanto por las siglas internacionales DEHP {di(2-ethylhexyl)phthalate} como DOP (dioctylphthalate), se usa ampliamente como plasticida del PMMA {poly(methyl methacrylate)} y el PVC {poly(vinyl chloride)}. Esta sustancia emigra de los materiales plásticos y se introduce en los fluidos biológicos donde se bioacumula con el paso del tiempo, fenómeno que ha provocado incluso problemas de salud en seres humanos que han estado

expuestos a diversos materiales plásticos (Freemantle, 2004). Es por ello que la identificación de las sustancias **36-37** en la biomasa fúngica de *S. aggregatum* plantea dudas sobre su origen debido a que el hongo vino empaquetado, precisamente, en recipientes de plástico.

#### **I-4. Conclusiones**

- 1.** Se identificaron en el micelio 38 tipos de componentes volátiles pertenecientes a los grupos de los *n*-alcanos (**1**), 1-alquenos (**6**), 1-alcanoles (**2**), 2-alquil-1-alcanoles (**3**), ácidos grasos libres - saturados (**4**) e insaturados (**8, 9**) -, ésteres metílicos y etílicos de ácidos grasos - saturados (**5, 7**) e insaturados (**10, 11, 12**) -, triglicéridos saturados (**15, 16, 17**), diglicéridos (**18, 19**), monoglicéridos insaturados (**20**), ceras - ésteres de ácidos y alcoholes grasos (**21, 22, 23 y 24**) -, esteroides (**25, 26**), triterpenos (**27**), catabolitos lipídicos (**28**), mono-, y sesquiterpenos de cadena cíclica y lineal (**29- 33**), ftalatos de dialquilo (**36, 37**) y otros (**13, 34, 35, 38**).
- 2.** En este estudio no se ha encontrado indicio alguno de que la cepa estudiada de *S. aggregatum* produzca micotoxinas. Paralelamente, aporta importantes nutrientes y, por tanto, es potencialmente aplicable al campo de la alimentación funcional - animal o humana -.
- 3.** Teniendo en cuenta el rendimiento en lípidos (9,47 %) de la extracción de la biomasa fúngica de *S. aggregatum*, se supone que este organismo puede ser usado para la producción de biodiesel.

## I-5. Experimental

### I-5.1. General

La cromatografía en columna en fase normal se realizó sobre gel de sílice de la casa Scharlau de 0,06- 0,20 mm (cabezas cromatográficas) y 0,04- 0,06 mm (adsorbentes en fase húmeda), tanto a media presión (sistema para cromatografía Büchi) como a baja presión (motores de Fluid Metering Inc. acoplados en serie a columnas de la marca Ace Glass Inc.). La cromatografía en columna en fase reversa se realizó mediante columnas LiChroprep RP-18 (40-63  $\mu\text{m}$ ) integradas en circuitos para cromatografía a baja presión, basados en motores de Fluid Metering Inc.

La filtración a través de gel (cromatografía de exclusión por tamaño molecular) se realizó por gravedad a través de Sephadex LH-20 lipofílico, eluyendo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : MeOH (1: 1).

La cromatografía en capa fina en fase normal se realizó sobre capas de 0,25 mm de espesor de la marca Tracer Analítica con mezclas de hexano, benceno, acetato de etilo, cloroformo y metanol en las proporciones que se especifican en cada caso. La cromatografía en capa fina en fase reversa se realizó sobre capas RP-18F<sub>254s</sub> de 0,25 mm de espesor de la marca Merck con mezclas de acetonitrilo: metanol: agua (80: 18: 2). En todos los casos, el revelado de las mismas se realizó por pulverización con oleum (ácido sulfúrico al 4 %, ácido acético al 80 % y agua al 16 %) y calentándolas a 120 °C durante 20 min.

La cromatografía HPLC semipreparativa se realizó bajo las siguientes condiciones: columna Waters ODS (4,6 x 250 mm, con partículas de 10  $\mu\text{m}$  y tamaño de poro de 100 Å) para las separaciones en fase reversa, y una Alltech Econosphere de  $\text{SiO}_2$  (4,6 x 250 mm, con partículas de 10  $\mu\text{m}$  y tamaño de poro de 100 Å) para las separaciones en fase normal. Ambas, en un aparato HPLC semipreparativo compuesto por una bomba isocrática Spectraphysics P100 y un detector UV Hewlett Packard 1050 de longitud de onda variable. En todos los casos se trabajó a temperatura ambiente (26 °C).

La cromatografía HPLC analítica se realizó en un aparato Shimadzu, modelo LC-9A, con un detector UV de la misma marca a 254 nm y un detector de índice de refracción asociado en serie. Las condiciones usadas fueron, bien una columna en fase normal con mezclas de *n*-hexano y EtOAc como eluyente a un flujo de 1,0 ml/ min., bien una columna Shodex OH Pak SB 806 HQ con agua con un 0,05 % de azida sódica como eluyente, también a un flujo de 1,0 ml/ min.

Los datos espectroscópicos de RMN fueron proporcionados por aparatos de resonancia magnética nuclear, del tipo Bruker AC a 250 MHz, otro de tipo Bruker AMX a 300 MHz y mediante una unidad Varian Inova de 400 MHz. Se utilizó tetrametilsilano como referencia interna en los espectros de protón y cloroformo deuterado ( $\delta$  77,0) o metanol deuterado ( $\delta$  49,0) de la casa Aldrich para calibrar los espectros de carbono 13.

La cromatografía analítica en fase gaseosa (GC-MS) se realizó en un aparato Saturn de Varian en las siguientes condiciones: columna CP-Sil 8 *Low bleed*, temperatura del inyector de 270 °C durante 10 min.; condiciones de split inicial *on*, 0,01 min. *off* y 5 min. *on*; horno programado a 50 °C durante 5 min., calentado a 15 °C/ min. hasta 250 °C y mantenido a esta temperatura durante 10 min. (tiempo total de análisis de 28,33 min. para cada muestra); flujo de 1 ml/ min.; detector de masas en modo EI (rango de *m/z* de 20 a 400). Tiempos de retención de referencia se obtuvieron con patrones de alcanos (Dr. Ehrenstorfer GmbH Alkanes-Mix 10), ésteres metílicos de ácidos grasos (Supelco<sup>TM</sup> 37 Component FAME Mix), 1-alquenos (Fluka Chemika) y 1-alcoholes (Fluka Chemika). El resto se asignaron por semejanza de la huella MS observada con las registradas en diferentes bases de datos contenidas en el instrumento.

## I-5.2. Obtención de la cepa

La cepa se adquirió de Aquafauna Bio-Marine, Hawthorne, California, USA. El hongo *Schizochytrium aggregatum* (American Type Culture Collection 20888) fue producido por la empresa citada en fermentadores según los procedimientos descritos por Barclay (1994) y Barclay y col. (1994) y concentrado por centrifugación, secado por aspersion y empaquetado al vacío (Barclay y Zeller, 1996).

## I-5.3. Análisis químico de la biomasa fúngica

### I-5.3.1. Obtención del extracto y fraccionamiento por polaridad

Una muestra de 110 g de *Schizochytrium aggregatum* se extrajo por maceración (diclorometano, x3, 24 h c/ u, y metanol, x3, 24 h c/ u). Los extractos se filtraron con papel Watman n° 1 y evaporaron en rotavapor. Los extractos se reunieron y desecaron a alto vacío para almacenarlos bajo nitrógeno con el nombre de “extracto bruto”, el cual, fue sometido posteriormente a partición por polaridades según el esquema de la Figura I-1.

El espectro de <sup>1</sup>H-RMN delató siete protones de ácidos carboxílicos a  $\delta$  12,5- 11,2; aromáticos a  $\delta$  8,5- 7,0; olefínicos a  $\delta$  5,9- 5,0; geminales a heteroátomos a  $\delta$  4,3- 3,5 y alifáticos a  $\delta$  3,0- 0,6.

A dicho extracto bruto se le añadieron 200 ml de agua y 200 ml de cloruro de metileno; las fases se separaron en embudo de decantación y la acuosa se reextrajo con cloruro de metileno (x2, 200 ml c/ u). Las capas orgánicas se reunieron y el disolvente se evaporó para dar 9,64 g de la fracción “liposoluble-0 (Sa-L-0)”.

La fase acuosa se extrajo con sec-butanol (x3, 200 ml c/ u) para dar 0,29 g de la fracción “hidrosoluble-1 (Sa-H-1)”.

A la fracción “liposoluble-0 (Sa-L-0)” se le añadieron 20 ml de agua, 180 ml de metanol y 200 ml de *n*-hexano; las fases se decantaron y la acuosa-metanólica se reextrajo con *n*-hexano hasta la decoloración de éste. Las fases *n*-hexánicas se reunieron y el disolvente se eliminó, resultando 8,64 g de un semisólido amarillo que denominamos fracción “liposoluble-1 (Sa-L-1)”. A la fase acuosa-metanólica resultante se le añadieron 160 ml de agua, resultando una fase H<sub>2</sub>O: MeOH (1: 1) que se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (x3, 200 ml c/ u). Las fases orgánicas reunidas se evaporaron para dar 0,75 g de la denominada fracción “liposoluble-2 (Sa-L-2)”. A la fase acuosa-metanólica resultante se le añadió más metanol y evaporó hasta sequedad, lo que rindió 0,215 g de la fracción “liposoluble-3 (Sa-L-3)”.

### Estudio de la fracción “Extracto bruto”

Por GC-MS resultaron identificadas las siguientes sustancias volátiles:

Éster 3-(octadeciloxi) propílico del ácido esteárico (**23**; Tr= 13,631)

Éster metílico del ácido dodecanoico (**5**; **n= 10**; Tr= 14,343)

Ácido tetradecanoico (**4**; **n= 12**; Tr= 14,746)

1-Hexadeceno (**6**; **n= 13**; Tr= 14,851)

Éster etílico del ácido dodecanoico (**7**; **n= 10**; Tr= 14,885)

Éster metílico del ácido tridecanoico (**5**; **n= 11**; Tr= 15,128)

Éster dibutilico del ácido hexanodioico (**34**; Tr= 15,597)

Éster bis(2-metilpropílico) del ácido hexanodioico (**35**; Tr= 15,601)

Éster etílico del ácido tridecanoico (**7**; **n= 11**; Tr= 15,632)

Tetradecanoato de metilo (**5**; **n= 12**; Tr= 15,885)

Ácido hexadecanoico (**4**; **n= 14**; Tr= 16,227)  
 Ácido 7-tetradecenoico (**8**; **n= 5**, **m= 5**; Tr= 16,331)  
 Éster etílico del ácido tetradecanoico (**7**; **n= 12**; Tr= 16,354)  
 Éster metílico del ácido pentadecanoico (**5**; **n= 13**; Tr= 16,593)  
 N-Butil-bencenosulfonamida (**38**; Tr= 16,655)  
 Éster bis(2-metilpropílico) del ácido 1,2-bencenodicarboxílico (**37**; Tr= 16,968)  
 Éster etílico del ácido pentadecanoico (**7**; **n= 13**; Tr= 17,045)  
 Éster metílico del ácido (Z)-9-hexadecenoico (**10**; **n= 5**, **m= 7**; Tr= 17,140)  
 Éster metílico del ácido hexadecanoico (**5**; **n= 14**; Tr= 17,259)  
 Éster metílico del ácido 14-metil-pentadecanoico (**14**; **n= 12**; Tr= 17,267)  
 9-Hexadecenoato de etilo (**11**; **n= 5**, **m= 7**; Tr= 17,570)  
 Éster etílico del ácido hexadecanoico (**7**; **n= 14**; Tr= 17,683)  
 Éster metílico del ácido heptadecanoico (**5**; **n= 15**; Tr= 17,904)  
 Éster metílico del ácido 3-octil-oxiranoctanoico (**13**; **n= 7**, **m= 7**; Tr= 18,286)  
 Éster 2-hidroxi-1-(hidroximetil) etílico del ácido (Z)-9-octadecenoico (**20**; Tr= 18,413)  
 Éster metílico del ácido 9-octadecenoico (**10**; **n= 7**, **m= 7**; Tr= 18,416)  
 Éster metílico del ácido octadecanoico (**5**; **n= 16**; Tr= 18,533)  
 Éster eicosílico del ácido (Z)-9-hexadecenoico (**24**; Tr= 18,764)  
 Éster etílico del ácido octadecanoico (**7**; **n= 16**; Tr= 18,954)  
 Éster metílico del ácido 3-pentil-oxiranoundecanoico (**13**; **n= 4**, **m= 10**; Tr= 19,732)  
 Éster metílico del ácido nonadecanoico (**5**; **n= 18**; Tr= 20,024)

### **Estudio de la fracción “liposoluble-0 (Sa-L-0)”**

Por GC-MS resultaron identificadas las siguientes sustancias volátiles:

Tridecano (**1**; **n= 10**; Tr= 12,384)  
 10-Undecenal (**28**; Tr= 13,125)  
 Éster metílico del ácido dodecanoico (**5**; **n= 10**; Tr= 14,422)  
 Ácido tetradecanoico (**4**; **n= 12**; Tr= 14,862)  
 Éster 2-(octadeciloxi) etílico del ácido hexadecanoico (**22**; Tr= 15,016)  
 Tetradecanoato de metilo (**5**; **n= 12**; Tr= 15,957)  
 Ácido hexadecanoico (**4**; **n= 14**; Tr= 16,354)  
 N-Butil bencenosulfonamida (**38**; Tr= 16,786)  
 Éster metílico del ácido (Z)-9-hexadecenoico (**10**; **n= 5**, **m= 7**; Tr= 17,230)  
 Éster metílico del ácido hexadecanoico (**5**; **n= 14**; Tr= 17,344)  
 Éster 1-(hidroximetil)-1,2-etanodiílico del ácido hexadecanoico (**19**; Tr= 17,714)  
 Éster metílico del ácido (Z)-11-octadecenoico (**10**; **n= 5**, **m= 9**; Tr= 18,514)  
 Colesterol (**25**; Tr= 18,870)  
 3,7,11-Trimetil-1-dodecanol (**33**; Tr=19,038)

### **Estudio de la fracción “liposoluble-1 (Sa-L-1)”**

Por CCF analítica se identificaron seis sustancias.

En el espectro de <sup>1</sup>H-RMN de esta mezcla se detectaron protones olefínicos ( $\delta$  5,1- 5,3), geminales a heteroátomos ( $\delta$  4,0- 4,2) y los propios de cadenas hidrocarbonadas alifáticas ( $\delta$  2,9-0,7).

En el espectro de <sup>13</sup>C-RMN se observaron seis carbonos carbonílicos ( $\delta$  178- 187), 16 carbonos olefínicos ( $\delta$  130,939 y 128,859), 4 carbonos geminales a heteroátomos ( $\delta$  77,543-65,914) y 34 señales de cadenas alifáticas ( $\delta$  37,469- 14,132).

Por GC-MS resultaron identificadas las siguientes sustancias volátiles:

Tridecano (**1**; **n= 10**; Tr= 12,380)  
 (1 $\alpha$ , 2 $\beta$ , 5 $\beta$ )-2-Metil-5-(1-metiletil)-ciclohexanol (**31**; Tr= 12,789)  
 1-Pentadeceno (**6**; **n= 12**; Tr= 13,236)  
 Tetradecano (**1**; **n= 11**; Tr= 13,299)  
 Pentadecano (**1**; **n= 12**; Tr= 14,156)  
 Éster metílico del ácido 10-metil-undecanoico (**14**; **n= 8**; Tr= 14,412)  
 Ácido tetradecanoico (**4**; **n= 12**; Tr= 14,858)  
 Éster tetradecílico del ácido (Z)-9-hexadecenoico (**21**; Tr= 15,609)  
 Estigmasterol (**26**; Tr= 15,672)  
 Tetradecanoato de metilo (**5**; **n= 12**; Tr= 15,952)  
 Ácido hexadecanoico (**4**; **n= 14**; Tr= 16,348)  
 Ácido (E)-9-octadecenoico (**9**; Tr= 16,399)  
 Ácido (Z)-7-tetradecenoico (**8**; **n= 5**, **m= 5**; Tr= 16,474)  
 Éster metílico del ácido pentadecanoico (**5**; **n= 12**; Tr= 16,664)  
 Éster bis (2-metilpropílico) del ácido 1,2-bencenodicarboxílico (**37**; Tr= 17,057)  
 Éster metílico del ácido (Z)-9-hexadecenoico (**10**; **n= 5**, **m= 7**; Tr= 17,223)  
 Éster metílico del ácido 14-metil-pentadecanoico (**14**; **n= 12**; Tr= 17,339)  
 Éster 2-hidroxi-1-(hidroximetil) etílico del ácido (Z)-9-octadecenoico (**20**; Tr= 18,504)

Por filtración a través de Sephadex (LH-20), eluyendo con MeOH: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y monitorizando por CCF analítica se obtuvieron las fracciones Sa-L-1-a y Sa-L-1-b, ambas como mezclas de sustancias.

### **Estudio de la fracción “liposoluble-1-a (Sa-L-1-a)”**

Por GC-MS resultaron identificadas las siguientes sustancias volátiles:

Ácido tetradecanoico (**4**; **n= 12**; Tr=14,748)  
 Tetradecanoato de metilo (**5**; **n= 12**; Tr= 15,879)  
 Éster etílico del ácido tetradecanoico (**7**; **n= 12**; Tr= 16,356)  
 Éster metílico del ácido (Z)-9-hexadecenoico (**10**; **n= 5**, **m= 7**; Tr= 17,155)  
 Éster metílico del ácido hexadecanoico (**5**; **n= 14**; Tr= 17,270)  
 Éster 1-(hidroximetil)-1,2-etanodiílico del ácido hexadecanoico (**19**; Tr= 17,578)  
 Éster etílico del ácido hexadecanoico (**7**; **n= 14**; Tr= 17,693)  
 Éster metílico del ácido 11-octadecenoico (**10**; **n= 5**, **m= 9**; Tr= 18,423)

Por HPLC semipreparativa (fase normal, hexano: EtOAc, 80: 20) se obtienen tres fracciones diferentes: Liposoluble-1-a-1 (Sa-L-1-a-1, 350 mg), Liposoluble-1-a-2 (Sa-L-1-a-2, 56 mg) y Liposoluble-1-a-3 (Sa-L-1-a-3, 5 mg).

### **Estudio de la fracción (Sa-L-1-a-1)**

Por CCF analítica (Hexano: EtOAc, 80: 20) se identificaron dos sustancias.

En el espectro de <sup>1</sup>H-RMN de esta mezcla se detectaron protones olefínicos ( $\delta$  5,1- 5,5), geminales a heteroátomos ( $\delta$  4,0- 4,2; ddd) y los propios de cadenas hidrocarbonadas alifáticas ( $\delta$  2,9- 0,7).

En el espectro de <sup>13</sup>C-RMN se observaron seis carbonos carbonílicos ( $\delta$  175,0- 185,0), 14 carbonos olefínicos ( $\delta$  137,0 y 125,0), varios carbonos geminales a heteroátomos ( $\delta$  60,0- 70,0) y 28 señales de cadenas alifáticas ( $\delta$  37,469- 14,132).

Se abordó su separación por CCF preparativa (fase normal, n-hexano: EtOAc, 90: 10). Por GC-MS no se identificó ningún componente volátil.

### **Estudio de la fracción (Sa-L-1-a-2)**

En el espectro de <sup>1</sup>H-RMN de esta mezcla se detectaron protones olefínicos ( $\delta$  5,1- 5,3), geminales a heteroátomos ( $\delta$  3,3- 4,2) y los propios de cadenas hidrocarbonadas alifáticas ( $\delta$  2,9- 0,7).

Por GC-MS no se identificó ningún componente volátil.

### **Estudio de la fracción (Sa-L-1-a-3)**

Por GC-MS resultaron identificadas las siguientes sustancias volátiles:

2-Hexil-1-octanol (**3**; **n= 3**, **m= 5**; Tr= 13,977)

1-Eicosanol (**2**; Tr= 16,330)

Éster etílico del ácido hexadecanoico (**7**; **n= 14**; Tr= 17,685)

Ácido erúico (**8**; **n= 7**, **m= 11**; Tr= 19,775)

Se trata de una sustancia homogénea según informa la HPLC y la CCF (fase normal, hexano: EtOAc, 80: 20, Rf= 0,17).

En el espectro de <sup>1</sup>H-RMN se detectaron protones olefínicos ( $\delta$  4,9- 5,6), geminales a heteroátomos ( $\delta$  3,4- 4,8) y los metilenos/ metinos que sugieren un terpenoide tetracíclico del tipo **25** o **26**.

### **Estudio de la fracción “liposoluble-2 (Sa-L-2)”**

Por CCF (fase normal, n-Hexano: EtOAc, 80: 20, Rf= 0,81), el espectro de <sup>1</sup>H-RMN y el espectro de <sup>13</sup>C-RMN se presenta como una sustancia lipídica mayoritaria y homogénea.

Por GC-MS resultaron identificadas las siguientes sustancias volátiles:

4-Metil-1-(1-metiletil)-ciclohexanol (**30**; Tr= 12,841)

Éster 3-(octadeciloxi)-propílico del ácido esteárico (**23**; Tr= 14,092)

Éster 1,2,3-propanotrilico del ácido esteárico (**16**; Tr= 14,590)

Ácido tetradecanoico (**4**; **n= 12**; Tr= 14,845)

Tetradecanoato de metilo (**5**; **n= 12**; Tr= 15,939)

Ácido hexadecanoico (**4**; **n= 14**; Tr= 16,334)

Éster etílico del ácido tetradecanoico (**7**; **n= 12**; Tr= 16,424)

Éster bis(2-metilpropílico) del ácido 1,2-bencenodicarboxílico (**37**; Tr= 17,044)

Éster etílico del ácido pentadecanoico (**7**; **n= 13**; Tr= 17,096)

Éster metílico del ácido (Z)-9-hexadecenoico (**10**; **n= 5**, **m= 7**; Tr= 17,210)

Éster metílico del ácido hexadecanoico (**5**; **n= 14**; Tr= 17,326)

Germanicol (**27**; Tr= 17,427)

9-Hexadecenoato de etilo (**11**; **n= 5**, **m= 7**; Tr= 17,644)

Ftalato de dibutilo (**36**; Tr= 17,696)

Éster etílico del ácido hexadecanoico (**7**; **n= 14**; Tr= 17,746)

Éster 1-(hidroximetil)-1,2-etanodifílico del ácido hexadecanoico (**19**; Tr= 17,914)



### **Estudio de la fracción “liposoluble-3 (Sa-L-3)”**

Por GC-MS resultaron identificadas las siguientes sustancias volátiles:

Tridecano (**1**; **n= 10**; Tr= 12,368)  
Lactona del ácido 4-hidroxi-3,4,6-trimetilhept-5-enoico (**32**; Tr= 12,803)  
4-Metil-1-(1-metiletil) ciclohexanol (**30**; Tr= 12,841)  
1-Pentadeceno (**6**; **n= 12**; Tr= 13,224)  
Pentadecano (**1**; **n= 12**; Tr= 14,146)  
1-Hexadeceno (**6**; **n= 13**; Tr= 14,899)  
1-Octadeceno (**6**; **n= 15**; Tr= 16,388)  
Éster bis(2-metilpropílico) del ácido 1,2-benzenodicarboxílico (**37**; Tr= 17,035)  
Éster metílico del ácido 14-metil-pentadecanoico (**14**; **n= 12**; Tr= 17,327)  
Ftalato de dibutilo (**36**; Tr= 17,683)

### **Estudio de la fracción “hidrosoluble-1 (Sa-H-1)”**

Por GC-MS resultaron identificadas las siguientes sustancias volátiles:

Tetrahidro-4-hidroxi-4-metil-2H-piran-2-ona (Mevalonato) (**29**; Tr= 12,484)  
4-Metil-1-(1-metiletil)-ciclohexanol (**30**; Tr= 12,828)  
Tetradecano (**1**; **n= 11**; Tr= 13,275)  
Pentadecano (**1**; **n= 12**; Tr= 14,133)  
Trinonanoína (**15**; Tr= 14,260)  
Tetradecanoato de metilo (**5**; **n= 12**; Tr= 15,930)  
Éster bis(2-metilpropílico) del ácido 1,2-benzenodicarboxílico (**37**; Tr= 17,034)  
Éster metílico del ácido (Z)-9-hexadecenoico (**10**; **n= 5**, **m= 7**; Tr= 17,200)  
Éster metílico del ácido hexadecanoico (**5**; **n= 14**; Tr= 17,316)  
Ftalato de dibutilo (**36**; Tr= 17,672)  
2-Hidroxi-1,3-propanodiol éster del ácido octadecanoico (**18**; Tr= 17,735)  
Éster metílico del ácido (Z,Z)-9,12-octadecadienoico (**12**; Tr= 18,413)  
Éster 1,2,3-propanotriilico del ácido docosanoico (**17**; Tr= 19,206)

## I-6. Referencias bibliográficas

- Ackman, R.G. 1982 Fatty acid composition of fish oils. *In: Nutritional evaluation of long chain fatty acids in fish oil*. Barlow, S.M. and Stamby, M.E. (eds.), Academic Press, London, pp. 25-88.
- Amade, P., Mallea, M. and Bouaiacha, N. 1994 Isolation, structural identification and biological activity of two metabolites produced by *Penicillium olsonii* Bainier and Sartory. **J. Antibiot.**, v. 47, n. 2, pp. 2001-207.
- Andersson, B.A. 1978 Mass spectrometry of fatty acid pyrrolidines. **Prog. Chem. Fats Lipids**, v. 16, pp. 279-308.
- Ashford, A., Barclay, W.R., Weaver, C.A., Giddings, T.H. and Zeller, S. 2000 Electron microscopy may reveal structure of docosahexanoic acid-rich oil within. **Lipids**, v. 35, n. 12, pp. 1377-1386.
- Bajpai, P.K., Bajpai, P.Y and Ward, O.P. 1991 Optimization of production of docosahexanoic acid (DHA) by *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304. **JAOCS**, v. 68, n. 7, pp. 509-514.
- Balaban, M.O., O'Keefe, S. and Polar, J.T. 1996 Supercritical fluid extraction of algae. *In: Supercritical fluid technology in oil and lipid chemistry*. King, J.W. and List, G. (eds.), Am. Oil Chem. Soc., Champaign, Illinois, pp. 247-266.
- Barclay, W.R. 1994 Process for growing *Thraustochytrium* and *Schizochytrium* using non-chloride salts to produce a microfloral biomass having n-3 highly unsaturated fatty acids. **U.S. Patent** n° US 5340742.
- Barclay, W.R., Meager, K.M. and Abril, J.R. 1994 Heterotrophic production of long chain omega-3 fatty acids utilizing algae-like microorganisms. **J. Appl. Phycology**, v. 6, n. 5-6, pp. 123-129.

- Barclay, W.R. and Zeller, S. 1996 Nutricional enhancement of n-3 and n-6 fatty acids in rotifers and *Artemia nauplii* by feeding spray-dried *Schizochytrium* sp. **J. World Aquac. Soc.**, v. 27, n. 3, pp. 314-322.
- Benemann, J.R. 1992 Microalgae aquaculture feeds. **J. Appl. Phycol.**, v. 4, n. 3, pp. 233-245.
- Boeing, P. 1997 Use of spray-dried *Schizochytrium* sp. as a partial algal replacement for juvenile bivalves. **J. Shellfish Res.**, v. 16, pp. 284-288.
- Bowles, R.D., Hunt, A.E., Bremer, G.B., Duchars, M.G. and Eaton, R.A. 1999 Long-chain n-3 polyunsaturated fatty acid production by members of the marine group the Thraustochytrids: screening of isolates and optimization of docosahexanoic acid production. **J. Biotech.**, v. 70, n. 1, pp. 193-202.
- Carballeira, N.M., Miranda, C., Lozano, C.M., Nechev, J.T., Ivanova, A., Ilieva, M., Tzvetkova, I. and Stefanov, K. 2001 Characterization of novel methyl-branched chain fatty acids from a halophilic *Bacillus* species. **J. Nat. Prod.**, v. 64, n. 2, pp. 256-259.
- Chou, S., Chedore, P., Haddad, A., Paul, N.R. and Kasatiye, S. 1996 Direct identification of *Mycobacterium* species in Bactec 7H12B medium by gas-liquid chromatography. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, n. 5, pp. 1317-1320.
- Cohen, Z. 1996 Products from microalgae. *In: CRC Handbook of microalgal mass culture.* Richmond, A. (ed.), Boca Raton, 528 p.
- Conner, W.E. 1997 The beneficial effects of omega-3 fatty acids: cardiovascular disease and neurodevelopment. **Curr. Op. Lipid.**, v. 8, n. 1, pp. 1-3.
- Cooper, W.J. and Blumer, M. 1968. Linear, *iso*- and *anteiso*- fatty acids in recent sediments of the North Atlantic. **Deep-Sea Res.**, v. 15, n. 5, pp. 535-540.
- Coutteau, P. and Sorgeloos, P. 1992 The use of algal substitutes and requirements for live algae in the hatchery and nursery rearing of bivalve molluscs: an international survey. **J. Shellfish Res.**, v. 11, n. 2, pp. 467-476.

- Cranwell, P.A. 1973 Branched-chain and cyclopropanoid acids in a recent sediment. **Chem. Geol.**, v. 11, n. 4, pp. 307-313.
- Cranwell, P.A. 1974 Monocarboxylic acids in lake sediments: indicators, derived from terrestrial and aquatic biota, of palaeoenvironmental trophic levels. **Chem. Geol.**, v. 14, n. 1-2, pp. 1-14.
- Duncan, W.R.H., Lough, A.K., Garton, G.A. and Brooks, P. 1974 Characterization of branched chain fatty acids from subcutaneous triacylglycerols of barley-fed lambs. **Lipids**, v. 9, n. 9, pp. 669-673.
- Fan, K.W., Chen, F., Jones, E.B. and Vrijmoed, L.L. 2001 Eicosapentanoic and docosahexaenoic acids production by and okara-utilizing potencial of *thaustochytrids*. **J. Ind. Microb. Biotech.**, v. 27, n. 4, pp. 199-202.
- Figueiredo, J. and Narciso, L. 2006 Productivity improvement of *Lysmata seticaudata* larval rearing protocol through modelling. **Aquaculture**, v. 261, n. 4, pp. 1249-1258.
- Freemantle, M. 2004 Designer liquids in polymer systems. **Science Tech.**, v. 82, n. 18, pp. 26-29.
- Grimalt, J.O., Albaigés, J. 1990 Characterization of the depositional environment of the Ebro Delta (Western Mediterranean) by the study of sedimentary lipid markers. **Marine Geol.**, v. 95, n. 3-4, pp. 207-224.
- Harel, M., Koven, W., Lein, I., Bar, Y., Behrens, P., Stubblefield, J., Zohar, Y. and Place, A.R. 2002 Advanced DHA, EPA and ARA enrichment materials for marine aquaculture using single cell heterotrophs. **Aquaculture**, v. 213, n. 1-4, pp. 347-362.
- Horrocks, L.A. and Yeo, Y.K. 1999 Health benefits of docosahexaenoic acid (DHA). **Pharm. Res.**, v. 40, n. 3, pp. 211-225.
- Izquierdo, M.S. 1996 Essential fatty acid requirements of cultured marine fish larvae. **Aquac. Nutrition**, v. 2, n. 4, pp. 183-191.

- Kaneda, T. 1991 *Iso-* and *anteiso-*fatty acids in bacteria: biosynthesis, function and taxonomic significance. **Microbiol. Reviews**, v. 55, n. 2, pp. 288-302.
- Kendrick, A. and Ratledge, C. 1992 Lipids of selected molds grown for production of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. **Lipids**, v. 27, n. 1, pp. 15-20.
- Kiffe, M., Nokihara K. and Matsunaga, T. 1995 Purification of docosahexaenoic acid (DHA) produced by marine microalgae *Isochrysis galbana*. **J. Marine Biotechnol.**, v. 2, n. 3, pp. 139-142.
- Kupchan, S.M, Briton, R.W., Ziegler, M.F. and Siegel, C.W. 1973 Bruceatin, a new potent antileukemic simaroubolide from *B. antidysenterica*. **J. Org. Chem.**, v. 38, pp. 178-179.
- Lambert, M.A., Moss, C.W., Silcox, V.A. and Good, R.C. 1986 Analysis of mycolic acid cleavage products and cellular fatty acids of *Mycobacterium* species by capillary gas chromatography. **J. Clin. Microbiol.**, v. 23, n. 4, pp. 731-736.
- Langdon, C. and Önal, E. 1999 Replacement of living microalgae with spray-dried diets for the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Aquaculture**, v. 180, n. 3-4, pp. 283-294.
- Leo, R.G., Parker, P.L. 1966 Branched chain fatty acids in sediments. **Science**, v. 152, n. 3722, pp. 649-650.
- Lewis, T.E., Nichols, P.D. and McMeekin, T.A. 1999 The biotechnological potential of thraustochytrids. **Mar. Biotechnol.**, v. 1, n. 6, pp. 580-587.
- Lewis, T.E., Nichols, P.D. and McMeekin, T.A. 2000 Evaluation of extraction methods for recovery of fatty acids from lipid-producing microheterotrophs. **J. Microb. Methods**, v. 43, n. 2, pp. 107-116.
- Luizi, F.S., Gara, B., Shields, R.J. and Bromage, N.R. 1999 Further description of the development of the digestive organs in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) larvae, with notes on differential absorption of copepod and *Artemia* prey. **Aquaculture**, v. 176, n. 1-2, pp. 101-116.

- Molina Grima, E., Sánchez Pérez, F., García Camacho, F., Acién Fernández, F.G., López Alonso, D. and Segura del Castillo, C.I, 1994 Preservation of the marine microalgae, *Isochrysis galbana*: influence on the fatty acid profile. **Aquaculture**, v. 123, n. 3-4, pp. 377-385.
- Nechev, J., Christie, W.W., Robaina, R., de Diego, F.M., Ivanova, A., Popov, S. and Stefanov, K. 2002 Chemical composition of the sponge *Chondrosia reniformis* from the Canary Islands. **Hydrobiologia**, v. 489, n. 1-3, pp. 91-98.
- Nichols, D., Bowman, J., Sanderson, K., Nichols, C.M., Lewis, T., McMeekin, T. and Nichols, P.D. 1999 Developments with Antarctic microorganisms: culture collections, bioactivity screening, taxonomy, PUFA production and cold-adapted enzymes. **Curr. Opin. Biotech.**, v. 10, n. 3, pp. 240-246.
- Nilsson, W.B. 1996 Supercritical fluid extraction and fractionation of fish oils. *In: Supercritical fluid technology in oil and lipid chemistry*. King, J.W. and List, G.R. (eds.), Am. Oil Chem. Soc., Champaign, Illinois, pp. 180-212.
- Perry, G.J., Volkman, J.K. and Johns, R.B. 1979 Fatty acids of bacterial origin in contemporary marine sediments. **Geoquim. Cosmoch. Acta**, v. 43, n. 11, pp. 1715-1725.
- Pomponi, S.A. 1999 The bioprocess-technological potential of the sea. **J. Biotech.**, v. 70, n. 1-3, pp. 5-13.
- Porter, D. 1990 Phylum Labyrinthulomycota. *In: Handbook of protocista*. Margulis, L., Corliss, J.O., Melkonian, M. and Chapman, D.J. (eds.), Jones and Bartlett Publishers, Boston, pp. 388-398.
- Porter, D. and Kirk Jr., P.W. 1986 Marine Fungi: Taxonomic and ecological considerations. II. Lower fungi. *In: Frontiers in applied microbiology*. Mukerji, K.G., Singh, V.P. and Garg, K.L. (eds.), Print House, Lucknow, pp. 235-246.

- Rainuzzo, J.R., Reitan K.I. and Jorgensen, L. 1992 Comparative study on fatty acid and lipid composition of four marine fish larvae. **Comp. Biochem. Physiol.: B**, v. 103, pp. 21-26.
- Robles Medina, R., Esteban Cerdán, L., Giménez Giménez, Camacho Páez, B., Ináñez González, M.J. and Molina Grima, E. 1999 Lipase-catalyzed esterification of glycerol and polyunsaturated fatty acids from fish and microalgae oils. **J. Biotech.**, v. 70, n. 1-3, pp. 379-391.
- Rosu, R., Iwasaki, Y., Shimidzu, N., Doisaki, N. and Yamane, T. 1998 Enzymatic synthesis of glycerids from DHA-enriched PUFA ethyl ester by glycerolysis under vacuum. **J. Mol. Catalysis: B**, v. 4, n. 4, pp. 191-198.
- Sargent, J.R., Bell, J.G., Bell, M.V., Henderson, R.J. and Tocher, D.R. 1995 Dietary origins and functions of long-chain (n-3) polyunsaturated fatty acids in marine fish. **Mar. Biotechnol.**, v. 3, pp. 26-28.
- Sargent, J.R., McEvoy, L., Estevez, A., Bell, G., Bell, M., Henderson, J. and Tocher, D. 1999 Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. **Aquaculture**, v. 179, n. 1-4, pp. 217-229.
- Seyama, Y., Ohashi, K., Imamura, T., Kasama, T. and Otsuka, H. 1983 Branched chain fatty acids in phospholipids of Guinea pig harderian gland. **J. Biochem.**, v. 94, pp. 1231-1239.
- Seyama, Y., Otsuka, H., Kawaguchi, A. and Yamakawa, T. 1981 Fatty acid synthetase from the harderian gland of Guinea pig: Biosynthesis of methyl-branched fatty acids. **J. Biochem.**, v. 90, n. 3, pp. 789-797.
- Simopoulos, A.P. 1991 Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 54, n. 3, pp. 438-463.
- Stout, V.F., Nilsson, W.B. and Krzynowenk, H. 1990 Fractionation of fish oils and their fatty acids. *In: Fish oils and Nutrition*. Stansby, M.E. (ed.), Seattle, 1908 p.

- Swaaf, M.E., Rijk, T.C., Eggink, G. and Sijtsma, L. 1999 Optimisation of docosahexaenoic acid production in batch cultivations by *Cryptocodinium cohnii*. **J. Biotech.**, v. 70, n. 1-3, pp. 185-192.
- Tapiero, H., Nguyen Ba, G. Couvreur, K.D. and Tew, K.D. 2002 Polyunsaturated fatty acids (PUFA) and eicosanoids in human health and pathologies. **Biomed. Pharmacother.**, v. 56, n. 5, pp. 215-222.
- Van der Wielen, L.A.M. and Cabatingan, L.K. 1999 Fishing products from the sea-racional downstream processing of marine bioproducts. **J. Biotech., Nutrit. Mark.**, v. 70, n. 1, pp. 363-371.
- Thiel, V., Jenisch, A., Wörheide, G., Löwenberg, A., Reitner, J. and Michaelis, W. 1999 Mid-chain branched alkanolic acids from “living fossil” demosponges: a link to ancient sedimentary lipids? **Org. Geochem.**, v. 30, n. 1, pp. 1-14.
- Vas Dias, F.W. 1995 Eicosanoids - A brief overview. *In: Fish oil: technology, nutrition and marketing*. Hamilton, R.J. and Rice, R.D. (eds.), Barnes, P.J. and Associed, Bridgwater, 138 p.
- Watanabe, T. and Kiron, V. 1994 Prospects in larval fish dietetics. **Aquaculture**, v. 124, n. 1-4, pp. 223-251.
- Yokochi, T., Honda, D., Higashihara, T. and Nakahara, T. 1998 Optimization of docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium limacinum* SR21. **Appl. Microbiol. Biotech.** v. 49, n. 1, pp. 72-76.
- Yongmanitchai, W.Y and Ward, O.P. 1989 Omega-3 fatty acids: alternative sources of production. **Proc. Biochem.**, v. 24, n. 4, pp. 117-125.
- Zaldivar, J.L. 1992 Positivas proyecciones para los aceites de pescado. **Chile Pesq.**, v. 70, pp. 35-38.



## *CAPITULO II*

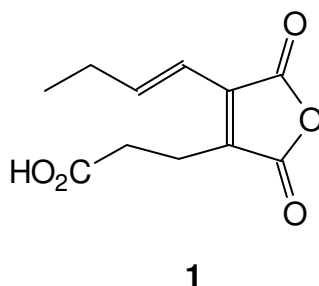
## - CAPITULO II -

### Composición lipídica del hongo *Paecilomyces variotii* aislado del medio marino.

#### II-1. Antecedentes

El hongo filamentoso *Paecilomyces variotii* es conocido en biotecnología por sus múltiples aplicaciones. La novedad en este caso es que se aisló a partir de una muestra de agua colectada en la playa de La Laja, Gran Canaria, por lo que se ha estimado que procedía su reestudio. El primer paso consistió en una revisión bibliográfica, de la que resultaron los siguientes datos.

Aldridge y col. (1980) describieron el aislamiento de un anhídrido (**1**) a partir de *P. variotii*.

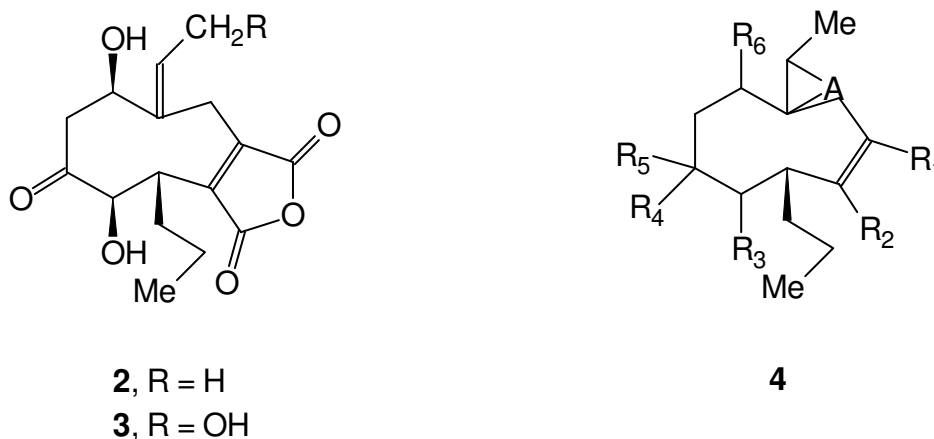


**Figura II-1.** Anhídrido (**1**), de *P. variotii*.

Waehner y col. (1983) aportaron un procedimiento para obtener proteína unicelular a partir de *P. variotii*. Udall y col. (1984) fabricaron alimentos de origen microbiano con *P. variotii*, y estudiaron las concentraciones adecuadas para el consumo humano. En relación con esto, Bajpai y Bajpai (1987) usaron *P. variotii* TCRDC-M5 para producir proteína unicelular con un rendimiento de 25 g de peso seco de biomasa por litro en un fermentador de laboratorio. También Silva y col. (1995) abordaron la obtención de proteína a partir de *P. variotii*, y, finalmente,

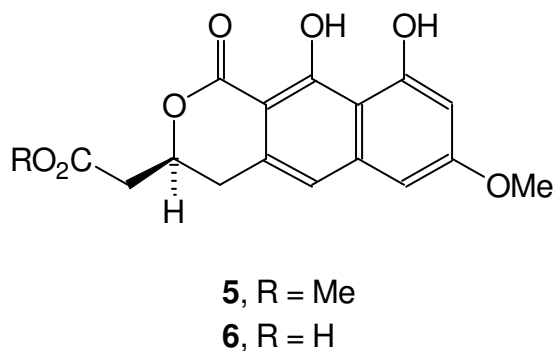
Varsami y col. (1999) enriquecieron tallos de desecho de soja con la proteína fúngica de *P. variotii*.

Haneishi y col. (1988) aislaron cornexistina (**2**), originalmente antlercidina, de *P. variotii* SANK 21086. Tras purificarlo por cromatografía de exclusión molecular (Sephadex LH-20) y cristalización en diclorometano, se obtuvo con un rendimiento de 397 g/l. Su actividad herbicida fue demostrada tanto por aplicación foliar como en suelo. Nakajima y col. (1991) aislaron un metabolito que también identificaron como Cornexistina (**2**) a partir del filtrado del cultivo de *P. variotii* SANK 21086. Estructuralmente se agrupó en los “nonadridos” después de un estudio espectroscópico y cristalográfico - difracción de rayos X -. Desde el punto de vista de su actividad biológica, de nuevo, presentó acción herbicida frente a plantas anuales y perennes, tanto mono- como dicotiledoneas, lo que supuso potencial protección para los cultivos de maíz. Amagasa y col. (1994) cuantificaron la actividad al descubrir que el metabolito Cornexistina (**2**) presentaba acción herbicida sobre diversos semilleros a la concentración de 0,5 kg/ ha respetando la planta del maíz (*Zea mays* L.); no deja de ser interesante el que dicho efecto resulte inhibido por los intermedios del ciclo TCA. Takahashi y col. (1994) aportaron nuevos datos sobre Cornexistina (**2**) confirmando su fórmula molecular, C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>O<sub>6</sub>, y el mencionado esqueleto de “nonadrido” (**2**). Además, descubrieron que también presenta actividad frente a hongos y bacterias *gram* positivas y negativas, con LD<sub>50</sub> de 100 mg/ kg. Finalmente, Fields y col. (1995) aislaron hidroxicornexistina (**3**) por fermentación de *P. variotii*, y Takeshiba y col. (1990) prepararon diversos derivados de cornexistina (**4**, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>= -CO<sub>2</sub>H, CONH<sub>2</sub>; R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>= C(:X)YC(:Z), X,Y,Z= O, NH; R<sub>3</sub>, R<sub>6</sub>= OH, SH, NH<sub>2</sub>, X; R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>= H,OH; o R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>= O, NH; A= enlace simple, O; los grupos SH, -NH<sub>2</sub>, -CO<sub>2</sub>H, -CONH<sub>2</sub>, NH pueden estar protegidos o en forma de sus sales) y los ensayaron como inhibidores de la germinación, herbicidas y/ o reguladores del crecimiento de las plantas (hormonas vegetales).



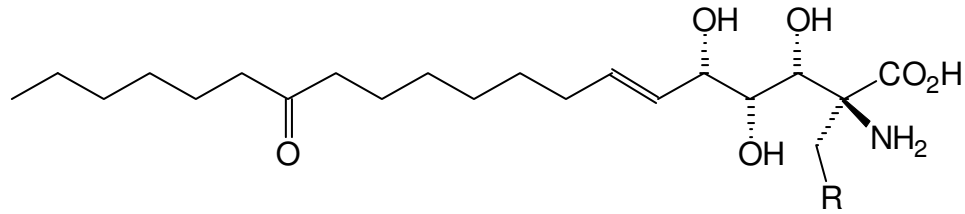
**Figura II-2.** Cornexistina (2), Hidroxicornexistina (3) y derivados (4).

Ayer y col. (1991) aislaron *P. variotii* Bainier a partir de larvas del escarabajo del pino, lo cultivaron en medio líquido y extrajeron dos metabolitos nuevos con el esqueleto de 1H-nafto [2,3-c] piran-1-ona. Sus estructuras moleculares, semiviriditoxina (5) y ácido semiviriditóxico (6) fueron elucidadas por métodos químicos y espectroscópicos.



**Figura II-3.** Semiviriditoxina (5) y ácido semiviriditóxico (6).

Horn y col. (1992) identificaron las Sphingofunginas E y F (7, 8) en el caldo de cultivo de *P. variotii*. Al igual que la Sphingofungina B, inhibieron serinapalmitoiltransferasa a concentración nanomolar. Además, Sphingofungina E resultó con actividad fungicida frente a varios hongos implicados en diversas dolencias humanas.



7, R = OH

8, R = H

**Figura II-4.** Sphingofunginas E (7) y F (8).

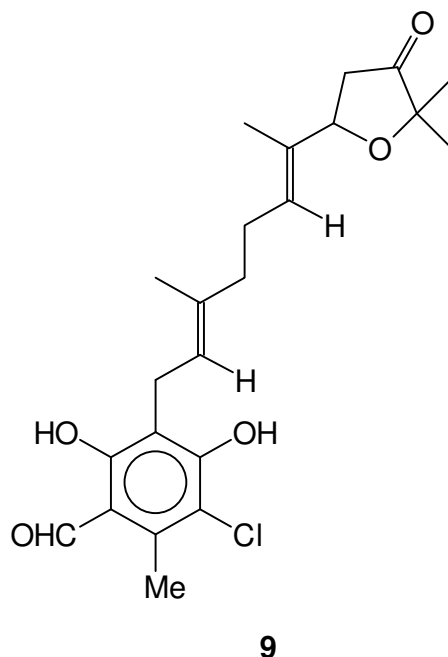
Horn y col. (1993) identificaron dos ácidos eicosenoicos con actividad fungicida en el caldo de cultivo de *P. variotii*.

Leal (1994), estudió la estructura de los polisacáridos hidrosolubles de *P. variotii* por GC, GC-MS y RMN. Domenech y col. (1994) ampliaron el estudio de los polisacáridos de las paredes celulares de *P. variotii* a cuatro variedades del mismo hongo.

Dechkan-Khodzhaeva y col. (1997) estudiaron los fosfolípidos y ácidos grasos de ambas formas, micelial y levadura, del hongo *P. variotii* con el resultado de la identificación de un nuevo ácido graso, el *neo-iso*-pentadecanoico.

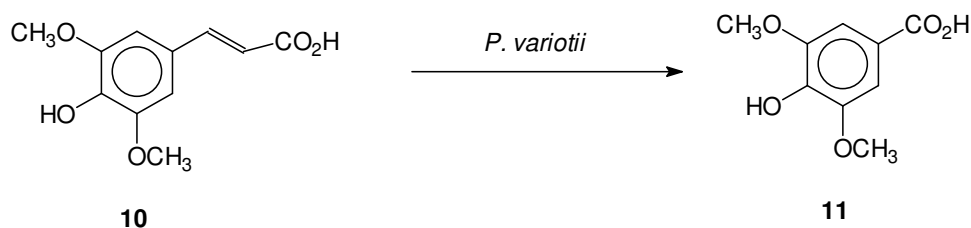
Terekhova y col. (1997) aislaron del caldo de cultivo de *P. variotii* el antibiótico de biogénesis mixta ascofuranona (9), el cual había sido aislado previamente de *Ascochyta visiae* Libert.

Finalmente, Babitskaya y Shcherba (2002) aportaron luz sobre la naturaleza de los pigmentos de melanina de *P. variotii*.



**Figura II-5.** Ascofuranona (**9**).

En cuanto a las aplicaciones biotecnológicas, Behera y col. (2000) encontraron que *P. variotii* es un hongo útil en la biotransformación del latex de *Calotropis procera* al enriquecerlo en heptano, por lo que se considera el proceso como una fuente renovable de petróleo y compuestos químicos. Por otra parte, Deodhar y col. (2002) han aplicado el hongo *P. variotii* en la biorreducción de terpenoides cíclicos y aldehídos aromáticos; Vanhulle y col. (2003) lo han aplicado para el tratamiento y detoxificación de líquidos de desecho - aguas residuales y fluidos agrícolas -; Sachan y col. (2006) lo aplicaron en la biotransformación del ácido p-coumarico; Mukherjee y col. (2006) en la transformación del ácido sináptico (**10**) en ácido siringico (**11**), feromona del coleóptero *Stenus comma*; Ghosh y col. (2006) lo utilizaron en la transformación del ácido ferúlico en ácido vanílico; Saad y Hamdy (2004) lo utilizaron para producir el enzima *Quitinasa*; y, finalmente, Battestin y Macedo (2007) lo utilizaron para producir el enzima *Tannasa*. En cuanto a aplicaciones agrícolas, Wagid y col. (2001) han aplicado el hongo en el control de la enfermedad que otro hongo, *Fusarium* sp. produce en el cultivo del tomate. El mecanismo de acción es, obviamente, la antibiosis.



**Figura II-6.** Biotransformación del ácido sináptico (**10**) en ácido siríngico (**11**).

## II-2. Objetivos de este trabajo

En este trabajo, como consecuencia de haber aislado del medio marino una cepa de *P. variotii*, clasificada por el Servicio de Identificación de *CABI Bioscience* (Surrey, UK) se han planteado los siguientes objetivos:

**II-2.1.** Producir a escala de laboratorio dicho hongo mediante su cultivo en agua de mar.

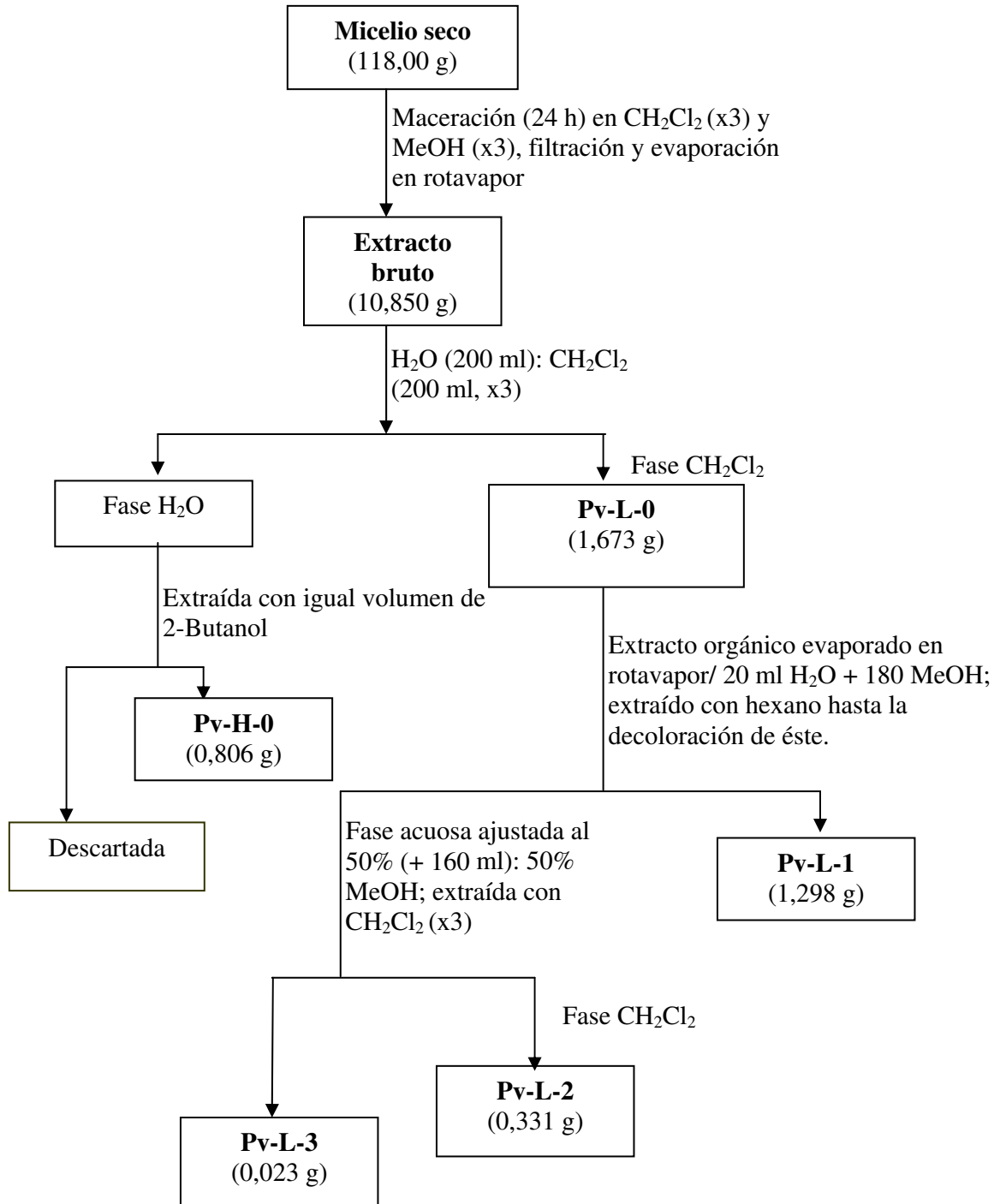
**II-2.2.** Realizar un estudio de los productos naturales que dicha cepa es capaz de biosintetizar en las mencionadas condiciones, realizando un minucioso barrido de sus fracciones liposolubles e hidrosolubles, tanto en lo que se refiere a sus componentes volátiles como a los que no lo son; todo ello en orden a encontrar factores quimiotaxonómicos que nos permitan correlacionarla con alguna de las cepas descritas en la bibliografía, esclareciendo si se trata de una cepa con aplicabilidad en nutrición - animal y humana -.

## II-3. Resultados y Discusión

### II-3.1. Obtención de biomasa, extracción y fraccionamiento

En lo que se refiere a la producción de la biomasa de *P. variotii*, comentar que la cepa fue aislada a partir de agua marina procedente del litoral Canario. Las colonias fueron aisladas y repurificadas a través de placas de Petri conteniendo el medio sólido KMV modificado (Tabla II-3). La producción de la biomasa fúngica se consiguió, en el caldo KMV modificado, en un sistema estático de cultivo, a escala de laboratorio. La biomasa miceliar sobrenadante se separó y

extraído (extracción sólido-líquido), y sus metabolitos se fraccionaron por polaridad mediante extracción líquido-líquido según la Figura II-7.



**Figura II-7.** Esquema de partición aplicado al extracto del micelio de *Paecilomyces variotii* por extracción líquido-líquido.



### II-3.2. Estudio químico del micelio

Después de extraer el caldo de cultivo y fraccionarlo según la Figura II-7, se rastrearon minuciosamente todas las fracciones por refraccionamiento (cromatografía en columna, cromatografía de exclusión por tamaño molecular, CCF) y análisis tanto por GC-MS para sus componentes volátiles como por espectroscopía (RMN, EM, IR), identificándose las siguientes sustancias:

#### II-3.2.1. Componentes volátiles en el micelio

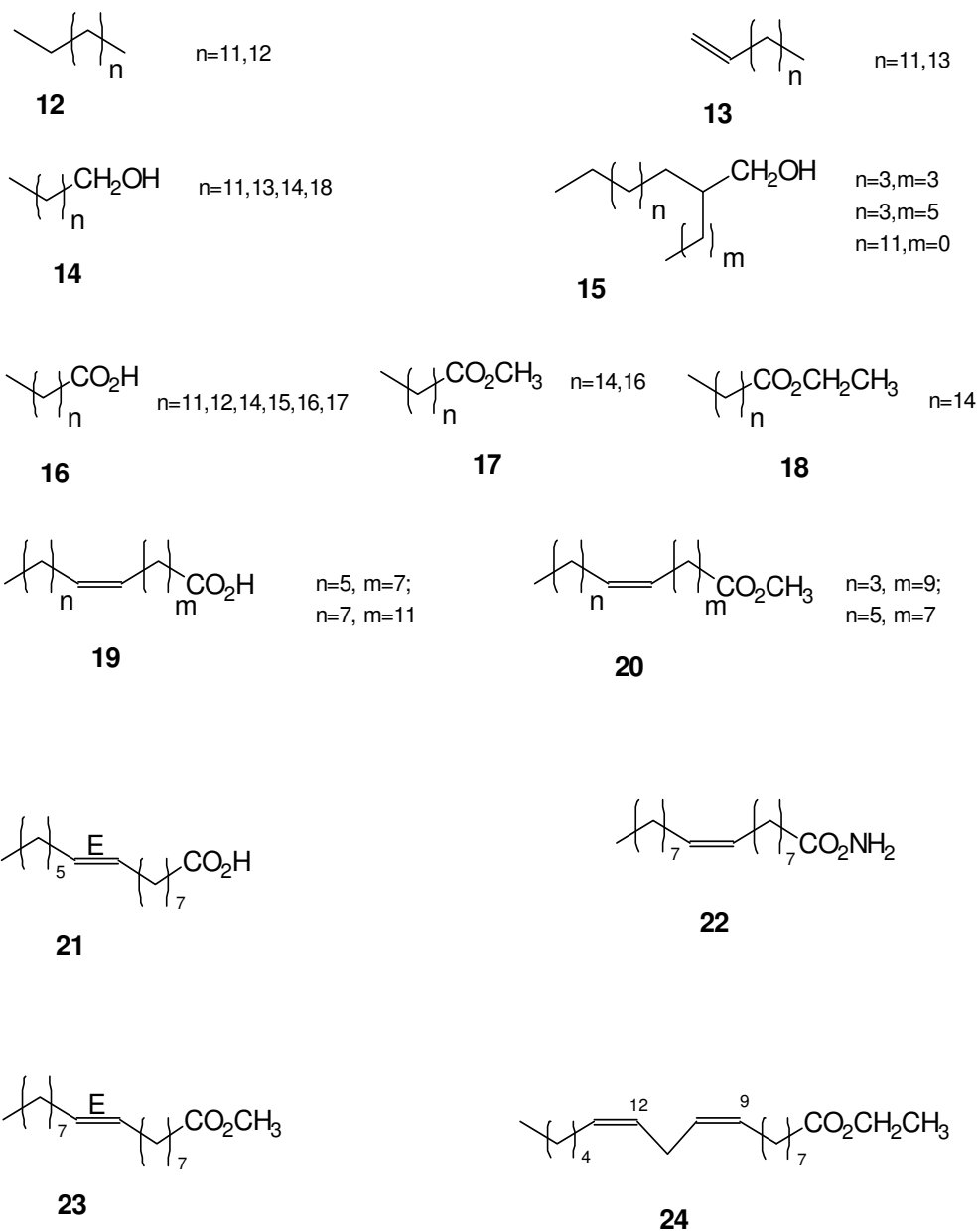
Se identificaron por GC-MS, lo que rindió los datos de la Tabla II-1. Si se reúnen dichas sustancias por criterios estructurales (Figuras II-8 hasta II-15) se puede deducir que se han identificado y cuantificado *n*-alcanos (**12**), 1-alquenos (**13**), 1-alcanoles (**14**), 2-alkil-1-alcanoles (**15**), ácidos grasos libres - saturados (**16**) e insaturados (**19, 21**) -, amidas de ácidos grasos (**22**), ésteres metílicos y etílicos de ácidos grasos - saturados (**17, 18, 25**) e insaturados (**20, 23, 24**) -, triglicéridos saturados (**27**), diglicéridos saturados (**28, 29**), ceras - ésteres de ácidos y alcoholes grasos (**30, 31 y 32**) -, éteres grasos (**33**), catabolitos lipídicos (**34, 35**), terpenos de cadena lineal (**36, 37**), hidrocarburos aromáticos de la ruta del ácido shikímico (**38**), diésteres de ácidos dicarboxílicos como maleatos (**40**) y ftalatos (**41, 42**), artefactos antioxidantes (**45 y 46**) y compuestos curiosos (**43 y 44**).

---

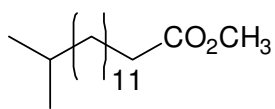
Ácido (Z)-13-docosenoico ( <i>erúxico</i> ) ( <b>19</b> ; <b>n= 7</b> , <b>m= 11</b> ; Tr= 19,800 ± 0,024)
Ácido heptadecanoico ( <b>16</b> ; <b>n= 15</b> ; Tr= 16,912)
Ácido hexadecanoico ( <b>16</b> ; <b>n=14</b> ; Tr= 16,249 ± 0,024)
Ácido 9-hexadecenoico ( <b>21</b> ; Tr= 14,759)
Ácido nonadecanoico ( <b>16</b> ; <b>n= 17</b> ; Tr = 17,722)
Ácido octadecanoico ( <b>16</b> ; <b>n= 16</b> ; Tr= 17,583)
Ácido (Z)-9-octadecenoico ( <i>oleico</i> ) ( <b>19</b> ; <b>n= 5</b> , <b>m= 7</b> ; Tr= 18,730)
Ácido tetradecanoico ( <b>16</b> ; <b>n= 12</b> ; Tr= 14,774 ± 0,001)
Ácido tridecanoico ( <b>16</b> ; <b>n= 11</b> ; Tr= 12,236 ± 0,006)
Benzoato de bencilo ( <b>38</b> ; Tr= 16,541)
2,4-Bis(1,1-dimetiletil)-fenol ( <b>45</b> ; Tr=14,397 ± 0,017)
N-Butil-bencensulfonamida ( <b>43</b> ; Tr= 16,699)
2-Butil-1-octanol ( <b>15</b> ; <b>n= 3</b> , <b>m= 3</b> ; Tr= 12,530 ± 0,008)
Di-isobutil éster del ácido hexanodioico ( <b>39</b> ; Tr= 15,607)
(E)-3,7-Dimetil-2,6-octadienal ( <b>36</b> ; Tr= 12,191)
1-Eicosanol ( <b>14</b> ; <b>n= 18</b> ; Tr= 16,358)
Éster etílico del ácido hexadecanoico ( <b>18</b> ; Tr= 17,719)
Éster etílico del ácido (Z,Z)-9,12-octadecadienoico ( <i>linoleico</i> ) ( <b>24</b> ; Tr= 18,596 ± 0,221)
Éster metílico del ácido hexadecanoico ( <b>17</b> ; <b>n= 14</b> ; Tr= 17,298 ± 0,006)
Éster metílico del ácido 11-hexadecenoico ( <b>20</b> ; <b>n= 3</b> , <b>m= 9</b> ; Tr= 17,144)
Éster metílico del ácido (Z)-9-hexadecenoico ( <b>20</b> ; <b>n= 5</b> , <b>m= 7</b> ; Tr= 17,604)
Éster metílico del ácido 14-metil-pentadecanoico ( <b>25</b> ; Tr= 17,261)
Éster metílico del ácido octadecanoico ( <b>17</b> ; <b>n= 16</b> ; Tr= 18,565 ± 0,007)
Éster metílico del ácido (E)-9-octadecenoico ( <b>23</b> ; Tr= 18,388)
Éster metílico del ácido 9-oxo-nonanoico ( <b>34</b> ; Tr= 13,676)
Ftalato de dietilo ( <b>41</b> ; Tr= 15,074 ± 0,007)
Ftalato de diisobutilo ( <b>42</b> ; Tr= 17,008 ± 0,001)
1-Hexadecanol ( <b>14</b> ; <b>n= 14</b> ; Tr= 16,339 ± 0,014)
1-Hexadeceno ( <b>13</b> ; <b>n= 13</b> ; Tr= 14,876)
1-(Hidroximetil)-1,2-etanodil éster del ácido hexadecanoico ( <b>28</b> ; Tr= 17,614 ± 0,019)
2-Hidroxil-1,3-propanodil éster del ácido hexadecanoico ( <b>29</b> ; Tr= 12,192)
2-Hidroxil-1-(hidroximetil)etil éster del ácido (Z,Z)-9,12-octadecadienoico ( <i>linoleico</i> ) ( <b>33</b> ; Tr= 18,817).
Hidroxitolueno butilado ( <b>46</b> ; Tr= 14,325 ± 0,010)
2-Hexil-1-octanol ( <b>15</b> ; <b>n= 3</b> , <b>m= 5</b> ; Tr= 14,386)
Maleato de diisooctilo ( <b>40</b> ; Tr= 18,705 ± 0,003)
2-Metil-1-hexadecanol ( <b>15</b> ; <b>n= 11</b> , <b>m= 0</b> ; Tr= 14,007 ± 0,007)
1-Metilnonil-benceno ( <b>44</b> ; Tr= 15,051)
9-Octadecenamida ( <b>22</b> ; Tr= 18,371 ± 0,004)
(Z,Z)-9-Octadecenil éster del ácido 9-hexadecenoico ( <b>30</b> ; Tr= 18,516)
Octadecil éster del ácido hexadecanoico ( <b>32</b> ; Tr= 17,887)
Oleato de decilo ( <b>31</b> ; <b>n= 0</b> ; Tr= 13,768)
Pentadecano ( <b>12</b> ; <b>n= 12</b> ; Tr= 14,280 ± 0,188)
1-Pentadecanol ( <b>14</b> ; <b>n= 13</b> ; Tr= 15,888)
1,2,3-Propanotriil éster del ácido docosanoico ( <b>27</b> ; Tr= 17,114)
Tetradecano ( <b>12</b> ; <b>n= 11</b> ; Tr= 13,262)
1-Tetradeceno ( <b>13</b> ; <b>n= 11</b> ; Tr= 12,438)
Tetradecil éster del ácido (Z)-9-octadecenoico ( <b>31</b> ; <b>n= 4</b> ; Tr= 19,818)
Trans-2-pentadecil-1,3-dioxan-5-il-éster del ácido hexadecanoico ( <b>47</b> ; Tr= 12,165)
1-Tridecanol ( <b>14</b> ; <b>n= 11</b> ; Tr= 14,670 ± 0,207)
2,6,10-Trimetiltetradecano ( <b>37</b> ; Tr= 14,001)
2-Undecanona ( <b>35</b> ; Tr= 12,369)

---

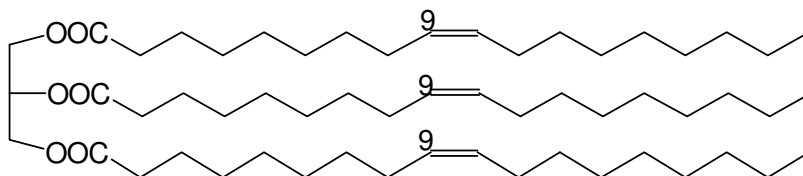
**Tabla II-1.** Componentes volátiles identificados en el micelio de *P. variotii* por GC-MS.



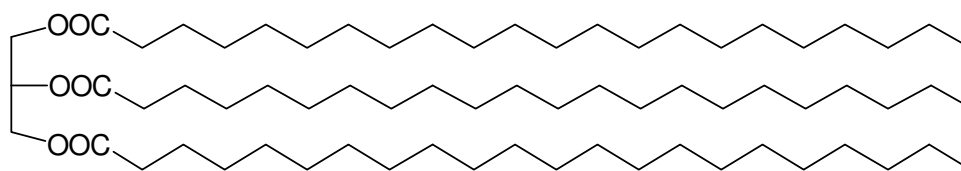
**Figura II-8.** Componentes lipídicos identificados en *Paecilomyces variotii*.



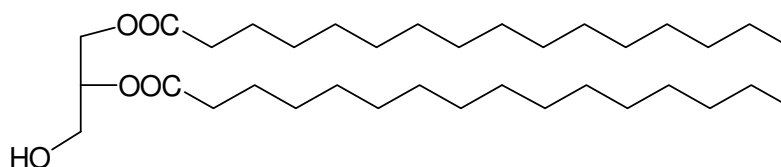
25



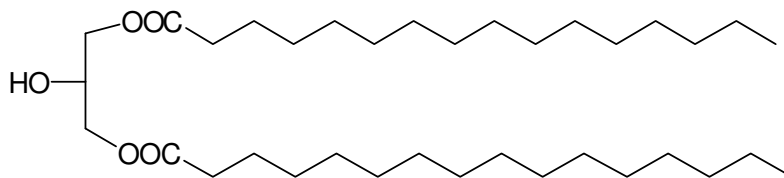
26



27

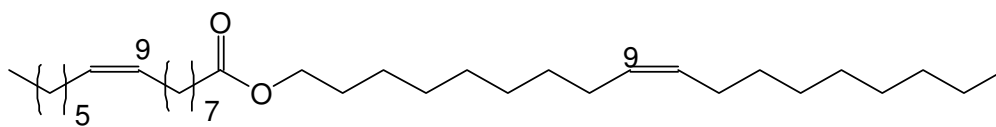


28

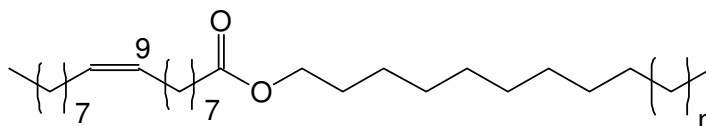


29

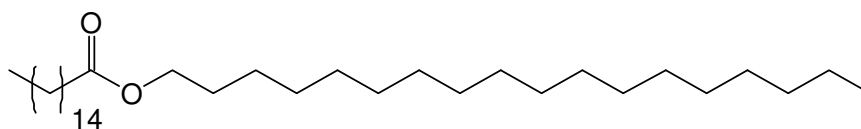
**Figura II-9.** Componentes lipídicos identificados en *Paecilomyces variotii*.



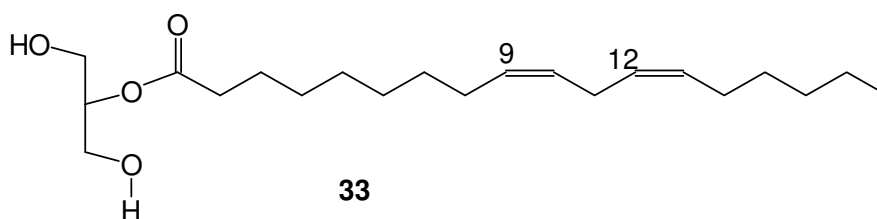
30



31 n=0,4

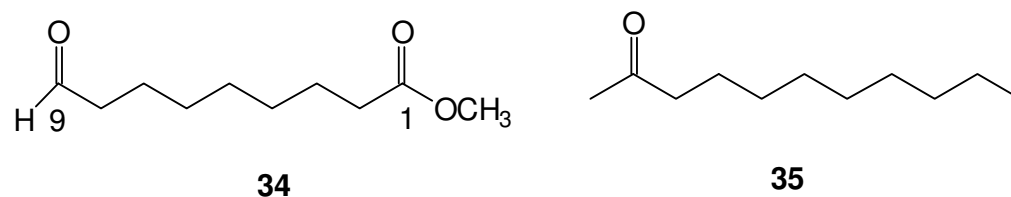


32

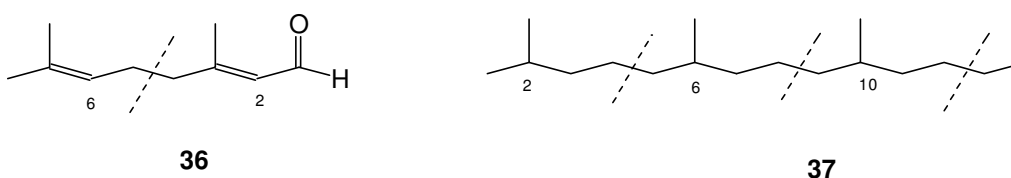


33

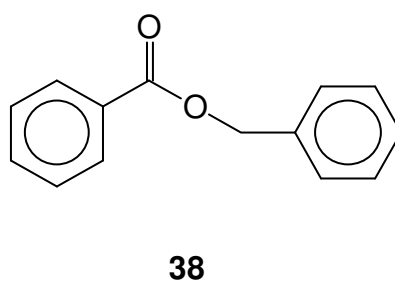
Figura II-10. Componentes lípidicos identificados en *Paecilomyces variotii*.



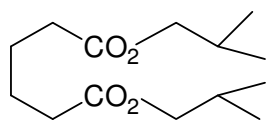
**Figura II-11.** Fragmentos lipídicos - catabolitos - identificados en *Paecilomyces variotii*.



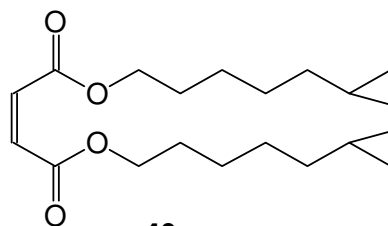
**Figura II-12.** Terpenoides identificados en *Paecilomyces variotii*.



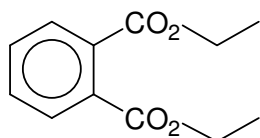
**Figura II-13.** Componente de la ruta del ácido shikímico identificado en *Paecilomyces variotii*.



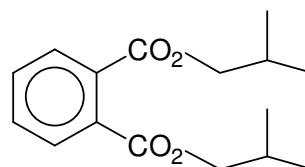
39



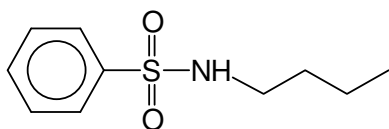
40



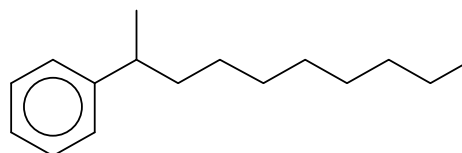
41



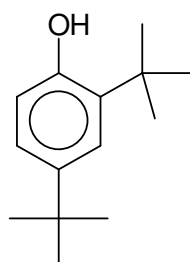
42



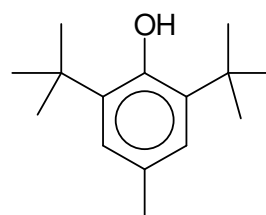
43



44

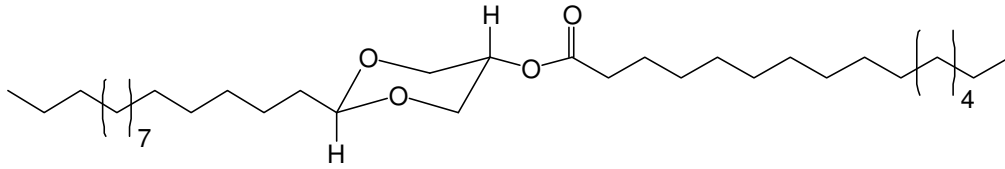


45



46

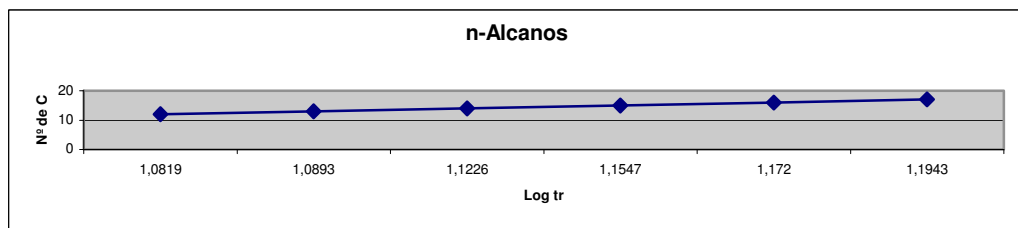
**Figura II-14.** Otros componentes identificados en el extracto del micelio de *Paecilomyces variotii*.



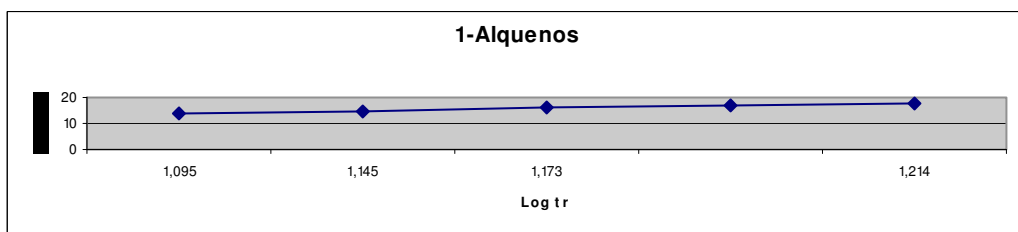
47

**Figura II-15.** Componentes lípidicos identificados en *Paecilomyces variotii*.

Obsérvese cómo las series homólogas de los componentes volátiles identificados se comportan de forma lineal en los gráficos que resultan de representar el tamaño de la cadena hidrocarbonada (Nº de C) frente al logaritmo del tiempo de retención en GC (log Tr) (Figuras II-16 a II-20).

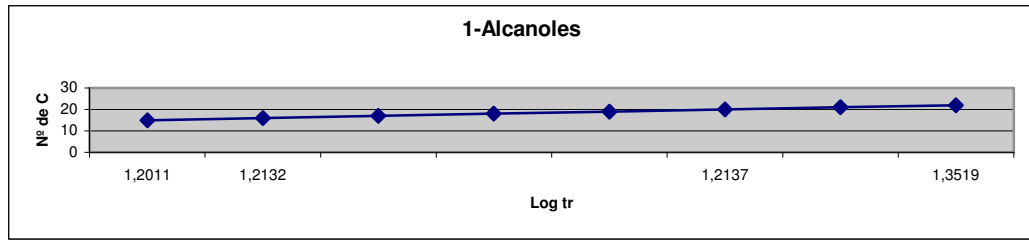


**Figura II-16.** n-Alcanos identificados en *Paecilomyces variotii* y patrones.

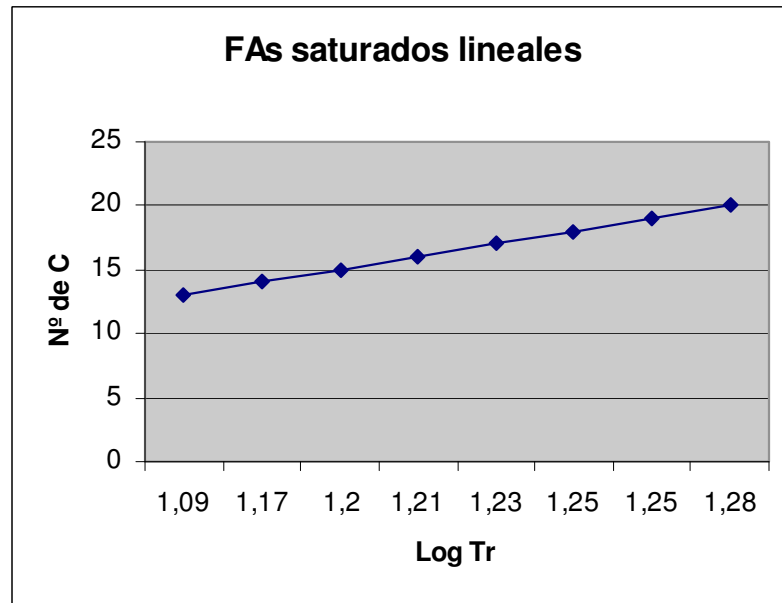


**Figura II-17.** 1-Alquenos identificados en *Paecilomyces variotii* y patrones.

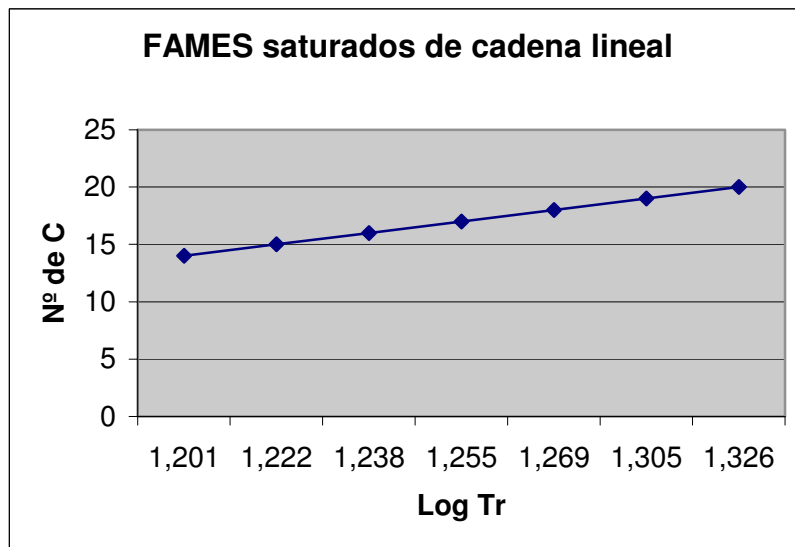




**Figura II-18.** 1-Alcanoles identificados en *Paecilomyces variotii* y patrones.



**Figura II-19.** Ácidos grasos saturados de cadena lineal identificados en *Paecilomyces variotii* y patrones.



**Figura II-20.** Ésteres metílicos de ácidos grasos saturados de cadena lineal identificados en *Paecilomyces variotii* y patrones.

### II-3.2.1.1. Presencia de ésteres metílicos de ácidos grasos ramificados en el micelio

Los ácidos grasos metilramificados están ampliamente distribuidos en la naturaleza (Duncan y col., 1974; Perry y col., 1979; Seyama y col., 1983; Thiel y col., 1999; Carballeira y col., 2001; Nechev y col., 2002). Ahora se sabe que se forman por incorporación selectiva del metilmalonil-CoA por el enzima “ácido-graso-sintetasa” y que este paso biogénico es característico de bacterias que producen relativamente altas concentraciones de estos ácidos grasos *iso*-metilramificados, los cuales son, por tanto, aceptados como marcadores moleculares de la materia orgánica de origen bacteriano (Leo y Parker, 1966; Cooper y Blumer, 1968, Cranwell, 1973, 1974; Grimalt y Albaigés, 1990, Kaneda, 1991; Carballeira y col., 2001). Es por ello que la identificación en *P. variotii* del éster metílico del ácido 14-metilpentadecanoico **25** - derivado de un ácido graso *iso*-metilramificado -, es un indicio de la presencia de bacterias del genero *Mycobacterium* asociadas a este hongo (Lambert y col., 1986; Chou y col., 1996, Carballeira y col., 2001; Nechev y col., 2002). Aparte de su identificación por la huella dactilar en GC-MS, la *iso*-metilsustitución propuesta en **25** se confirmó por el fragmento relativamente intenso que se observa en GC-MS para  $M^+$ -43 ( $m/z$  227) junto a la disminución de la intensidad del fragmento  $M^+$ -29 ( $m/z$  241) (Andersson, 1978).

### II-3.2.1.2. Presencia de ftalatos de dialquilo en el micelio

El ftalato de bis-(2-etilhexilo) se ha propuesto anteriormente como un auténtico metabolito en el hongo *Penicillium olsonii* (Amade y col., 1994). Sin embargo, esta sustancia, conocida tanto por las siglas internacionales DEHP {di(2-ethylhexyl)phthalate} como DOP (dioctylphthalate), se usa ampliamente como plasticida del PMMA {poly(methyl methacrylate)} y el PVC {poly(vinyl chloride)}. Esta sustancia emigra de los materiales plásticos y se introduce en los fluidos biológicos donde se bioacumula con el paso del tiempo, fenómeno que ha provocado incluso problemas de salud en seres humanos que han estado expuestos a materiales plásticos (Freemantle, 2004). Es por ello que la identificación de las sustancias **41** y **42**, en el micelio de *P.*

*variotii* plantea dudas sobre su origen debido a que el cultivo masivo se realizó, precisamente, en recipientes de plástico (veáse parte experimental). Así, pués, se supone que estas sustancias son artefactos o productos de transformación de los mismos.

### II-3.2.2. Componentes no volátiles identificados en el micelio de *P. variotii*

El material “no volátil” obtenido a partir del micelio fue fraccionado y analizado por espectroscopía (fundamentalmente RMN en una y dos dimensiones, IR y EM). Entre estos componentes lipídicos no volátiles se pudieron purificar y caracterizar sólo las sustancias mayoritarias: *trioleína* (**26**), *peróxido del ergosterol* (**48**) y D-(+)-glucosa.

La *trioleína* (**26**) se aisló pura a partir de una de las fracciones menos polares del extracto del micelio como un aceite amarillento. En su espectro de IR se observan bandas a 3029, 3007, 1653 (CH=CH), a 1739 (C=O) y a 1233 (C-O) características de ésteres insaturados.

En su espectro de  $^1\text{H}$ -RMN se observan seis protones olefínicos a  $\delta$  5,31- 5,25; cinco protones geminales a oxígeno a  $\delta$  5,22 (1H; dt; J= 5,2 Hz; J= 6,4 Hz);  $\delta$  4,26 (2H; dd; J= 5,2 Hz; J= 13,1 Hz) y  $\delta$  4,11 (2H; dd; J= 6,4 Hz; J= 13,1 Hz); seis hidrógenos en alfa a carbonilo a  $\delta$  2,27; doce hidrógenos alílicos a  $\delta$  2,01; seis hidrógenos en beta a carbonilo a  $\delta$  1,61; sesenta hidrógenos de cadenas hidrocarbonadas lineales a  $\delta$  1,27 y nueve hidrógenos de los metilos terminales a  $\delta$  0,90.

En su espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN se observan tres señales correspondientes a carbonilos de ésteres a  $\delta$  173,30; 173,20 y 172,80; carbonos que conforman dobles enlaces a  $\delta$  130,20; 130,00; 129,90; 129,70 y 129,60; carbonos enlazados a oxígeno a  $\delta$  68,90 y 62,10 -x2- y señales típicas de metilenos y metilos a  $\delta$  34,2- 14,0 características de cadenas hidrocarbonadas lineales.

En el espectro  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY se observa correlación entre el dt a  $\delta$  5,22 y los dos dd a  $\delta$  4,26 y 4,11 correspondientes a los protones geminales a oxígeno de la unidad de glicerol. También entre los protones olefínicos a  $\delta$  5,27 y los metilenos alílicos a  $\delta$  2,01.

En el espectro HSQC se observa correlación entre el dt a  $\delta$  5,22 correspondiente al metino geminal a oxígeno de la unidad de glicerol y el carbono enlazado a dicho oxígeno a  $\delta$  68,90. También entre los dos dd a  $\delta$  4,26 y 4,11 correspondientes a los protones metilénicos geminales a oxígeno de la misma unidad de glicerol y los carbonos enlazados a dichos oxígenos, que aparecen ambos a  $\delta$  62,10. También entre un triplete a  $\delta$  2,27 correspondiente a los protones en  $\alpha$  a carbonilo y los carbonos en  $\alpha$  a carbonilo a  $\delta$  34,15. También entre un multiplete a  $\delta$  2,01 correspondiente a los protones alílicos y los carbonos en  $\alpha$  a doble enlace a  $\delta$  27,20.

En el espectro HMBC se observa correlación entre los protones en  $\alpha$  a carbonilo a  $\delta$  2,27 y los carbonos de metilenos saturados a  $\delta$  25,60 y 29,60. También se observa correlación entre el dt a  $\delta$  5,22 correspondiente al metino geminal a oxígeno de la unidad de glicerol y los carbonos metilénicos de dicha unidad de glicerol a  $\delta$  62,10 por un lado y uno de los carbonilos de los ésteres a  $\delta$  172,80. También entre los dos dd a  $\delta$  4,26 y 4,11 correspondientes a los protones metilénicos geminales a oxígeno de la unidad de glicerol y los tres carbonos - metínico y metilénicos - enlazados a oxígeno en dicha unidad a  $\delta$  68,90 y 62,10 respectivamente, así como con los carbonos carbonílicos a 173,30 y 173,20 (correlaciones a dos y tres enlaces de la unidad de glicerol). También entre los protones alílicos a  $\delta$  2,01 y los carbonos olefínicos a  $\delta$  130,20; 130,00; 129,90; 129,70; 129,60. También entre los dos dd a  $\delta$  4,26 y 4,11 correspondientes a los protones geminales a oxígeno y los tres carbonos carbonílicos de los ésteres a  $\delta$  173,30; 173,20 y 172,80.

Otra sustancia que se pudo aislar y caracterizar espectroscópicamente es el 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -epidioxiergosta-6,22-dien-3 $\beta$ -ol (**48**), a la que se denomina usualmente como *peróxido del ergosterol*. El producto, que cristaliza a partir de metanol, posee un punto de fusión de 178- 180 °C. Su espectro de masas (con NaCl) muestra un pico correspondiente al ión molecular más H<sup>+</sup> a m/z 429,1 (C<sub>28</sub>H<sub>45</sub>O<sub>3</sub>); en este espectro se observan, además, iones a m/z 451,1 (M+Na)<sup>+</sup> y 879,4 (2M+Na)<sup>+</sup>, ello en consistencia con la fórmula molecular C<sub>28</sub>H<sub>44</sub>O<sub>3</sub>.

En el espectro IR aparece una señal estrecha a  $3618\text{ cm}^{-1}$  y otra ancha en el intervalo  $3600\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$  correspondientes ambas a un grupo hidroxilo (libre y asociado respectivamente) y una banda a  $973\text{ cm}^{-1}$  característica de un doble enlace *trans* en C-22 de un ergosteroide (González y col., 1983).

El espectro de  $^1\text{H}$ -RMN muestra dos doble dobletes centrados en  $\delta$  5,12 y 5,08 característicos del mencionado doble enlace en posición 22 sobre la cadena lateral del ergosterol. La constante de acoplamiento de 15,2 Hz entre los protones olefínicos en C-22 y C-23 confirma que la estereoquímica de este doble enlace es en efecto, *trans*. También se observa un sistema AB achacable a un doble enlace *cis* centrado en  $\delta$  6,33 ( $\delta_A$  6,46 y  $\delta_B$  6,20 con  $J_{AB} = 8,6$  Hz). El alto desplazamiento de estos protones es característico de un puente endoperóxido entre los carbonos 5 y 8 de los ergosteroides. Dicho puente de oxígeno se confirma en el espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN (Tabla II-2) con las señales a  $\delta$  82,170 y 79,453 que se ha asignado a los carbonos 5 y 8 respectivamente. Obsérvese que el resto de las señales desplazadas en los espectros de protón y de carbono (Tabla II-2), junto con las constantes de acoplamiento, son consistentes con la estereofórmula **48** (Figura II-21).

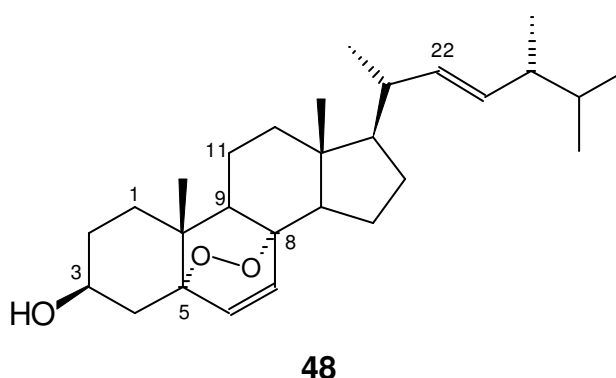
Por otra parte, en el espectro DEPT<sub>135</sub> se desplazan señales positivas para 6  $\text{CH}_3$ , 7  $\text{CH}$  y 4  $=\text{CH}$ , así como negativas para 7  $\text{CH}_2$ .

En el espectro  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY se observa correlación entre sí para los protones olefínicos que conforman el sistema AB a  $\delta$  6,46 y 6,20, así como entre los protones olefínicos en C-22 y C-23 y los metinos alílicos sobre C-20 ( $\delta$  2,00) y C-24 ( $\delta$  1,82).

En el espectro HSQC se observa correlación entre los dos protones olefínicos centrados en  $\delta$  6,46 y 6,20 y los dos carbonos olefínicos directamente enlazados a ellos que desplazan señales en  $\delta$  130,784 y 135,442 respectivamente. Esto es, el H sobre C-7 y el propio C-7 por un lado y el H sobre C-6 con el propio C-6 por otro. Ello confirma que el doble enlace *cis* se encuentra, en efecto, entre los carbonos 6 y 7. También se observa correlación entre los dos protones olefínicos centrados en  $\delta$  5,12 y 5,08 y los dos carbonos olefínicos directamente enlazados a ellos que

desplazan señales en  $\delta$  132,337 y 135,240, o sea, el H sobre C-23 y el propio C-23 por un lado y el H sobre C-22 y el propio C-22 por otro.

En el espectro HMBC se observa correlación entre los dos protones olefínicos del sistema AB en C-7 ( $\delta$  6,46) y C-6 ( $\delta$  6,20) y los dos carbonos puente del endoperóxido (C-8 a  $\delta$  79,453 y C-5 a  $\delta$  82,170). Ello confirma la presencia del puente *epidioxi* característico de endoperóxidos esteroidales. También entre los dos protones olefínicos en C-22 ( $\delta$  5,08) y C-23 ( $\delta$  5,12) y los carbonos vecinales C-20 ( $\delta$  39,767) y C-24 ( $\delta$  42,794) respectivamente.



**Figura II-21.** 5 $\alpha$ , 8 $\alpha$ -Epidioxiergosta-6,22-dien-3 $\beta$ -ol (*Peróxido del ergosterol*)

En la fracción más polar de *P. variotii* se encontró además un compuesto polihidroxfílico cuyo espectro de  $^1\text{H-RMN}$  sugiere una estructura de monosacárido { $\delta$  5,10 (1H, m, protón anomérico);  $\delta$  3,90- 3,20 (6H, m,  $\text{CH}+\text{CH}_2$  geminales a oxígeno);  $\delta$  2,16 (0,25 H, s,  $\text{OH}$ )}. Mediante un análisis de esta fracción por HPLC con una columna Shodex OH Pak SB806 HQ se dedujo que está constituida fundamentalmente por *D-(+)-glucosa*, la cual había sido introducida como constituyente del caldo de cultivo KMV modificado (Tabla II-3).

C	$\delta$ ( $^{13}\text{C}$ )	$\Delta$ ( $^1\text{H}$ )
18	12,890	0,771 (3H, s)
28	17,579	0,863 (3H, d, J= 6,8 Hz)
19	18,185	0,839 (3H, s)
21	19,660	0,954 (3H, d, J= 6,4 Hz)
26	19,970	0,772 (3H, d, J= 6,8 Hz)
27	20,653	0,788 (3H, d, J= 6,4 Hz)
11	20,902	
15	23,417	
4	28,665	
16	29,721	
2	30,140	
25	33,075	
1	34,705	3,45 (1H, s); 2,10- 1,15 (18 H, m)
10	36,972	
12	39,363	
20	39,767	2,00 (1H, m)
24	42,794	1,82 (1H, m)
13	44,580	3,45 (1H, s)
9	51,101	
14	51,707	
17	56,209	
3	66,504	3,94 (1H, m)
8	79,453	
5	82,170	
7	130,784	6,46 (1H, d, J= 8,60 Hz), sist. AB
23	132,337	5,12 (1H, dd, J= 7,5; 15,2)
22	135,240	5,08 (1H, dd, J= 8,0; 15,2)
6	135,442	6,20 (1H, d, J= 8,60 Hz), sist. AB

**Tabla II-2.** Espectros ( $^{13}\text{C}$ -RMN y  $^1\text{H}$ -RMN,  $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) del peróxido del ergosterol aislado de *P. variotii* (48).

## II-4. Conclusiones

1. Se ha aislado del medio marino una nueva cepa de *Paecilomyces variotii*.
2. Se ha producido, a escala de laboratorio, la biomasa de *Paecilomyces variotii* necesaria para su estudio químico.
3. Se identificaron 46 grupos estructurales entre sus componentes volátiles (Tabla II-1, Figuras II-8 a II-20) que, mayoritariamente, son componentes lipídicos usuales implicados en la ruta de los ácidos grasos (Figuras II-8, II-9, II-10 y II-15), fragmentos del catabolismo de los mismos (Figura II-11), terpenoides (Figura II-12) y un metabolito de la ruta del ácido shikímico (Figura II-13). La mayor parte de estos componentes se describen aquí por primera vez para la especie *P. variotii*.
4. Se aislaron e identificaron espectroscópicamente dos componentes no volátiles, que se describen aquí por primera vez para la especie *P. variotii*, a saber, *oleína (26)* y *peróxido del ergosterol (48)*.
5. Se ha descubierto, pues, una cepa inusual de *P. variotii* que no produce micotoxinas y paralelamente aporta importantes nutrientes, siendo por tanto, potencialmente aplicable al campo de la alimentación funcional - animal o humana -.
6. Se ha desarrollado un bioproceso para producir industrialmente el *Peróxido del ergosterol (48)*.



## II-5. Experimental

### II-5.1. General

La cromatografía en columna en fase normal se realizó sobre gel de sílice de la casa Scharlau de 0,06- 0,2 mm (cabezas cromatográficas) y 0,04- 0,06 mm (adsorbentes en fase húmeda), tanto a media presión (sistema para cromatografía Buchi) como a baja presión (motores de Fluid Metering Inc. acoplados en serie a columnas de la marca Ace Glass Inc.). La cromatografía en columna en fase reversa se realizó mediante columnas LiChroprep RP-18 (40-63  $\mu\text{m}$ ) integradas en circuitos para cromatografía a baja presión, basados en motores de Fluid Metering Inc.

La filtración a través de gel (cromatografía de exclusión por tamaño molecular) se realizó por gravedad a través de Sephadex LH-20 lipofílico. El polvo LH-20 se empaquetó en la columna con metanol, lavándose con el mismo disolvente durante 2 h. Luego se acondicionó con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : Metanol (1: 1) durante otras 2 h. Los extractos se aplicaron en la cabeza de la columna y se eluyeron con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : MeOH (1: 1).

La cromatografía en capa fina en fase normal se realizó sobre capas de 0,25 mm de espesor de la marca Tracer Analítica con mezclas de hexano, acetato de etilo, cloroformo y metanol en las proporciones que se especifican en cada caso. La cromatografía en capa fina en fase reversa se realizó sobre capas RP-18F<sub>254</sub> de 0,25 mm de espesor de la marca Merck con mezclas de acetonitrilo: metanol: agua (80: 18: 2). En todos los casos, el revelado de las mismas se realizó por pulverización con oleum (ácido sulfúrico al 4 %, ácido acético al 80 % y agua al 16 %) y calentándolas a 120 °C durante 20 min.

La cromatografía HPLC semipreparativa se realizó bajo las siguientes condiciones: columna Waters ODS (4,6 x 250 mm, con partículas de 10  $\mu\text{m}$  y tamaño de poro de 100 Å) para las separaciones en fase reversa, y una Alltech Econosphere de  $\text{SiO}_2$  (4,6 x 250 mm, con partículas de 10  $\mu\text{m}$  y tamaño de poro de 100 Å) para las separaciones en fase normal. Ambas, en un aparato HPLC semipreparativo compuesto por una bomba isocrática Spectraphysics P100 y un detector UV Hewlett Packard 1050 de longitud de onda variable. En todos los casos se trabajó a temperatura ambiente (26 °C).

La cromatografía HPLC analítica se realizó en un aparato Shimadzu, modelo LC-9A, con un detector UV de la misma marca a 254 nm y un detector de índice de refracción asociado en serie. Las condiciones usadas fueron, bien una columna en fase normal con mezclas de *n*-hexano y acetato de etilo como eluyente a un flujo de 1,0 ml/ min., bien una columna Shodex OH Pak SB 806 HQ con agua con un 0,05 % de azida sódica como eluyente, también a un flujo de 1,0 ml/ min.

Los espectros infrarrojos se realizaron en un espectrofotómetro Shimadzu modelo FTIR-8400S. Como disolvente se utilizó cloroformo para espectroscopía de la casa Merck. Los espectros realizados en película se obtuvieron con ventanas de cloruro sódico. El calibrado del aparato se verificó con la banda a 1603  $\text{cm}^{-1}$  del poliestireno.

Los datos espectroscópicos de RMN fueron proporcionados por aparatos de resonancia magnética nuclear, del tipo Bruker AC a 250 MHz, otro de tipo Bruker AMX a 300 MHz y mediante una unidad Varian Inova de 400 MHz. Se utilizó tetrametilsilano como referencia interna en los espectros de protón y cloroformo deuterado ( $\delta$  77,00) o metanol deuterado ( $\delta$  49,00) de la casa Aldrich para calibrar los espectros de carbono 13.

La espectrometría de masas se realizó tanto a baja como a alta resolución mediante las técnicas de ionización por impacto electrónico (IE) o ionización por bombardeo con átomos rápidos (FAB) a 70 eV en un espectrómetro de masas FISIONS VG Micromass, modelo VG Autospec. En el caso de los FAB (modo positivo) se utilizó como matriz el alcohol 3-nitrobenzílico.

Los puntos de fusión se realizaron en un aparato Gallenkamp, y están sin corregir.

La cromatografía analítica en fase gaseosa (GC-MS) se realizó en un aparato Saturn de Varian en las siguientes condiciones: columna CP-Sil 8 Low bleed, temperatura del inyector de 270 °C durante 10 min.; condiciones de split inicial *on*; 0,01 min. *off* y 5 min. *on*; horno programado a 50 °C durante 5 min., calentado a 15 °C/ min. hasta 250 °C y mantenido a esta temperatura durante 10 min. (tiempo total de análisis de 28,33 min. para cada muestra); flujo de 1 ml/ min.; detector de masas en modo EI (rango de  $m/z$  de 20 a 400).

## II-5.2. Aislamiento e identificación de la cepa

El hongo fue aislado a partir de muestras de agua marina colectada en la playa de La Laja, Las Palmas de Gran Canaria, en pozas de marea ubicadas sobre una zona de afloramiento rocoso, donde se observa la presencia constante de sedimentos, detritus y restos vegetales en descomposición. El proceso de aislamiento y purificación de la cepa se ha realizado en el laboratorio de Química Orgánica II de la ULPGC a través de placas de Petri (Figura II-22) en un medio sólido KMV modificado (Tabla II-3). El hongo *Paecilomyces variotii* fue identificado por el Dr. Lawrence de CABI Bioscience, Surrey (UK) conforme al Anexo 1 de esta memoria de Tesis. Un ejemplar de la cepa se encuentra depositado en el citado laboratorio de Química Orgánica II, Departamento de Química de la ULPGC.

KMV		KMV modificado	
Água marina (35 g/ l)	1,0 l	Água marina (35 g/ l)	1,0 l
Gelatina hidrolizada	1,0 g	Gelatina hidrolizada	1,0 g
Glucosa	5,0 g	Glucosa	5,0 g
Peptona	0,1 g	Peptona	1,0 g
Extracto de levadura	0,1 g	Extracto de levadura	1,0 g
Ágar bacteriológico <sup>1</sup>	12,0 g	Ágar bacteriológico <sup>1</sup>	12,0 g

<sup>1</sup> Usado para la preparación del medio sólido

**Tabla II-3.** Composición del medio de cultivo KMV utilizado para organismos heterotróficos y el KMV modificado.



**Figura II-22.** Aislamiento y purificación de la cepa de *Paecilomyces variotii*.

### II-5.3. Cultivo masivo del hongo

La producción de la biomasa fúngica se realizó en un sistema estático de cultivo, en cajas de plástico de (83 x 46 x 18) cm, conforme a las cajas de tapa azul de la Figura II-23 previamente lavadas con detergente, esterilizadas con hipoclorito sódico y aclaradas, boca abajo, con corriente de vapor de agua. Una vez enfriadas y escurrido el vapor condensado se les introdujo el caldo de cultivo con la cepa del hongo previamente inoculada. El medio utilizado para la producción fúngica fue el caldo KMV modificado (Tabla II-3), el cual fue previamente esterilizado en una autoclave (20 min.) y repartido en varias cajas (2 l por caja). Tras 10 días de cultivo, la parte sólida sobrenadante fue separada por filtración y desecada bajo radiación IR (de cada 2 l de KMV modificado, a 22- 25 °C, se obtuvieron 39,20- 51,00 g de material húmedo o 3,99- 5,56 g de material seco).



**Figura II-23.** Vista del cultivo masivo de *Paecilomyces variotii* en el laboratorio de la ULPGC (cajas de tapa azul).

### II-5.4. Estudio químico del micelio

Se obtuvieron en total 1110,65 g de micelio húmedo que, por desecación bajo lámparas IR, supusieron 118,00 g de micelio seco. Este se extrajo por maceración en diclorometano (x3, 24 h c/ u, temperatura ambiente) y metanol (x3, 24 h c/ u, temperatura ambiente). Después de la filtración, evaporación y desecación - a vacío - se obtuvieron 10,850 g de extracto bruto - aceite marrón -. Por CCF analítica (hexano: AcOEt, 80: 20) se observan al menos seis sustancias mayoritarias.

El espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de esta mezcla de sustancias informó de la presencia de protones olefínicos ( $\delta$  5,40- 5,00), protones geminales a heteroátomos ( $\delta$  4,40- 3,20) y de cadenas hidrocarbonadas típicas ( $\delta$  3,00- 0,80), lo cual delata presencia de componentes lipídicos.

El espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN, de esta mezcla de sustancias informó de la presencia de carbonos carbonílicos ( $\delta$  180,00- 170,00), carbonos olefínicos ( $\delta$  142,00- 125,00), carbonos unidos a heteroátomos ( $\delta$  90,00- 68,00) y de cadenas hidrocarbonadas típicas ( $\delta$  64,00- 14,00) que también delatan presencia de componentes lipídicos.

Una muestra del extracto bruto se sometió a análisis GC-MS, identificándose las siguientes sustancias:

(E)-3,7-Dimetil-2,6-octadienal (**36**; Tr= 12,191)  
1-Tetradeceno (**13**; **n= 11**; Tr= 12,438)  
2-Butil-1-octanol (**15**; **n= 3**, **m= 3**; Tr= 12,528)  
Hidroxitolueno butilado (**46**; Tr= 14,321)  
Pentadecano (**12**; **n= 12**; Tr= 14,372)  
Ácido tetradecanoico (**16**; **n= 12**; Tr= 14,773)  
1-Hexadeceno (**13**; **n= 13**; Tr= 14,876)  
Ftalato de dietilo (**41**; Tr = 15,071)  
1-Pentadecanol (**14**; **n= 13**; Tr= 15,888)  
N-Butil-bencensulfonamida (**43**; Tr= 16,699)  
Ftalato de diisobutilo (**39**; Tr= 17,009)  
Éster metílico del ácido hexadecanoico (**17**; **n= 14**; Tr= 17,292)  
9-Octadecenamida (**22**; Tr= 18,367)  
Éster metílico del ácido octadecanoico (**17**; **n= 16**; Tr= 18,558)  
Tetradecil éster del ácido (Z)-9-octadecenoico (**31**; **n= 4**; Tr= 19,818)

El resto del material se sometió al esquema de partición descrito en la Figura II-7. Así, se disolvió en 200 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y sometió a reparto en un embudo de decantación con otros 200 ml de H<sub>2</sub>O. La fase orgánica se separó y la acuosa se reextrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (x3). Las fases orgánicas se reunieron y el disolvente se eliminó en rotavapor para dar 1,673 g de la fracción liposoluble bruta (**Pv-L-0**). La fase acuosa residual se denominó "hidrosoluble bruta" (**Pv-H-0**), y se obtuvo a partir de la acuosa por reextracción con 2-butanol.

### **Estudio de la fracción liposoluble bruta (Pv-L-0)**

En su espectro de <sup>1</sup>H-RMN se observan protones olefínicos, δ 5,20- 5,10; geminales a heteroátomos, dos dd a δ 4,40- 4,00 característicos de triglicéridos y metilenos/ metilos de cadenas hidrocarbonadas a δ 2,80- 0,60.

En el espectro de <sup>13</sup>C-RMN se observan: carbonos carbonílicos a δ 180,00- 175,00; carbonos olefínicos a δ 142,00- 115,00; geminales a heteroátomos a δ 75,00- 60,00 y metilenos/ metilos de cadenas hidrocarbonadas a δ 58,00- 12,00; todo ello en consistencia con la posible presencia de triglicéridos insaturados.

Una muestra de esta fracción, **Pv-L-0**, se sometió a análisis GC-MS, identificándose las siguientes sustancias:

*Trans*-2-pentadecil-1,3-dioxan-5-il-éster del ácido hexadecanoico (**47**; Tr= 12,165)  
Ácido tridecanoico (**16**; **n= 11**; Tr= 12,242)  
Oleato de decilo (**31**; **n= 0**; Tr= 13,768)  
2,6,10-Trimetiltetradecano (**37**; Tr= 14,001)  
Hidroxitolueno butilado (**46**; Tr= 14,323)  
1-Tridecanol (**14**; **n= 11**; Tr= 14,875)  
Ftalato de dietilo (**41**; Tr= 15,081)  
Ácido hexadecanoico (**16**; **n= 14**; Tr= 16,272)  
Éster metílico del ácido hexadecanoico (**17**; **n= 14**; Tr= 17,303)  
1-(Hidroximetil)-1,2-etanodiil éster del ácido hexadecanoico (**28**; Tr= 17,633)  
Ácido nonadecanoico (**16**; **n= 17**; Tr= 17,722)  
Octadeciléster del ácido hexadecanoico (**32**; Tr= 17,887)  
Éster metílico del ácido octadecanoico (**17**; **n= 16**; Tr= 18,572)

El resto del material **Pv-L-0** se repartió en tres subfracciones, a saber: **Pv-L-1**, **Pv-L-2** y **Pv-L-3**. Para ello, a la fracción **Pv-L-0**, concentrada en rotavapor, se le añadieron 20 ml de agua y 180 ml de metanol. Esta mezcla se extrajo con hexano hasta que éste se obtuvo incoloro. Los extractos hexánicos reunidos se evaporaron para dar 1,298 g de un sólido marrón que se denominó **Pv-L-1**. A la fase acuosa-metanólica resultante de la separación anterior se le añadieron 160 ml de agua para obtener una fase con el 50 % de agua y 50 % de metanol que se reextrajo con diclorometano (x3, 200 ml). Las fases orgánicas reunidas se evaporaron, lo que rindió 0,331 g de un aceite marrón que denominamos fracción **Pv-L-2**. A la disolución acuosa-metanólica resultante se le añadió más metanol y evaporó en rotavapor para dar un aceite (0,023 g) que se denominó fracción **Pv-L-3**.

### Estudio de la fracción liposoluble -1 (Pv-L-1)

Supuso 1298 mg de un sólido marrón que, por filtración a través de Sephadex (LH-20, lipofílico, MeOH: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1: 1) y CCF (en fase reversa, MeOH: H<sub>2</sub>O, 98: 2) dió dos subfracciones: **Pv-L-1-a** (457 mg) y **Pv-L-1-b** (316 mg).

### Estudio de la fracción Pv-L-1-a

Por CCF en fase normal (SiO<sub>2</sub>, hexano: AcOEt 8: 2) se observan dos sustancias mayoritarias (Rf= 0,5 y 0,8). Espectro de <sup>1</sup>H RMN: protones olefínicos, δ 5,20- 5,10, geminales a heteroátomos, dos dd a δ 4,40- 4,00 característicos de triglicéridos y metilenos/ metilos de cadenas hidrocarbonadas. Por análisis GC-MS se identificaron/ cuantificaron las siguientes sustancias volátiles:

Ácido tridecanoico (**16**; n= **11**; Tr= 12,230)  
1-Tridecanol (**14**; n= **11**; Tr= 14,877)  
1,2,3-Propanotril éster del ácido docosanoico (**27**; Tr= 17,114)  
1-Eicosanol (**14**; n= **18**; Tr= 16,358)  
Éster etílico del ácido (Z,Z)-9,12-octadecadienoico(*linoleico*) (**24**; Tr= 18,375)

Se abordó su purificación por cromatografía en columna y CCF preparativa en fase normal (SiO<sub>2</sub>) siguiéndose la separación por CCF analítica en fase normal (SiO<sub>2</sub>, hexano: AcOEt, 85: 15) lo que rindió una sustancia, homogénea por CCF, que denominamos **Pv-L-1-a-1** (Rf= 0,69).

### Estudio de la fracción Pv-L-1-a-1

Por espectroscopía se identificó como *trioleína* (**26**). Así, su espectro de IR muestra bandas de absorción a 3029, 3007 y 1653 (dobles enlaces), 1739 y 1233 (ésteres).

Su espectro de <sup>1</sup>H-RMN delató protones olefínicos (δ 5,31- 5,25, 6H, m), protones geminales a heteroátomos a δ 5,22 (1H; dt; J= 5,2 Hz; J= 6,4 Hz); δ 4,26 (2H; dd; J= 5,2 Hz; J= 13,1 Hz) y δ 4,11 (2H; dd; J= 6,4 Hz; J= 13,1 Hz), hidrógenos en α a carbonilo (δ 2,27; t, 6H), hidrógenos alílicos (δ 2,01; m; 12H), hidrógenos en β a carbonilo (δ 1,61; m; 6H), metilenos de cadenas hidrocarbonadas lineales (δ 1,27; 60H) y metilos terminales de dichas cadenas hidrocarbonadas (δ 0,9; 9H) .

En su espectro de <sup>13</sup>C-RMN se observaron tres carbonos carbonílicos (δ 173,30; 173,20; 172,80), seis carbonos olefínicos (δ 130,20; 130,00; 129,90; 129,70; 129,60; 128,00), tres carbonos geminales a oxígeno (δ 68,90; 62,10 -x2-) y carbonos saturados típicos de cadenas hidrocarbonadas lineales (δ 50,80; 34,20; 34,10; 31,90; 31,50; 29,60 (varios); 27,20; 27,10; 25,60; 24,90; 24,80; 22,70; 22,60; 14,10; 14,00).

En el espectro  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY se observa correlación, entre sí, del dt a  $\delta$  5,22 y los dos dd a  $\delta$  4,26 y 4,11 correspondientes a los protones geminales a oxígeno de la unidad de glicerol. También entre los protones olefínicos y metilenos alílicos a  $\delta$  5,27 y 2,01 respectivamente.

En el espectro HSQC se observa correlación entre el dt a  $\delta$  5,22 correspondiente al metino geminal a oxígeno de la unidad de glicerol y el carbono enlazado a dicho oxígeno a  $\delta$  68,9. También entre los dos dd a  $\delta$  4,26 y 4,11 correspondientes a los protones metilénicos geminales a oxígeno de la misma unidad de glicerol y los carbonos enlazados a dichos oxígenos, que aparecen ambos a  $\delta$  62,10. También entre un triplete a  $\delta$  2,27 correspondiente a los protones en  $\alpha$  a carbonilo y los propios carbonos en  $\alpha$  a carbonilo a  $\delta$  34,15. También entre un multiplete a  $\delta$  2,01 correspondiente a los protones alílicos y los carbonos en  $\alpha$  a doble enlace a  $\delta$  27,20.

En el espectro HMBC se observa correlación entre los protones en  $\alpha$  a carbonilo a  $\delta$  2,27 y los carbonos de metilenos saturados a  $\delta$  25,60 y 29,60. También se observa correlación entre el dt a  $\delta$  5,22 correspondiente al metino geminal a oxígeno de la unidad de glicerol y los carbonos metilénicos de dicha unidad de glicerol a  $\delta$  62,10 por un lado y uno de los carbonilos de los ésteres a  $\delta$  172,80 (conectividades a dos y tres enlaces). También entre los dos dd a  $\delta$  4,26 y 4,11 correspondientes a los protones metilénicos geminales a oxígeno de la unidad de glicerol y los tres carbonos - metínico y metilénicos - enlazados a oxígeno a  $\delta$  68,80 y 62,10 respectivamente, así como con los carbonos carbonílicos a  $\delta$  173,30 y 173,20 (correlaciones a dos y tres enlaces de la unidad de glicerol). También entre los protones alílicos a  $\delta$  2,01 y los carbonos olefínicos a  $\delta$  130,20; 130,00; 129,90; 129,70; 129,60; 128,00. También entre los dos dd a  $\delta$  4,26 y 4,11 correspondientes a los protones geminales a oxígeno y los carbonos carbonílicos de los tres ésteres a  $\delta$  173,30; 173,20; 172,80.

### **Estudio de la fracción Pv-L-1-b**

Por CCF ( $\text{SiO}_2$ , hexano: AcOEt, 8: 2) se observan dos sustancias mayoritarias ( $R_f = 0,22$  y  $0,36$ ) impurificadas por otras cinco minoritarias (espectro de  $^1\text{H}$ -RMN: protones olefínicos,  $\delta$  6,60- 5,00 con sistema AB típico del peróxido del ergosterol, geminales a heteroátomos,  $\delta$  4,10- 3,30 y metilenos/ metilos de cadenas hidrocarbonadas,  $\delta$  2,90- 0,60), lo que indica presencia de componentes lipídicos con abundancia de los insaturados. Se sometieron a separación por cromatografía en columna - fase normal, hexano: AcOEt - seguida de HPLC semipreparativa, lo que dio las siguientes sustancias homogéneas por CCF analítica ( $\text{SiO}_2$ , hexano: AcOEt, 85: 15): Pv-L-1-b-1 ( $R_f = 0,62$ ), Pv-L-1-b-2 ( $R_f = 0,59$ ), Pv-L-1-b-3 ( $R_f = 0,32$ ).

### **Estudio de la fracción Pv-L-1-b-1**

Su espectro de  $^1\text{H}$ -RMN delató protones olefínicos ( $\delta$  5,50- 5,20), protones geminales a heteroátomos ( $\delta$  4,25- 4,00) y cadenas hidrocarbonadas ( $\delta$  3,00- 0,80). En su espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN se observaron carbonos carbonílicos ( $\delta$  180,314), carbonos olefínicos ( $\delta$  130,225- 128,082), carbonos geminales a heteroátomos ( $\delta$  77,543- 76,534) y carbonos saturados típicos de cadenas hidrocarbonadas ( $\delta$  34,115- 14,132). Esto parece indicar la presencia abundante de ácidos grasos libres, con abundancia de los insaturados (la curva integral de los protones olefínicos es intensa).

En consistencia con lo anterior, por GC-MS se identificaron las siguientes sustancias:

Ácido hexadecanoico (**16**;  $n = 14$ ;  $T_r = 16,225$ )

Ácido heptadecanoico (**16**;  $n = 15$ ;  $T_r = 16,912$ )

1-(Hidroximetil)-1,2-etanodiil éster del ácido hexadecanoico (**28**;  $T_r = 17,595$ )

Éster metílico del ácido 14-metil-pentadecanoico (**25**;  $T_r = 17,261$ )

Ácido (Z)-9-octadecenoico (*oleico*) (**19**;  $n = 5$ ,  $m = 7$ ;  $T_r = 18,730$ )

Ácido (Z)-13-docosenoico (*erúcico*) (**19**;  $n = 7$ ,  $m = 11$ ;  $T_r = 19,760$ )

### **Estudio de la fracción Pv-L-1-b-2**

Su espectro de  $^1\text{H}$ -RMN delató protones olefinicos ( $\delta$  6,70- 5,10), protones geminales a heteroátomos ( $\delta$  4,80- 4,00) y cadenas hidrocarbonadas ( $\delta$  3,00- 0,80). En su espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN se observaron carbonos carbonílicos ( $\delta$  180,00), carbonos olefinicos ( $\delta$  130,00- 120,00), carbonos geminales a heteroátomos ( $\delta$  77,00- 60,00) y carbonos saturados típicos de cadenas hidrocarbonadas ( $\delta$  34,00- 14,00). Esto parece indicar la presencia abundante de ácidos grasos libres, con abundancia de los insaturados (la curva integral de los protones olefinicos es intensa).

En consistencia con esto, por GC-MS se identificaron las siguientes sustancias:

- Éster metílico del ácido 9-oxo-nonanoico (**34**; Tr= 13,676)
- 2-Hidroxi-1,3-propanodiol éster del ácido hexadecanoico (**29**; Tr= 12,192)
- Ácido 9-hexadecenoico (**21**; Tr= 14,759)
- Éster metílico del ácido 14-metil-pentadecanoico (**25**; Tr= 17,261)
- Éster metílico del ácido 11-hexadecenoico (**20**; n= 3, m= 9; Tr= 17,144)
- Éster metílico del ácido (E)-9-octadecenoico (**23**; Tr= 18,388)
- Ácido octadecanoico (**16**; n= 16; Tr= 17,583)
- (Z,Z)-9-Octadecenil éster del ácido 9-hexadecenoico (**30**; Tr= 18,516)

### **Estudio de la fracción Pv-L-1-b-3**

Se trata de un sólido blanco (150 mg). Una muestra se sometió a análisis GC-MS sin que se identificase ningún componente volátil - o no se volatilizaron a la temperatura del inyector usada o se salieron del tiempo de análisis prefijado en el método -. El producto se cristalizó a partir de metanol, p.f.= 178- 180 °C y se sometió a un estudio espectroscópico detallado.

En su espectro IR aparecen señales a 3618 (OH libre), 3600- 3200 (OH asociado) y 973 ( $\Delta^{22}$ -trans).

Su espectro de  $^1\text{H}$ -RMN delató protones olefinicos pertenecientes a un doble enlace *cis* a  $\delta$  6,46 (1H, d, J= 8,6 Hz, C<sub>7</sub>-H) y  $\delta$  6,20 (1H, d, J= 8,6 Hz, C<sub>6</sub>-H) (sistema AB característico) y protones olefinicos pertenecientes a un doble enlace *trans* a  $\delta$  5,12 (1H, dd, J= 7,5; 15,2; C<sub>23</sub>-H);  $\delta$  5,08 (1H, dd, J= 8,0; 15,2; C<sub>22</sub>-H), protones geminales a heteroátomos ( $\delta$  3,94; 1H, m), protón hidroxílico ( $\delta$  3,45; 1H, s), metinos y metilenos típicos de esqueletos esteroidales ( $\delta$  2,10- 1,15; 20H, m) y metilos - angulares y secundarios - típicos de esqueletos esteroidales ( $\delta$  1,00- 0,77; 18H), concretamente aparecen en el espectro a  $\delta$  0,954 (3H, d, J= 6,4 Hz); 0,863 (3H, d, J= 6,8 Hz); 0,839 (3H, s); 0,788 (3H, d, J= 6,4 Hz); 0,772 (3H, d, J= 6,8 Hz); 0,771 (3H, s) (Tabla II-2).

En su espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN se observaron cuatro carbonos olefinicos ( $\delta$  135,442; 135,240; 132,337; 130,784), tres carbonos geminales a heteroátomos ( $\delta$  82,170; 79,453; 66,504) y carbonos saturados típicos de cadenas hidrocarbonadas esteroidales (metinos a  $\delta$  56,209; 51,707; 51,101) (metilenos y metilos a  $\delta$  44,580; 42,794; 39,767; 39,363; 36,972; 34,705; 33,075; 30,140; 29,721; 28,665; 23,417; 20,902; 20,653; 19,970; 19,660; 18,185; 17,579; 12,890).

En su espectro DEPT<sub>135</sub> se observan 11 señales positivas correspondientes a metinos (CH), 7 señales negativas correspondientes a metilenos (CH<sub>2</sub>) y otras 6 positivas correspondientes a metilos (CH<sub>3</sub>), lo cual es característico de un esqueleto esteroideal.

En su espectro  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY se observa correlación entre sí en los protones olefinicos del sistema AB anteriormente mencionado ( $\delta$  6,46 y 6,20), así como los centrados en  $\delta$  5,12 y 5,08 y los metinos en los carbonos 24 y 20 ( $\delta$  1,82 y 2,00 respectivamente).

En su espectro HSQC se observa correlación entre los protones olefinicos del sistema AB ( $\delta$  6,46 y 6,20) y sus carbonos olefinicos respectivos ( $\delta$  130,784 y 135,442), lo que delata un doble enlace entre los carbonos 6 y 7. También se observa correlación de los protones olefinicos en C-22 ( $\delta$  5,08) y C-23 ( $\delta$  5,12) y los carbonos en 22 y 23 ( $\delta$  135,24 y 132,337 respectivamente).

En su espectro HMBC se observa correlación entre los protones olefinicos del sistema AB ( $\delta$  6,46 y 6,20) y los carbonos geminales a oxígeno ( $\delta$  82,170 y 79,453) por un lado y los carbonos

olefínicos a  $\delta$  130,784 y 135,442 por otro (conectividades a través de tres y dos enlaces respectivamente). Ello delata un puente epidioxi, característico de endoperóxidos esteroidales. También se observa correlación de los protones olefínicos en C-22 ( $\delta$  5,08) y C-23 ( $\delta$  5,12) y los carbonos vecinales C-20 ( $\delta$  39,767) y C-24 ( $\delta$  42,794) respectivamente.

En su espectro de masas (con NaCl) se aprecian los siguientes iones: 429,1 (M+H)<sup>+</sup>; 451,1 (M+Na)<sup>+</sup>; 879,4 (2M+Na)<sup>+</sup>; lo que nos da una fórmula molecular de C<sub>28</sub>H<sub>44</sub>O<sub>3</sub>.

Todos estos datos indican que esta fracción está constituida por el 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -epidioxiergosta-6,22-dien-3 $\beta$ -ol (*peróxido del ergosterol*) (**48**), sustancia anteriormente descrita en otra especie fúngica (Gonzalez y col., 1983).

### **Estudio de la fracción liposoluble -2 (Pv-L-2)**

Supuso 331 mg de un aceite amarillo cuyo espectro de <sup>1</sup>H-RMN delató protones olefínicos ( $\delta$  5,30- 5,00), protones geminales a heteroátomos ( $\delta$  4,20- 3,40) y cadenas hidrocarbonadas ( $\delta$  2,90- 0,80); el de <sup>13</sup>C-RMN delató carbonos carbonílicos a  $\delta$  174,00; carbonos olefínicos ( $\delta$  130,00- 128,00); y cadenas hidrocarbonadas ( $\delta$  72,00- 14,00); lo que informa a favor de una posible presencia de componentes lipídicos. Por filtración a través de Sephadex (LH-20 lipofílico, MeOH: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1: 1) y CCF (fase reversa, MeOH: H<sub>2</sub>O, 98: 2) suministró dos subfracciones: **Pv-L-2-a** (120 mg) y **Pv-L-2-b** (165 mg).

### **Estudio de la fracción Pv-L-2-a**

Por HPLC analítica se trata, al menos, de ocho sustancias - cuatro mayoritarias -. Su espectro de <sup>1</sup>H-RMN desplaza protones olefínicos a  $\delta$  6,60- 5,00; con sistema AB característico del peróxido del ergosterol (**48**) centrado en  $\delta$  6,46 y 6,20; geminales a heteroátomos a  $\delta$  4,30- 3,50 y metilenos/ metilos de cadenas hidrocarbonadas saturadas. Ello anuncia presencia de posibles componentes lipídicos. Por GC-MS sólo se identificaron las siguientes sustancias:

Pentadecano (**12**; n= 12; Tr= 14,375)  
1-Hexadecanol (**14**; n= 14; Tr= 16,332)  
2,4-Bis(1,1-dimetiletil)-fenol (**45**; Tr= 14,413)

Se abordó su purificación por HPLC semipreparativa (fase normal, hexano: AcOEt, 50: 50), lo que rindió la siguiente sustancia, homogénea por CCF analítica (SiO<sub>2</sub>, hexano: AcOEt, 85: 15): **Pv-L-2-a-1** (Rf= 0,67).

### **Estudio de Pv-L-2-a-1**

Su espectro de <sup>1</sup>H-RMN mostró un sistema AB a  $\delta$  6,46 y 6,20 que delata, de nuevo, al peróxido del ergosterol (**48**), protones olefínicos ( $\delta$  5,60- 5,00), protones geminales a heteroátomos ( $\delta$  4,15- 3,25) y cadenas hidrocarbonadas ( $\delta$  2,50- 0,60) superpuestos a metilos angulares esteroidales. Esto parece indicar la presencia abundante de *peróxido del ergosterol* y otros componentes lipídicos. Por GC-MS se identificaron las siguientes sustancias:

Pentadecano (**12**; n= 12; Tr= 14,092)  
2,4-Bis(1,1-dimetiletil)-fenol (**45**; Tr= 14,380)  
1-Hexadecanol (**14**; n= 14; Tr= 16,332)  
Di-isobutil éster del ácido hexanodioico (**39**; Tr= 15,607)



### Estudio de la fracción Pv-L-2-b

Por HPLC analítica se muestra como una mezcla compleja. Se abordó su purificación por HPLC semipreparativa (fase normal, hexano: AcOEt, 50: 50) sin éxito. Por análisis GC-MS se identificaron las siguientes sustancias:

- 2-Butil-1-octanol (**15**; **n= 3**, **m= 3**; Tr= 12,538)
- 2-Undecanona (**35**; Tr= 12,369)
- 2-Metil-1-hexadecanol (**15**; **n= 11**, **m= 0**; Tr= 14,013)
- Hidroxitolueno butilado (**46**; Tr= 14,335)
- 1-Tridecanol (**14**; **n= 11**; Tr= 14,258)
- 2-Hexil-1-octanol (**15**; **n= 3**, **m= 5**; Tr= 14,386)

### Estudio de la fracción liposoluble-3 (Pv-L-3)

Supuso 23 mg de un aceite amarillo cuyos datos de <sup>1</sup>H-RMN indican que se trata de una mezcla de sustancias. Ésta presenta protones olefínicos ( $\delta$  5,40- 5,00), geminales a heteroátomos ( $\delta$  4,10- 3,00) y cadenas hidrocarbonadas ( $\delta$  3,00- 0,80). Esto parece indicar a su vez la presencia abundante de ésteres de ácidos grasos insaturados. Por escasez de material se sometió directamente a un estudio de GC-MS de sus componentes volátiles resultando identificadas las siguientes sustancias:

- 2-Butil-1-octanol (**15**; **n= 3**, **m= 3**; Tr= 12,524)
- 1-Metilnonil-benceno (**44**; Tr= 15,051)
- Benzoato de bencilo (**38**; Tr= 16,541)
- Éster metílico del ácido (Z)-9-hexadecenoico (**20**; **n= 5**, **m= 7**; Tr= 17,604)
- N-butyl-bencensulfonamida (**43**; Tr= 16,699)
- Maleato de diisooctilo (**40**; Tr= 18,702)
- Éster etílico del ácido hexadecanoico (**18**; Tr= 17,719)
- Ácido (Z)-13-docosenoico (*erúxico*) (**19**; **n= 7**, **m= 11**; Tr= 19,824)
- 2-Hidroxi-1-(hidroximetil) etil éster del ácido (Z,Z)-9,12-octadecadienoico (*linoleico*) (**33**; Tr= 18,817).

### Estudio de la fracción hidrosoluble bruta (Pv-H-0)

Se obtuvo por extracción con 2-butanol de la fase acuosa seguido de evaporación del disolvente en rotavapor (806 mg). Sus espectros de resonancia delatan componentes lipídicos:

Espectro de <sup>1</sup>H-RMN: muestra protones olefínicos a  $\delta$  5,20; geminales a heteroátomos a  $\delta$  4,50- 3,00; y metilenos/ metilos de cadenas hidrocarbonadas a  $\delta$  2,50- 0,80.

Espectro de <sup>13</sup>C-RMN: presenta carbonos carbonílicos a  $\delta$  175,00; olefínicos a  $\delta$  132,00- 118,00; geminales a heteroátomos a  $\delta$  70,00- 64,00 y metilenos/ metilos de cadenas hidrocarbonadas a  $\delta$  70,00- 64,00.

Por filtración a través de Sephadex (LH-20 lipofílico, MeOH: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1: 1) se obtuvieron tres subfracciones que se diferenciaron por su comportamiento en CCF: **Pv-H-1-a** (311 mg), **Pv-H-1-b** (132 mg) y **Pv-H-1-c** (238 mg)

Cada una de estas fracciones se sometieron a purificación por HPLC semipreparativa (fase reversa, MeOH: H<sub>2</sub>O, 98: 2 hasta 90: 10), recomprobándose la purificación por CCF en fase reversa, MeOH: H<sub>2</sub>O, 98: 2. Se obtuvieron así las siguientes subfracciones:

### **Estudio de la fracción Pv-H-1-a-1**

Su espectro de  $^1\text{H}$ -RMN delata protones olefínicos a  $\delta$  5,00- 4,80; geminales a heteroátomos a  $\delta$  4,00- 3,50; y metilenos/ metilos de cadenas hidrocarbonadas a  $\delta$  2,20- 0,80 lo que informa sobre presencia de componentes lipídicos. Se sometió directamente a un estudio de GC-MS de sus componentes volátiles, resultando identificados:

Tetradecano (12; n= 11; Tr= 13,262)  
2-Metil-1-hexadecanol (15; n= 11; Tr= 14,000)  
Hidroxitolueno butilado (46; Tr= 14,323)  
Ftalato de dietilo (41; Tr= 15,069)  
Ftalato de diisobutilo (39; Tr= 17,008)  
9-Octadecenamida (22; Tr= 18,375)  
Maleato de diisooctilo (40; Tr= 18,707)

### **Estudio de la fracción Pv-H-1-b-1**

Su espectro de  $^1\text{H}$ -RMN delata protones olefínicos a  $\delta$  5,40; geminales a heteroátomos a  $\delta$  4,60- 3,00; y metilenos/ metilos de cadenas hidrocarbonadas a  $\delta$  2,50- 0,80 lo que informa sobre presencia de componentes lipídicos. Se sometió directamente a un estudio de GC-MS de sus componentes volátiles, resultando identificados:

Ácido tetradecanoico (16; n= 12; Tr= 14,775)  
1-Hexadecanol (14; n= 14; Tr= 16,353)  
Ácido (Z)-13-docosenoico (*erúxico*) (19; n= 7, m= 11; Tr= 19,816)

### **Estudio de la fracción Pv-H-1-c-1**

Su espectro de  $^1\text{H}$ -RMN muestra sólo protones geminales a heteroátomos,  $\delta$  5,10 (1H, m, protón anomérico) y  $\delta$  3,90- 3,60 (4H, m,  $\text{CH}$  geminales a oxígeno),  $\delta$  3,40- 3,20 (2H,  $\text{CH}_2$  geminal a oxígeno) y protones hidroxílicos a  $\delta$  2,16 (0,25 H, s,  $\text{OH}$ ), lo que delata una estructura de monosacárido.

Su espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN presenta un carbono anomérico a  $\delta$  93,976; cuatro carbonos metínicos geminales a heteroátomos a  $\delta$  74,879; 73,880; 72,973 y 71,885; y un carbono metilénico geminal a heteroátomos a  $\delta$  62,770 en consistencia con la mencionada estructura de monosacárido. Mediante un análisis de esta fracción por HPLC con una columna Shodex OH Pak SB806 HQ termostatada a 30 °C (agua con un 0,05 % de  $\text{NaN}_3$  como eluyente a un flujo de 1,0 ml/ min. y un detector de índice de refracción), después de filtrarla a través de un cartucho Sep-Pak  $\text{C}_{18}$  de Waters se dedujo, por comparación con una muestra auténtica, que está constituida por D-(+)-glucosa (Tr= 11,474  $\pm$  0,007).

## II-6. Referencias Bibliográficas

- Aldridge, D.C., Carman, R.M. and Moore, R.B. 1980 A new tricarboxylic acid anhydride from *Paecilomyces variotii*. **J. Chem. Soc., Perkin Transactions 1**, v. 10, pp. 2134-2135.
- Amade, P., Mallea, M. and Bouaiacha, N. 1994 Isolation, structural identification and biological activity of two metabolites produced by *Penicillium olsonii* Bainier and Sartory. **J. Antibiot.**, v. 47, n. 2, pp. 201-207.
- Amagasa, T., Paul, R., Heitholt, J.J. and Duke, S.O. 1994 Physiological effects of cornexistin on *Lemna pausicostata*. **Pest. Biochem. Physiol.**, v. 49, n. 1, pp. 37-52.
- Andersson, B.A. 1978 Mass spectrometry of fatty acid pyrrolidines. **Prog. Chem. Fats other Lipids**, v. 16, pp. 279-308.
- Ayer, W.A., Craw, P.A. and Nozawa, K. 1991 Two 1H-naphtho [2,3-c] pyran-1-one metabolites from the fungus *Paecilomyces variotii*. **Can. J. Chem.**, v. 69, n. 2, pp. 189-191.
- Babitskaya, V.G. and Shcherba, V.V. 2002 The nature of melanin pigments of several micro- and macromycetes. **Appl. Biochem. Microb.**, v. 38, n. 3, pp. 247-251.
- Bajpai, P. and Bajpai, P.K. 1987 Single-cell protein production from rayon pulp mill waste by *Paecilomyces variotii*. **J. Ferm. Tech.**, v. 65, n. 3, pp. 349-351.
- Battestin, V. and Macedo, G.A. 2007 Tannase production by *Paecilomyces variotii*. **Biores. Tech.**, v. 98, n. 9, pp. 1832-1837.
- Behera, B.K., Arora, M. and Sharma, D.K. 2000 Studies on biotransformation of *Calotropis procera* latex - a renewable source of petroleum, value-added chemicals and products. **Energy Sources**, v. 22, n. 9, pp. 781-807.
- Carballeira, N.M., Miranda, C., Lozano, C.M., Nechev, J.T., Ivanova, A., Ilieva, M., Tzvetkova, I. and Stefanov, K. 2001 Characterization of novel methyl-branched chain fatty acids from a halophilic *Bacillus* species. **J. Nat. Prod.**, v. 64, n. 2, pp. 256-259.

- Chou, S., Chedore, P., Haddad, A., Paul, N.R. and Kasatiye, S. 1996 Direct identification of *Mycobacterium* species in Bactec 7H12B medium by gas-liquid chromatography. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, n. 5, pp. 1317-1320.
- Cooper, W.J. and Blumer, M. 1968 Linear, *iso* and *ante-iso* fatty acids in recent sediments of the North Atlantic. **Deep-Sea Res.**, v. 15, n. 5, pp. 535-540.
- Cranwell, P.A. 1973 Branched-chain and cyclopropanoid acids in a recent sediment. **Chem. Geol.**, v. 11, n. 4, pp. 307-313.
- Cranwell, P.A. 1974 Monocarboxylic acids in lake sediments: indicators, derived from terrestrial and aquatic biota, of palaeoenvironmental trophic levels. **Chem. Geol.**, v. 14, n. 1-2, pp. 1-14.
- Dechkan-Khodzhaeva, N.A., Ivanov, V.I., Nurtaev, K.S., Gazikhodzhaeva, M.A., Sinyashin, N.I. and Mirtalipov, D.T. 1997 Phospholipid and fatty acid compositions of two forms of the fungus *Paecilomyces variotii* Bainier var *Zaaminella* (Dechkan, 1974). **Doklady Akad. Nauk Resp. Uzbek.**, v. 12, pp. 40-43.
- Deodhar, M.A., Pipalia, N.H. and Karmankar, S.M. 2002 Biotransformation of terpenoids: reductive ability of *Paecilomyces variotii*. **J. Med. Arom. Plant Sci.**, v. 24, n. 1, pp. 1-5.
- Domenech, J., Prieto, A., Bernabe, M. and Leal, J.A. 1994 Los polisacáridos de las paredes celulares de cuatro variedades de *Paecilomyces variotii* fueron caracterizados. **Curr. Microb.**, v. 28, n. 3, pp. 169-173.
- Duncan, W.R.H., Lough, A.K., Garton, G.A. and Brooks, P. 1974 Characterization of branched chain fatty acids from subcutaneous triacylglycerols of barley-fed lambs. **Lipids**, v. 9, n. 9, pp. 669-673.
- Fields, S.C., Gerwick, B.C. and Mireles-Lo, L. 1995 Hydroxycornexistin herbicide. **U.S. Patent** n° US 5424278, 7 p.
- Freemantle, M. 2004 Designer liquids in polymer systems. **Sci. & Tech.**, v. 82, n. 18, pp. 26-29.
- Ghosh, S., Sachan, A. and Mitra, A. 2006 Formation of vanillic acid from ferulic acid by *Paecilomyces variotii* MTCC 6581. **Curr. Sci.**, v. 90, n. 6, pp. 825-829.

- González, A.G., Barrera, J.B. and Marante, F.J.T. 1983 The steroids and fatty acids of the basidiomycete *Scleroderma polyrhizum*. **Phytochem.**, v. 22, n. 4, pp. 1049-1050.
- Grimalt, J.O. and Albaigés, J. 1990 Characterization of the depositional environment of the Ebro Delta (Western Mediterranean) by the study of sedimentary lipid markers. **Mar. Geol.**, v. 95, n. 3-4, pp. 207-224.
- Haneishi, T., Nakajima, M., Koi, K., Furuya, K., Iwado, S. and Sato, S. 1988 Manufacture of cornexistin herbicide with *Paecilomyces*. **Eur. Patent**, nº EP 290193, 18 p.
- Horn, W.S., Kurtz, M.B., Liesch, J.M., Smith, J.L., Martin, I. and Vicente, F. 1993 Antibiotic eicosenoic acids and their manufacture with *Paecilomyces variotii*. **U.S. Patent**, nº US 5233062, 6 p.
- Horn, W.S., Smith, J.L., Bills, G.F., Raghoobar, S.L., Helms, G.L., Kurtz, M.B., Marrinan, J.A., Frommer, B.R., Thornton, R.A. and Mandala, S.M. 1992 Sphingofungins E & F: novel serine palmitoil transferase inhibitors from *P. variotii*. **J. Antib.**, v. 45, n. 10, pp. 1692-1696.
- Kaneda, T. 1991 *Iso*- and *ante-iso* fatty acids in bacteria: biosynthesis, function and taxonomic significance. **Microb. Rev.**, v. 55, n. 2, pp. 288-302.
- Kupchan, S.M, Briton, R.W., Ziegler, M.F. and Siegel, C.W. 1973 Bruceatin, a new potent antileukemic simaroubolide from *B. antidysenterica*. **J. Org. Chem.**, v. 38, pp. 178-179.
- Lambert, M.A., Moss, C.W., Silcox, V.A. and Good, R.C. 1986 Analysis of mycolic acid cleavage products and cellular fatty acids of *Mycobacterium* species by capillary gas chromatography. **J. Clin. Microbiol.**, v. 23, n. 4, pp. 731-736.
- Leal, J.A. 1994 Water-soluble polysaccharides of fungal cell walls. *In: Microorganisms in Ruminant Nutrition*. Prins, R.A. and Stewart, C.S. (eds.), University Press, Nottingham, pp. 153-165.
- Leo, R.G. and Parker, P.L. 1966 Branched chain fatty acids in sediments. **Science**, v. 152, n. 3722, pp. 649-650.

- Mukherjee, G., Sachan, A., Ghosh, S. and Mitra, A. 2006 Conversion of sinapic acid to syringic acid by filamentous fungus *P. variotii*. **J. Gen. Appl. Microbiol.**, v. 52, n. 2, pp. 131-135.
- Nakajima, M., Itoi, K., Takamatsu, Y., Sato, S., Furukawa, Y., Furuya, K. Honma, T., Kadotani, J., Kozasa, M. and Haneishi, T. 1991 Cornexistin: a new fungal metabolite with herbicidal activity. **J. Antib.**, v. 44, n. 10, pp. 1065-1072.
- Nechev, J., Christie, W.W., Robaina, R., de Diego, F.M., Ivanova, A., Popov, S. and Stefanov, K. 2002 Chemical composition of the sponge *Chondrosia reniformis* from the Canary Islands. **Hydrobiologia**, v. 489, n. 1-3, pp. 91-98.
- Perry, G.J., Volkman, J.K., Johns, R.B. 1979 Fatty acids of bacterial origin in contemporary marine sediments. **Geoch. Cosmoch. Acta**, v. 43, n. 11, pp. 1715-1725.
- Saad, R. and Hamdy, H.S. 2004 Purification and some properties of extracellular chitinase produced by *Paecilomyces variotii*. **Egypt. J. Biotech.**, v. 16, pp. 150-161.
- Sachan, A., Ghosh, S. and Mitra, A. 2006 Biotransformation of p-coumaric acid by *Paecilomyces variotii*. **Lett. Appl. Microb.**, v. 42, n. 1, pp. 35-41.
- Seyama, Y., Oaci, K., Imamura, T., Kasama, T. and Otsuka, H. 1983 Branched chain fatty acids in phospholipids of Guinea pig harderian gland. **J. Biochem.**, v. 94, n. 3, pp. 1231-1239.
- Silva, J.B.A.E., Maciel de Mancilha, I., Teixeira, M.A. and Vanetti, M.C.D. 1995 Utilization of the hydrolyzate of eucalyptus hemicellulose for production of microbial protein. **Arq. Biol. Technol.**, v. 38, n. 1, pp. 147-156.
- Takahashi, S., Nakajima, M., Kinoshita, T., Haruyama, H., Sugai, S., Homma, T., Sato, S. and Haneishi, T. 1994 Hydantocidin and cornexistin: new herbicidal antibiotics. **Nat. Eng. Pest Manag. Agents**, v. 551, pp. 74-84.
- Takeshiba, H., Hizuba, J., Sano, H., Ozasa, M. and Nakajima, M. 1990 Preparation of cornexistin derivatives as herbicides, plant growth regulators, and germination inhibitors. Jpn. Kokai Tokkyo Koho, **Japan Patent**, n° JP 02209844, 47 p.

- Terekhova, L.P., Trenin, A.S., Ozerskaya, S.M., Rudenskaya, Y.A., Maksimova, T.S., Katrukha, G.S., Tolstykh, I.V., Zenkova, V.A., Fedorova, G.B., Potapova, N.P. and Kosykh, V.A. 1997 Biosynthesis of ascofuranone by the fungus *Paecilomyces variotii* Bainier. **Microb. (Moscow)** (Translation of Mikrobiologiya), v. 66, n. 5, pp. 510-514.
- Thiel, V., Jenisch, A., Wörheide, G., Löwenberg, A., Reitner, J. and Michaelis, W. 1999 Mid-chain branched alkanolic acids from “living fossil” demosponges: a link to ancient sedimentary lipids?. **Org. Geochem.**, v. 30, n. 1, pp. 1-14.
- Udall, J.N., Lo, C.W., Young, V.R., Scrimshaw, N.S. 1984 The tolerance and nutritional value of two microfungus foods in human subjects. **Am. J. Clin. Nut.**, v. 40, n. 2, pp. 285-292.
- Vanhulle, S., Lucas, M., Mertens, V., Gobeaux, B., Corbisier, A.M., Bols, C.M., Buchou, F., Wesenberg, D. and Agathos, S. 2003 Sustainable process for the treatment and detoxification of liquid waste. **World Int. Prop. Org. Patent**, n° WO 2003035561.
- Varsami, Z.M., Katsifas, E.A. and Karagouni, A.D. 1999 Microbial treatment of soya stems waste by the fungus *Paecilomyces variotii*. **Mededelingen - Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen (Univ. Gent)**, v. 64, n. 5, pp. 673-676.
- Wahner, R.S., Giulietti, A.M. and Fraile, E.R. 1983 Biomass production and biological purification of distillation slops in a 2-step process. **Rev. Arg. Microb.**, v. 15, n. 1, pp. 47-50.
- Wagid, O.A.A., Moustafa, A.F. and Ibrahim, M.E. 2001 Integrated control of tomato *Fusarium*-wilt through implementation of soil solarization and filamentous fungi. **Zeit. Pflanzenkr. Pflanzenschutz**, v. 108, n. 4, pp. 345-355.

## *CAPITULO III*



## - CAPITULO III -

### **Composición lipídica del hongo *Penicillium roqueforti* aislado del medio marino.**

#### **III-1. Antecedentes**

El hongo filamentoso *Penicillium roqueforti* Thom es un hifomiceto tradicionalmente usado en la industria biotecnológica láctica. Si bien sólo se le ha descrito hasta ahora como hongo terrestre, algunos estudios indican que *P. roqueforti* es capaz de crecer sobre disoluciones salinas (Kubeczka, 1968) y que la germinación de sus esporas es inhibida sólo a concentraciones de NaCl superiores a 100 g/l (Godinho y Fox, 1981). Ello parece indicar que podría haberse adaptado para actuar como un hongo facultativo marino.

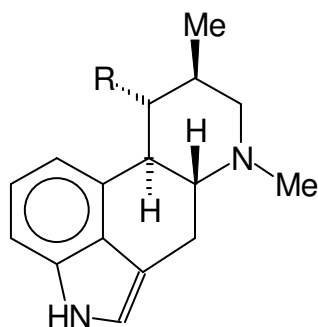
También, bajo determinadas condiciones de cultivo, muestra una pronunciada capacidad para biosintetizar metabolitos secundarios (Szoltysek, 1982; Engel y Teuber, 1983; Engel y Spicher, 1985; Peberdy, 1985; Sharpell, 1985), algunos de los cuales presentan propiedades antiparasitarias (Mrozik, 1989; Ruddock, 1992; Lee y col., 2002) y bacteriostáticas (Kopp-Holtwiesche y Rehm, 1990). Sus enzimas proteolíticas le habilitan para aplicaciones diversas, tanto en la industria pesquera - descamación del pescado - (Woloszyn y col., 1988) como en biotecnología - producción de lípidos de alta calidad a partir de productos alimenticios de desecho - (Hassanien y col., 1986; Ragab y col., 1986).

En relación con la composición química de *P. roqueforti* cabe resaltar los trabajos relativos a su perfil de ácidos grasos y su metabolismo lipídico (Lawrence, 1965; 1966), así como los estudios sobre su capacidad para formar 2-heptanona y otras metilcetonas por fisión oxidativa de dichos ácidos grasos (Gehrig y Knight, 1958; Jackson y Hussong, 1958; Knight, 1966; Larroche y col., 1989; Larroche y Gros, 1989). Según Dartey y Kinsella (1973), el hongo podría emplear este mecanismo como una forma de auto desintoxicación. Paralelamente, se han detectado aldehídos volátiles en el queso fabricado con este hongo (Dolezalek y Hoza, 1969).

Kaufmann y col. (1966), en un estudio cromatográfico de la fracción lipídica total de *P. roqueforti* describieron la presencia mayoritaria de los ácidos palmítico, oleico y linoleico, esterificados en forma de fosfolípidos y/ o aciltriglicéridos, así como esteroides libres con el esqueleto del ergosterol. A continuación se aportaron nuevos datos relativos a la biogénesis de los ácidos grasos insaturados en función de las fases del crecimiento (Lawrence, 1967; Salvadori y Salvadori, 1967; Lawrence y Hawke, 1968; Fan y Kinsella, 1976) y, más recientemente, fue confirmado el perfil de ácidos grasos (Lomascolo y col., 1994).

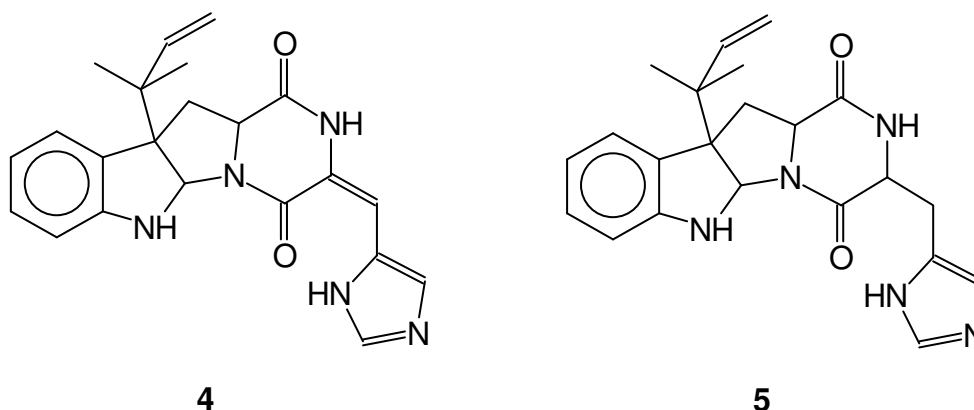
Shimp y Kinsella (1977a) determinaron el contenido en macronutrientes del micelio de *P. roqueforti* demostrando que, en condiciones óptimas de cultivo, es posible encontrar en él altos niveles de hidratos de carbono, proteínas y lípidos, aportando, además, que los lípidos menos polares están formados predominantemente por aciltriglicéridos, diglicéridos y ácidos grasos libres, mientras que los más polares están constituidos por fosfolípidos y glicolípidos, siendo siempre los ácidos palmítico, esteárico, oleico y linoleico los principales ácidos grasos esterificantes.

Sin embargo, la aplicabilidad del hongo en alimentaria se vió limitada tras descubrir que estos organismos son capaces de producir metabolitos secundarios tóxicos (Kolousek y Michalik, 1954; Kanota, 1969; 1970; Scott, 1977). En este sentido, Ohmomo y col. (1975) aislaron y elucidaron la estructura de los alcaloides Roquefortina A (**1**), también denominada Isofumigaclavina A; Roquefortina B (**2**), también denominada Isofumigaclavina B; Festuclavina (**3**); y Roquefortina C (**4**), las cuales, pronto serían descritas como neurotoxinas (Scott y col., 1976; Polonsky y col., 1977). Poco después se aisla el alcaloide Roquefortina D (**5**), proponiéndose que su biogénesis transcurre a través del ácido mevalónico y los aminoácidos triptófano y histidina (Ohmomo y col., 1978). Más recientemente se aportan pruebas que sustentan esta hipótesis (Bhat y col., 1993).



- 1, R= AcO  
 2, R = HO  
 3, R = H

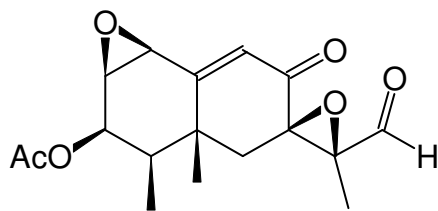
**Figura III-1.** Roquefortina A - Isfumigaclavina A - (1); Roquefortina B - Isfumigaclavina B - (2) y Festuclavina (3).



**Figura III-2.** Roquefortinas C (4) y D (5).

Por otra parte, Bellinck (1975) estudia químicamente los pigmentos de *P. roqueforti* demostrando que dichos componentes son de naturaleza polifenólica.

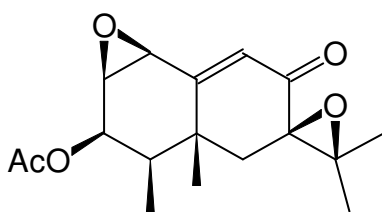
La aplicabilidad del hongo en alimentaria se vió aún más limitada cuando Wei y col. (1973; 1975; 1976) purifican otra micotoxina a partir de una cepa de *P. roqueforti* que había sido aislada a partir de alimentos tóxicos. Esta sustancia resultó letal al ser administrada oralmente a ratas de laboratorio y, su estructura, se elucidó por métodos químicos y espectroscópicos como PR toxina (6). Estos mismos autores aportaron, además, que esta micotoxina posee un fuerte efecto inhibitorio de la biosíntesis del DNA, del RNA y de las proteínas.



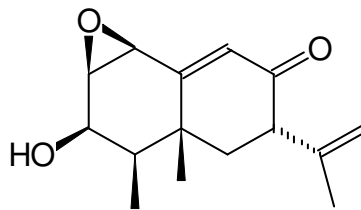
6

**Figura III-3.** PR toxina (PRT)

Inmediatamente, Moreau y col. (1976) descubrieron tres nuevos metabolitos relacionados biosintéticamente con PR toxina, las Eremofortinas A (**7**); B (**8**); y D (**10**) y propusieron a este último como el precursor biogénico de los sesquiterpenos 9-OH o 6-OH-furoeremofilánicos previamente conocidos en diversos organismos.



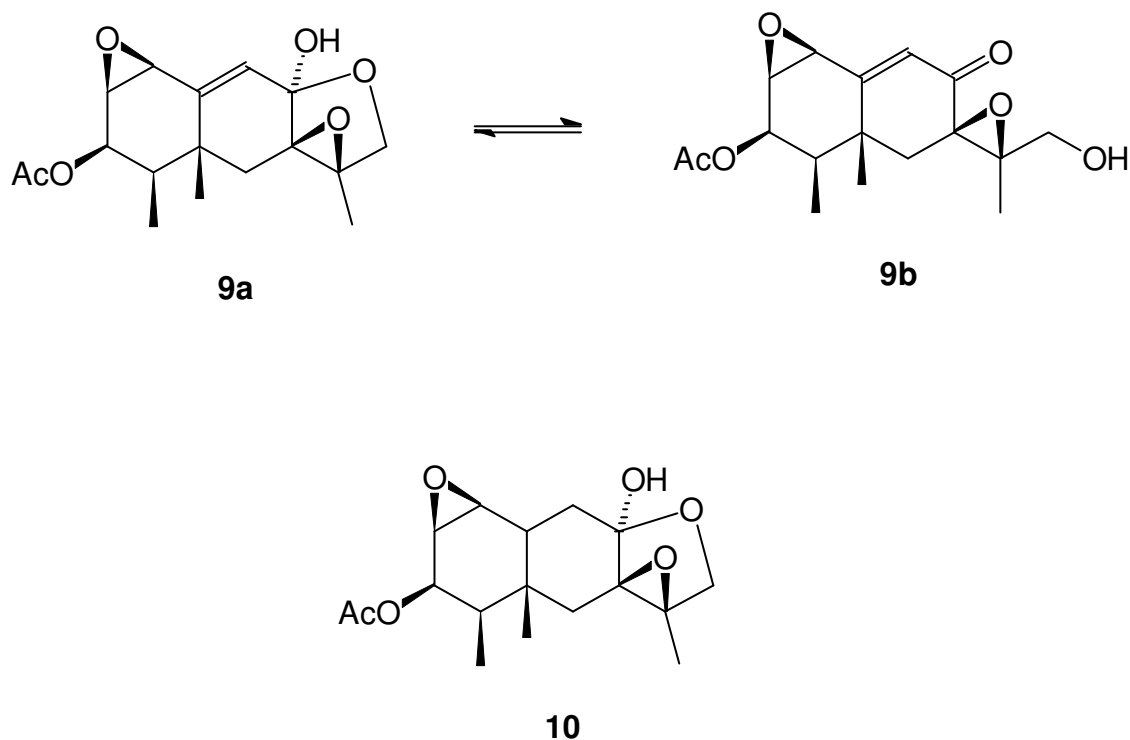
7



8

**Figura III-4.** Eremofortinas A (**7**) y B (**8**)

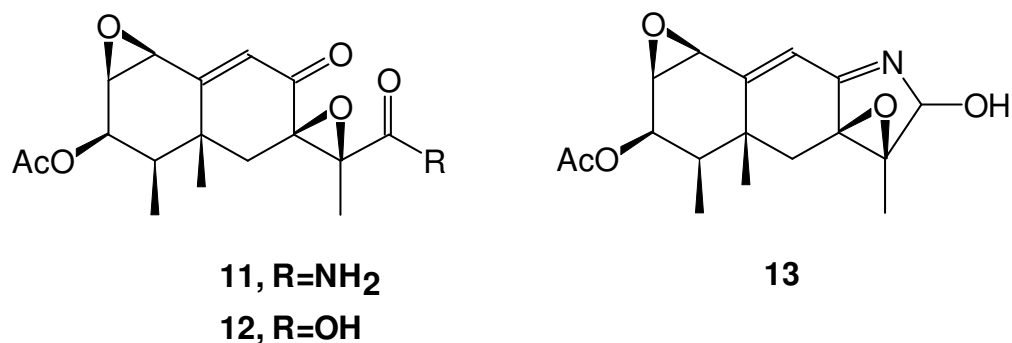
Posteriormente, Moreau y col., (1977) aportaron luz sobre las dos formas estructurales de la Eremofortina C (**9a/ 9b**) y Arnoux y col. (1977) completaron la descripción estructural de la Eremofortina D (**10**).



**Figura III-5.** Eremofortinas C (**9a/ 9b**) y D (**10**)

Moreau y col. (1980b) vincularon a las Eremofortinas A, B y C con la aparición de PR toxina en las cepas tóxicas, proponiendo al sesquiterpeno Eremofortina C como su precursor biosintético directo.

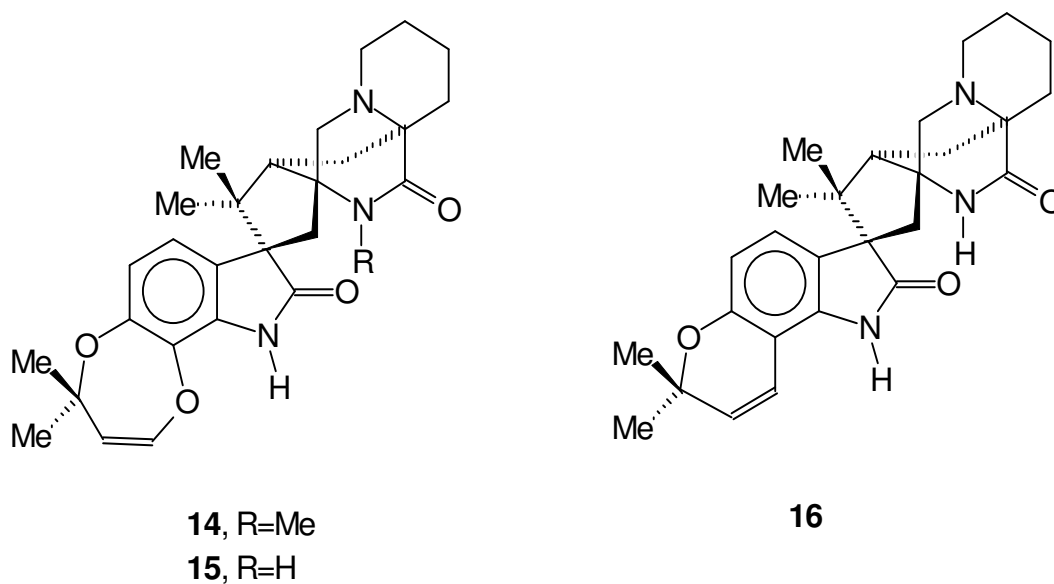
Finalmente se completaron, desde un punto de vista estereoquímico, las estructuras de las Eremofortinas A, B, C, D y E por correlación con la configuración absoluta de PR toxina elucidándose además la estructura de la Eremofortina E o PR-amida (**11**) por difracción de rayos X (Moreau y col., 1980a). Algo más tarde se volvería a implicar a estos metabolitos en la ruta biosintética/ degradativa de PR toxina (Wei y col., 1989).



**Figura III-6.** Eremofortina E - PR amida - (**11**), PR ácido (**12**) y PR imina (**13**)

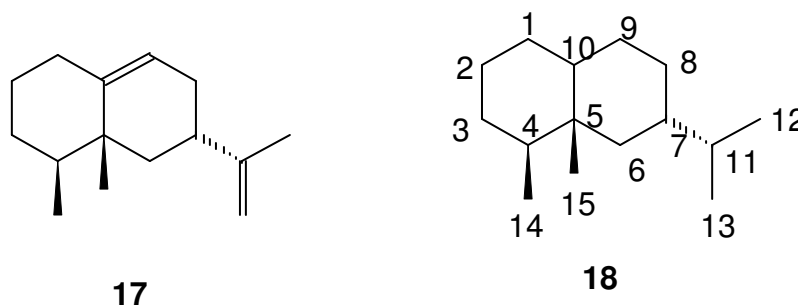
A continuación se revisó la química y actividad biológica de estos sesquiterpenos eremofilánicos (Moreau, 1981) y se describieron los factores que, relacionados con las condiciones de cultivo, afectan a la producción de PR toxina (Scott, 1984; Chang y col., 1991), así como la degradación que sufre la toxina en el propio productor - *P. roqueforti* -, descubriéndose los metabolitos que se liberan y acumulan en el medio como consecuencia de la misma, a saber, Eremofortina E (PR amida, **11**); PR ácido (**12**); y PR imina (**13**) (Chang y col., 1993; 1996).

Entre los avances en la descripción del metabolismo secundario de *P. roqueforti* hay que resaltar también la descripción de la configuración absoluta de la Isofumigaclavina A (**1**) (Arnoux y col., 1978), la elucidación estructural de las Marcfortinas A (**14**); B (**15**); y C (**16**) (Polonsky y col., 1980; Prangé y col., 1981) y la descripción de la estructura cristalina del enzima Aristolocheno-sintetasa (Caruthers y col., 2000). Esta última supone el primer enzima terpenoide-ciclasa de origen fúngico y, su estructura, muestra los centros activos que, presumiblemente, participan en la ciclación del pirofosfato de farnesilo (**25**) que conduce al Aristolocheno (**17**) que



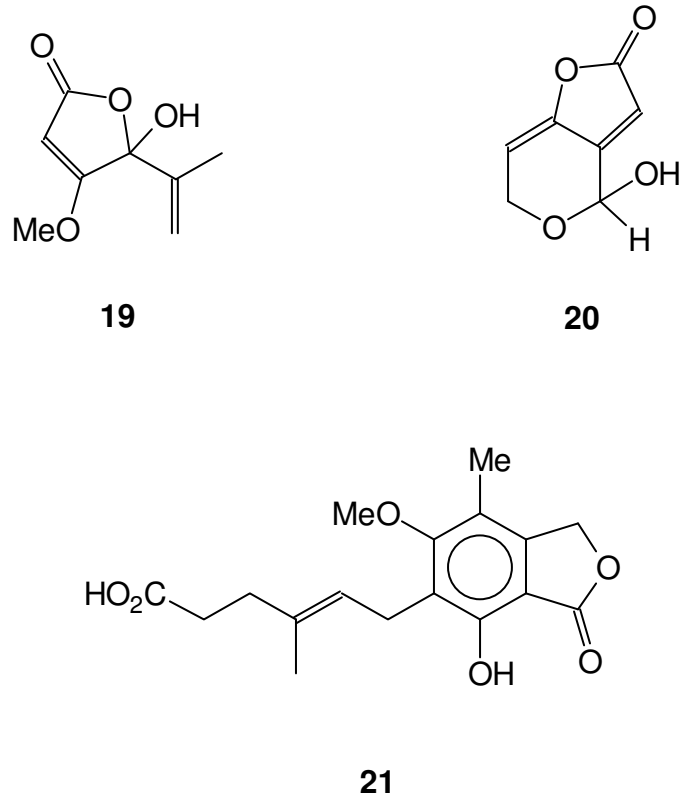
**Figura III-7.** Marcfortinas A (**14**), B (**15**) y C (**16**)

es, a su vez, el precursor biogénico de todos los sesquiterpenos que, relacionados estructuralmente con PR toxina, han sido descritos anteriormente. Obsérvese que todos ellos poseen el esqueleto del eremofilano (**18**).



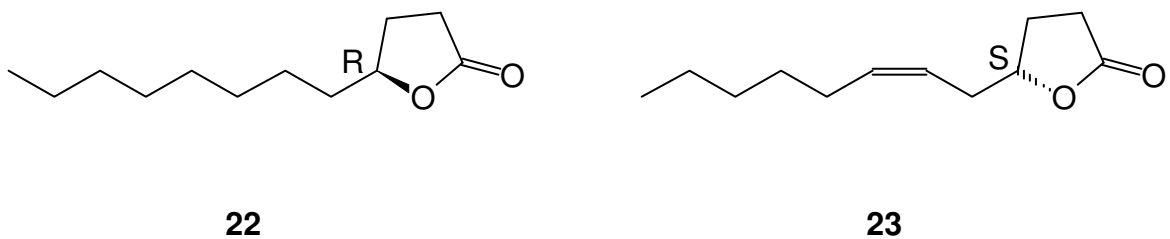
**Figura III-8.** (+)-Aristolocheno (**17**) y esqueleto carbonado del eremofilano (**18**)

Por otra parte, Olivigni y Bullerman (1978) detectaron el ácido penicílico (**19**) y patulina (**20**) en una cepa atípica de *P. roqueforti*. Lafont y Debeauvais (1980) describieron el ácido micofenólico (**21**) y Brueckner y Reinecke (1988) identificaron por GC-MS el ácido aminoisobutírico.



**Figura III-9.** Ácido penicílico (19), patulina (20) y ácido micofenólico (21)

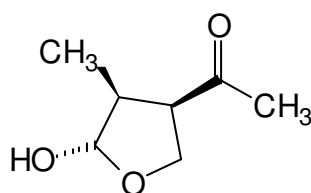
Chalier y Crouzet (1992) señalaron a las  $\gamma$ -lactonas como las responsables del aroma del queso azul, describiendo al 4-dodecanolido ( $\gamma$ -C12, **22**), al (Z)-6-dodecen-4-olido {(6Z)- $\gamma$ -C12:1, **23**} y al minoritario 4-hexanolido ( $\gamma$ -C6), así como la estereoquímica en el carbono 4 {R para **22** y S para **23**}, que *P. roqueforti* elabora a partir de los ácidos oleico y linoleico respectivamente.



**Figura III-10.** 4-Dodecanolido (22) y (Z)-6-Dodecen-4-olido (23)



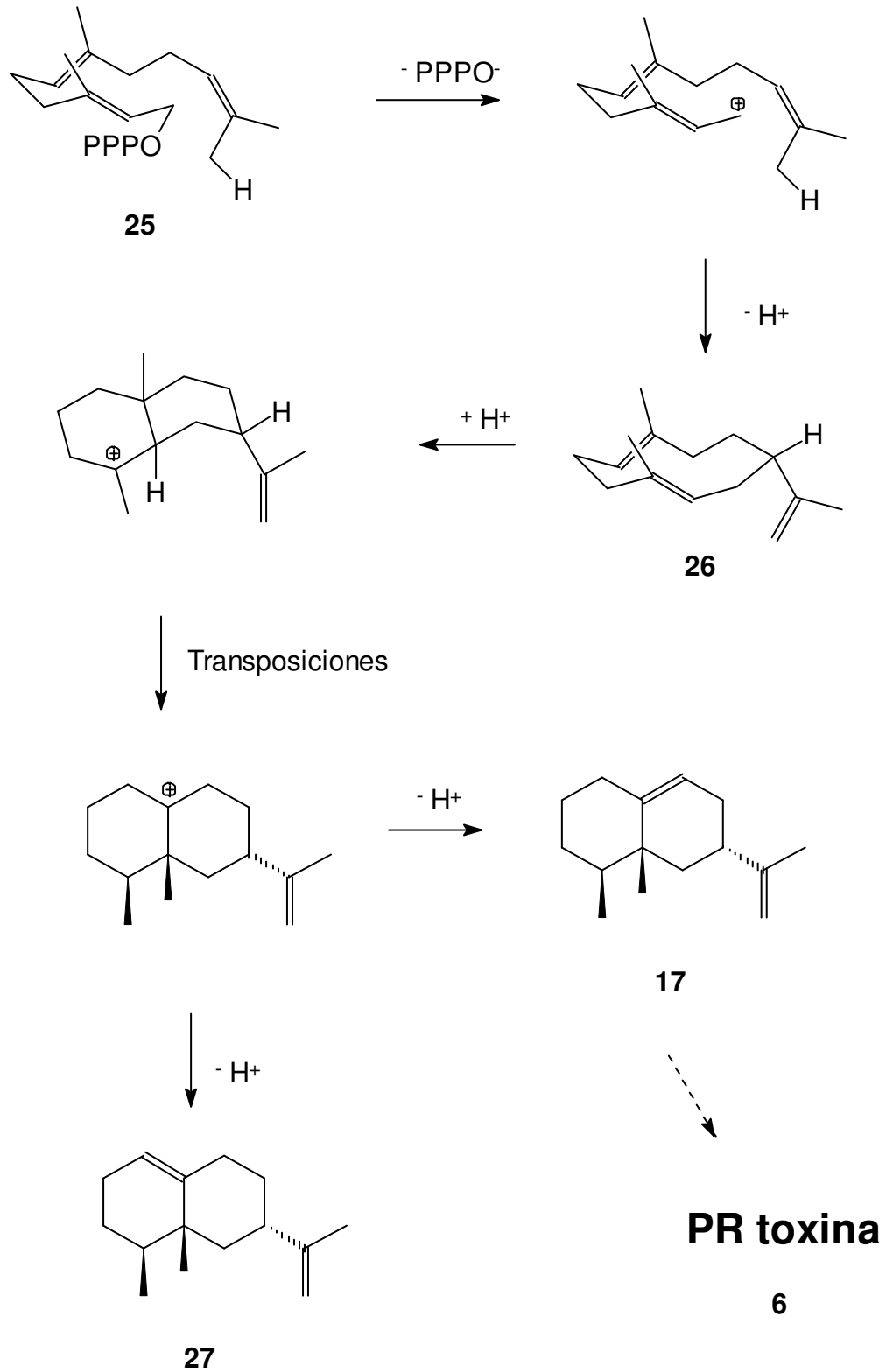
Finalmente, Moreau y col. (1982) aislaron a partir de una cepa de *P. roqueforti* no productora de PR-toxina otra micotoxina previamente descrita en *Botryodiplodia theobromae*, la Botriodiplodina (**24**). Los autores elucidan su configuración absoluta por difracción de rayos X e informan de su actividad mutagénica.

**24****Figura III-11.** Botriodiplodina

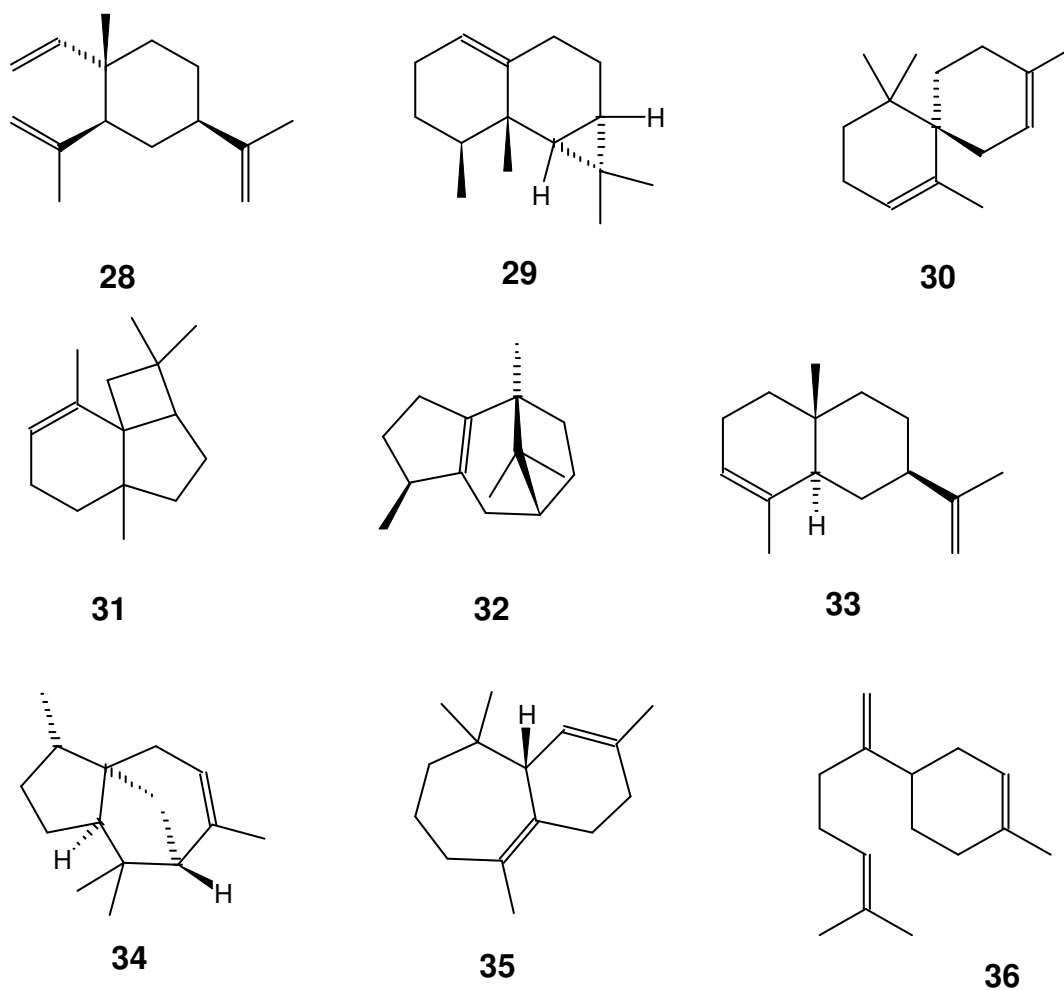
Tradicionalmente, la taxonomía del grupo *P. roqueforti* se basó en criterios morfológicos, su capacidad de difusión sobre medios de cultivo estandarizados y el análisis de sus perfiles bioquímicos, conociéndose la variedad *P. roqueforti* var. *roqueforti*, usada en la fabricación del queso, y *P. roqueforti* var. *carneum* que es la productora de patulina (**20**) (Pitt, 1979; Frisvad, 1981; Engel y Teuber 1983; Blomquist y col., 1992; Lomascolo y col., 1994). Sin embargo, las modernas herramientas de genética molecular, combinadas con perfiles bioquímicos, pusieron de manifiesto la necesidad de reclasificar el grupo *P. roqueforti*, dividiéndolo en tres especies que fueron nombradas como: *P. roqueforti*, *P. carneum* y *P. paneum* (Boysen y col., 1996; Boysen y col., 2000).

El uso de técnicas de microextracción en fase sólida, seguido del análisis por cromatografía capilar con detector de masas (GC-MS) ha permitido la detección de los sesquiterpenos volátiles intermediarios de las diferentes rutas metabólicas que intervienen en *P. roqueforti* (Demyttenaere y col., 2002; Jelen, 2002) consolidándose la idea de que, como se indicó anteriormente, el enzima aristolocheno-sintetasa (AS) es el responsable, en *P. roqueforti*, de ciclar

el pirofosfato de farnesilo (**25**) hasta aristolocheno (**17**), el cual, a su vez, se considera el precursor biogénico de PR toxina (Figura III-13). Es por ello que tanto Demyttenaere y col. (2002) como Jelen (2002) y Calvert y col. (2002) lo propusieron, junto a germacreno A (**26**), valenceno (**27**),  $\beta$ -elemeno (**28**),  $\beta$ -gurjuneno (**29**),  $\alpha$ -chamigreno (**30**),  $\alpha$ -panasinseno (**31**),  $\beta$ -patchouleno (**32**),  $\alpha$ -selineno (**33**), diepi- $\alpha$ -cedreno (**34**),  $\beta$ -himachaleno (**35**) y  $\beta$ -bisaboleno (**36**) como el perfil de componentes volátiles que permite diferenciar quimiotaxonómicamente las cepas productoras de la PR toxina de aquellas que no la pueden biosintetizar. Los autores subrayaron que estos marcadores químicos, detectables por GC-MS, estuvieron ausentes tanto en las cepas de *Penicillium roqueforti* no tóxicas como en las otras cepas de *Penicillium* sp. que fueron analizadas. La identificación de los metabolitos secundarios puede asistir, pues, la labor de diferenciación taxonómica, si bien, dado que las rutas biogénicas son dependientes de las condiciones de cultivo se debe de tomar los resultados con la debida cautela (Scott y col., 1977; Shimp y Kinsella, 1977b; Maheva y col., 1984; Hassanien y col., 1986; Gock y col., 2003). Es por ello que Jelen (2002) estudió la influencia de las condiciones de cultivo (temperatura y contenido en agua del caldo) y concluyó que, si bien éstos influyen en la cantidad de sesquiterpenos producidos - análisis cuantitativo -, no lo hacen en su perfil - análisis cualitativo -, el cual resultó único y característico de las cepas tóxicas.

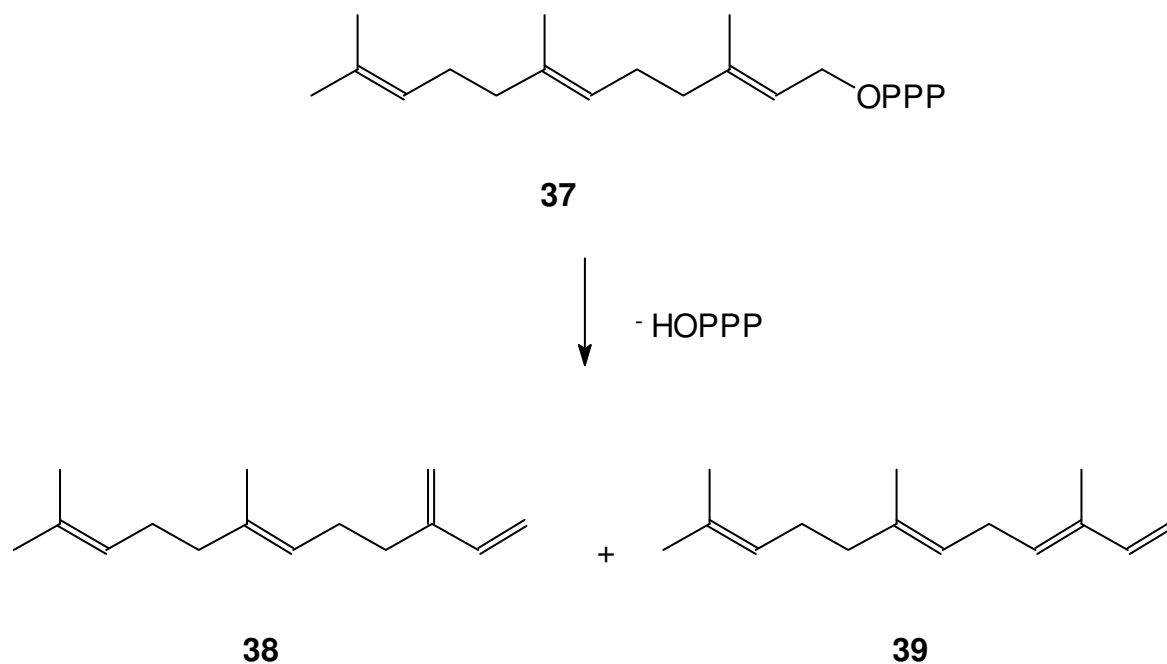


**Figura III-12.** Biogénesis de los sesquiterpenos volátiles implicados en la ruta de la PR toxina (6) en las cepas tóxicas de *P. roqueforti*.



**Figura III-13.** Trazadores volátiles típicos de las cepas tóxicas de *P. roqueforti*.

La razón de esta especificidad ha sido justificada mediante estudios estructurales del enzima aristolocheno-sintetasa AS (Caruthers y col., 2000; Calvert y col., 2002; Deligeorgopoulou y Allemann, 2003), evidenciándose que el pirofosfato de farnesilo se acomoda al centro activo de AS adoptando la conformación *cuasi*-cíclica necesaria (**25**) que hace posible el ataque nucleofílico de C1 por el doble enlace en C10 produciendo, estereoespecíficamente, el (S)-germacreno A (**26**), intermedio éste implicado en la ruta de la PR toxina (Figura III-13), mientras que la mutación del AS en un solo punto - residuo 92 - lo convierte en un enzima que desvía la ruta biogénica hacia la producción de terpenoides de cadena lineal, como el (E)- $\beta$ -farneseno (**38**) y (E,E)- $\alpha$ -farneseno (**39**) al permitir un acomodo en el centro activo del pirofosfato de farnesilo con su conformación *cuasi*-lineal (**37**).



**Figura III-14.** Biogénesis de algunos trazadores volátiles encontrados en las cepas no tóxicas de *Penicillium roqueforti*.

## III-2. Objetivos de este trabajo

En este trabajo, y como consecuencia de haber aislado del medio marino una cepa de *P. roqueforti*, clasificada por *CABI Bioscience (Identification Services, Surrey, UK)* se han planteado los siguientes objetivos:

**III-2.1.** Producir a escala de laboratorio dicho hongo mediante su cultivo en agua de mar.

**III-2.2.** Realizar un estudio de los productos naturales que dicha cepa es capaz de biosintetizar en las mencionadas condiciones, realizando un minucioso barrido de sus fracciones liposolubles e hidrosolubles, tanto en lo que se refiere a sus componentes volátiles como a los que no lo son; todo ello en orden a encontrar componentes quimiotaxonómicos que permitan correlacionarla con alguna de las cepas descritas previamente en la bibliografía, esclareciendo si se trata de una cepa productora de micotoxinas o no.

Ambos objetivos, que son la base de una futura aplicabilidad biotecnológica del organismo aislado orientada hacia la alimentación animal (acuicultura) y humana (industria láctica) se apoyaban en los antecedentes anteriormente comentados.

### III-3. Resultados y Discusión

#### III-3.1. Obtención de biomasa, extracción y fraccionamiento

En lo que se refiere a la producción de la biomasa de *P. roqueforti*, comentar que la cepa fue aislada a partir de agua marina procedente del litoral Canario. Las colonias en desarrollo fueron traspasadas a placas de Petri conteniendo el medio sólido KMV modificado, en el que se pudieron purificar. La producción de la biomasa fúngica se consiguió, en el caldo KMV modificado, en un sistema estático de cultivo, a escala de laboratorio. El caldo fue recogido y sometido a extracción líquido-líquido según la Figura III-15. Paralelamente, la biomasa miceliar sobrenadante se recolectó, extrajo y fraccionó según la Figura III-16.

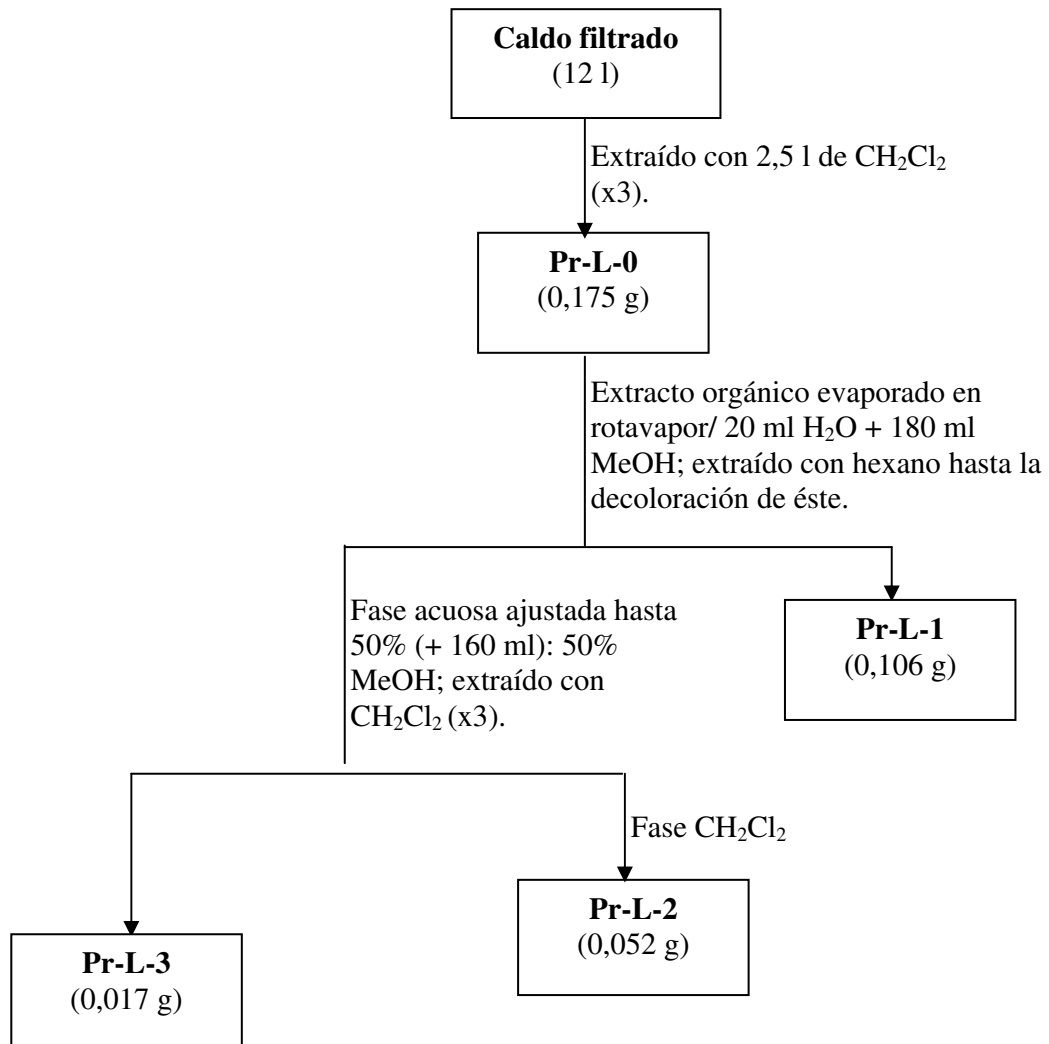
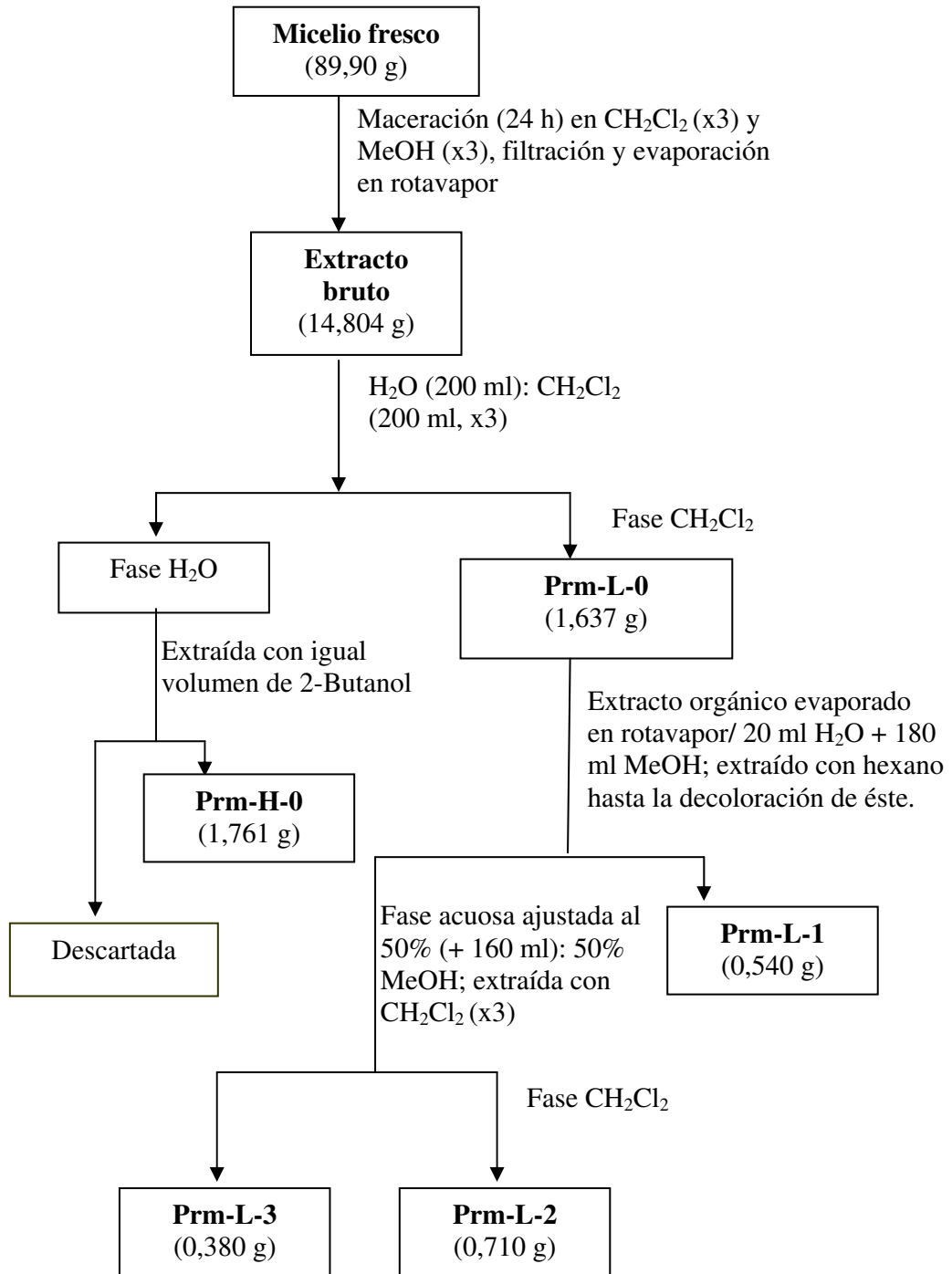


Figura III-15. Esquema de partición aplicado al caldo de *Penicillium roqueforti*.



**Figura III-16.** Esquema de partición aplicado al extracto del micelio de *Penicillium roqueforti*.

### III-3.2. Estudio químico del caldo de cultivo

Después de extraer el caldo de cultivo y fraccionarlo (Figura III-15) se rastrearon minuciosamente todas las fracciones, tanto sus componentes volátiles como los no volátiles, identificándose y cuantificándose las siguientes sustancias:

#### III-3.2.1. Componentes volátiles en el caldo de cultivo

Se identificaron y cuantificaron por GC-MS, lo que rindió los datos de la Tabla III-1. Si se reúnen dichas sustancias por criterios estructurales (Figuras III-17 hasta III-24) se puede afirmar que se han identificado y cuantificado *n*-alcanos (**40**), 1-alcanoles (**42**), 2-alkuil-1-alcanoles (**43**), ácidos grasos libres - saturados (**44**) e insaturados (**50**) -, amidas de ácidos grasos (**51**), ésteres metílicos de ácidos grasos poliinsaturados (**52**), monoglicéridos (**61**), ceras - ésteres de ácidos y alcoholes grasos (**66**, **67** y **70**) -, alcoholes grasos libres (**69**), monoterpenos de cadena lineal (**74**), dipéptidos cíclicos (**80**) y ftalatos de dialquilo (**83-85**).

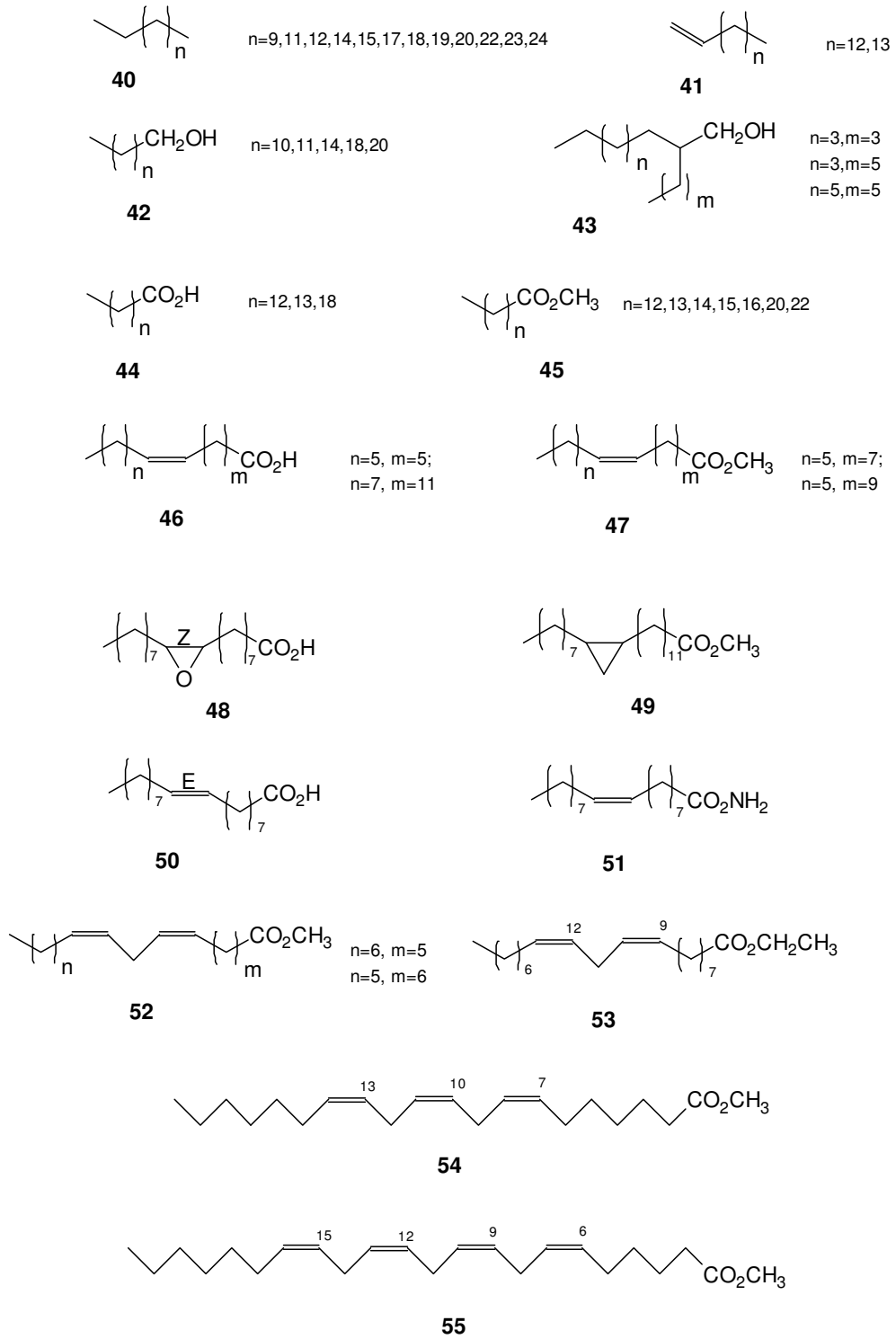
#### III-3.2.2. Componentes no volátiles en el caldo de cultivo

El material “no volátil” obtenido a partir del caldo de cultivo fue fraccionado por cromatografía en columna en fase normal (gel de sílice), cromatografía de exclusión por tamaño molecular (LH-20 lipofílico) y HPLC semipreparativa en fase normal y, las fracciones obtenidas, se analizaron por espectroscopía - fundamentalmente RMN - lo que permite afirmar que está constituida fundamentalmente por 151,3 mg de una mezcla compleja de ceras - alcanos de alto peso molecular (**40**) -, ftalatos de alquilo (por ej., ftalato de dinonilo, **83**,  $n=8$ ), ácidos grasos libres - saturados (**44**) e insaturados (**46**) -, 1-alcanoles (**42**), triglicéridos insaturados (por ej., **58**) y compuestos polihidroxílicos (**89**, **92**). Obsérvese que diferentes componentes que pertenecen a estos grupos estructurales fueron descritos en el apartado anterior como “componentes volátiles”.

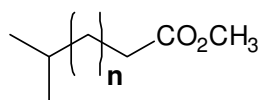


Tr (min.)		CALDO	
		mg	ppm (mg/l x 10 <sup>3</sup> )
12,166 ± 0,012	Éster metílico del ácido (2-pentadecil-1,3-dioxolan-4-il) hexadecanoico (61)	0,0088	0,733
12,179	(E)-3,7-dimetil-2,6-octadienal (74)	0,079	6,583
12,524 ± 0,007	2-Butil-1-octanol (43; n= 3, m= 3)	0,0025	0,208
13,991 ± 0,001	Pentadecano (40; n= 12)	0,042	3,5
14,771 ± 0,005	Ácido tetradecanoico (44; n= 11)	0,0063	0,525
14,857 ± 0,010	1-Tridecanol (42; n= 11)	0,0023	0,192
15,063 ± 0,001	Ftalato de dietilo (83; n= 1)	0,0083	0,692
15,642 ± 0,000	Heptadecano (40; n= 14)	0,030	2,5
16,338 ± 0,010	1-Hexadecanol (42; n= 14)	0,0030	0,25
17,0085 ± 0,0005	Ftalato de bis(2-metilpropilo) (84; n= 1)	0,017	1,39
17,393	Eicosano (40; n= 17)	0,063	5,25
17,56	Ciclo-ProLeu (80)	0,21	17,583
17,653 ± 0,009	Ftalato de dibutilo (83; n=3)	6,52	543,292
17,948	Éster 3-(octadeciloxi) propílico del ácido esteárico (67)	0,0024	0,2
18,327	Heneicosano (40; n= 18)	0,14	11,75
18,360 ± 0,008	9-Octadecenamida (51)	0,067	5,583
18,378	Éster metílico del ácido 7,10-octadecadienoico (52; n= 6, m= 5)	0,18	14,833
18,646	Éster octadecílico del ácido hexadecanoico (66)	0,25	20,916
18,978	Docosano (40; n= 19)	0,14	11,833
19,048 ± 0,058	Éster etílico del ácido 2-(octadeciloxi)-hexadecanoico (70)	0,12	9,917
19,748 ± 0,005	Tricosano (40; n= 20)	0,25	20,833
19,810 ± 0,004	Ácido (E)-9-Octadecenoico (50)	0,078	6,475
20,4125	Ftalato de bis(4-metilpentilo) (84; n= 3)	0,97	80,667
20,714	Éster mono (2-etilhexílico) del ácido hexanodioico (82)	0,14	11,917
21,805	2-(octadeciloxi)-etanol (69)	0,56	46,25
22,648 ± 0,003	Ftalato de bis(2-etilhexilo) (85)	0,21	17,833
22,746 ± 0,013	Ftalato de dihexilo (83; n= 5)	2,92	243,25
26,3896 ± 0,0226	Ftalato de dioctilo (83; n= 7)	2,35	195,75
23,242	Hexacosano (40; n= 23)	1,77	147,167
25,07	Heptacosano (40; n= 24)	0,59	49,00
<b>Volátiles</b>		<b>17,72</b>	<b>1477,00</b>
<b>No volátiles</b>		<b>157,28</b>	<b>13107,00</b>
<b>Totales</b>		<b>175,00</b>	<b>14583,00</b>

**Tabla III-1.** Componentes volátiles identificados/ cuantificados en el caldo de cultivo de *Penicillium roqueforti*.

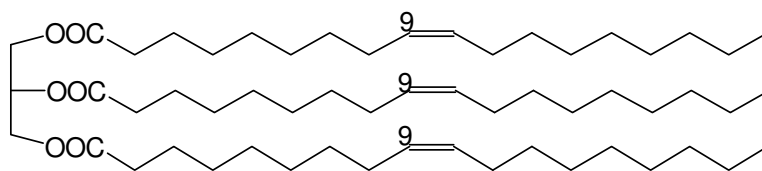


**Figura III-17.** Componentes lipídicos volátiles identificados en *Penicillium roqueforti*.

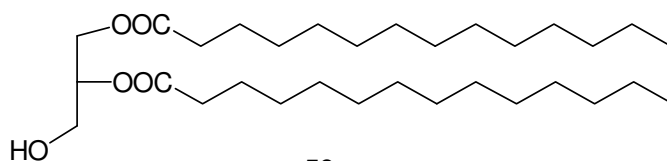


56, n=11

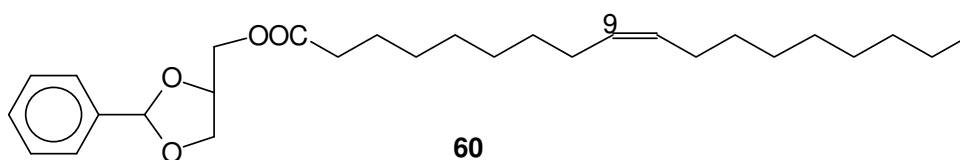
57, n=13



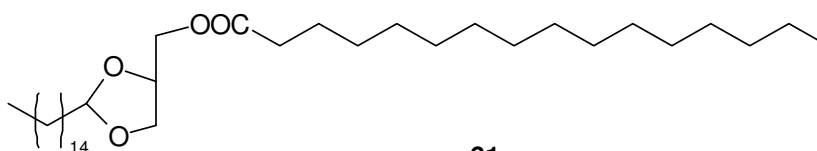
58



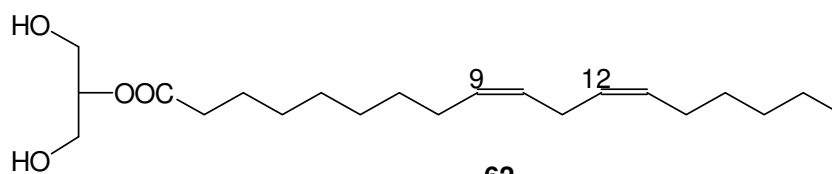
59



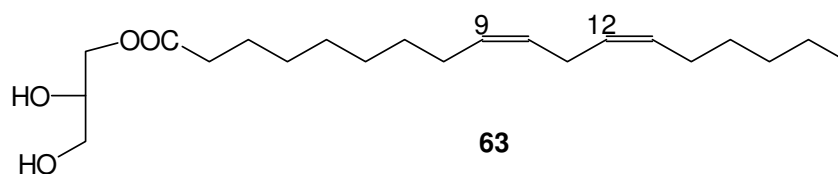
60



61

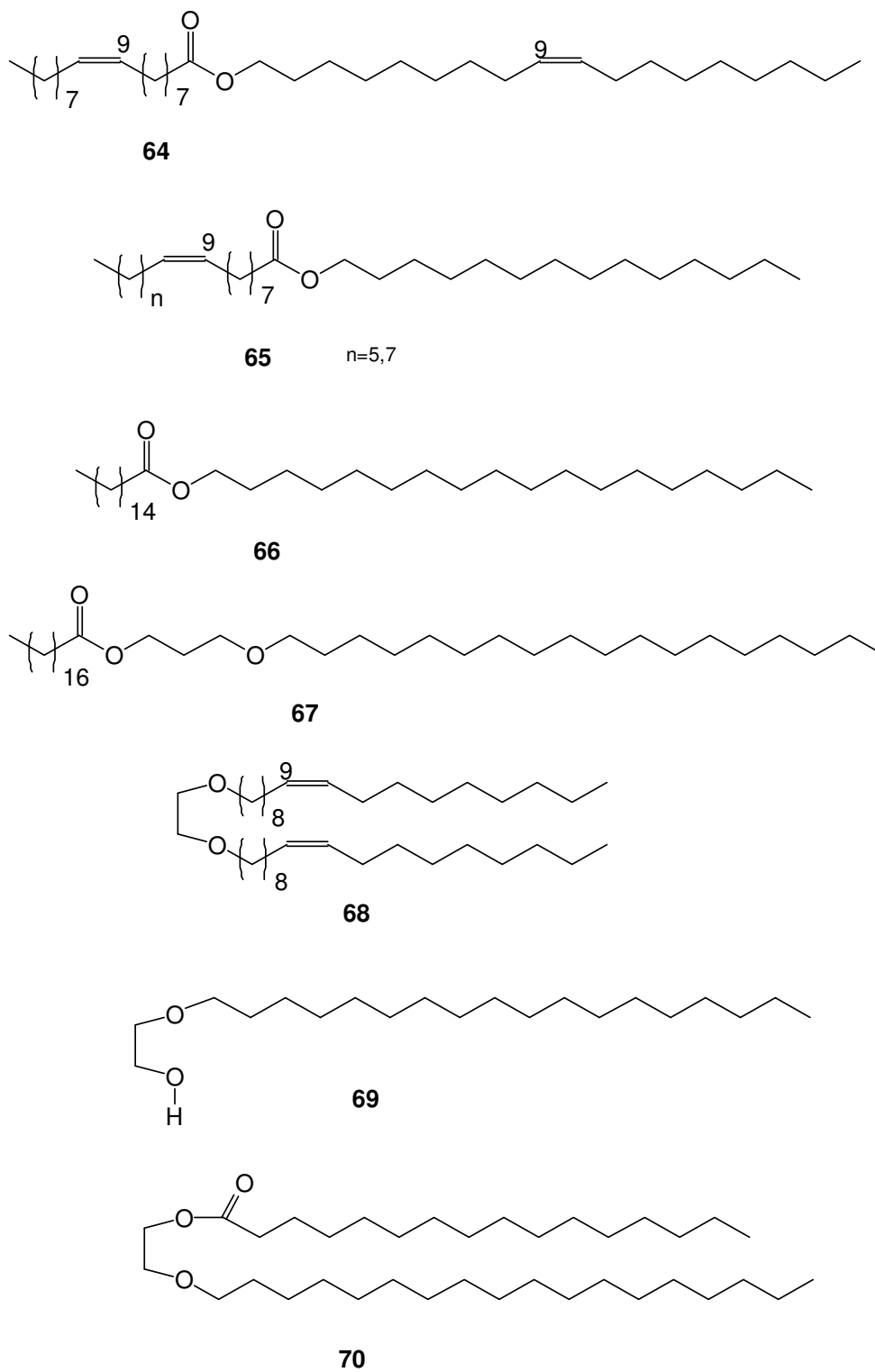


62



63

Figura III-18. Componentes lipídicos volátiles identificados en *Penicillium roqueforti*.



**Figura III-19.** Componentes lipídicos volátiles identificados en *Penicillium roqueforti*.

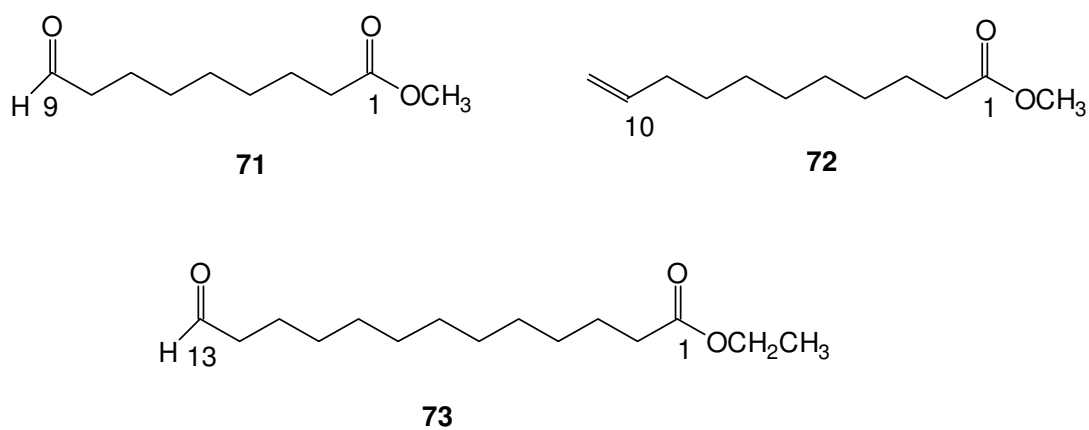


Figura III-20. Fragmentos lipídicos volátiles identificados en *Penicillium roqueforti*.

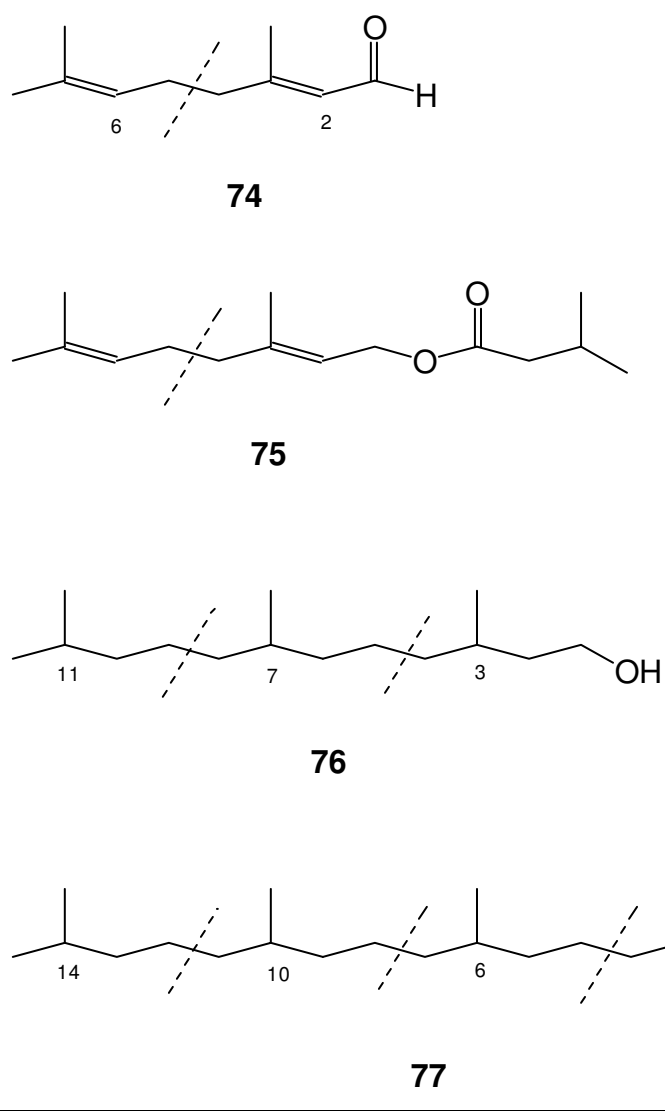
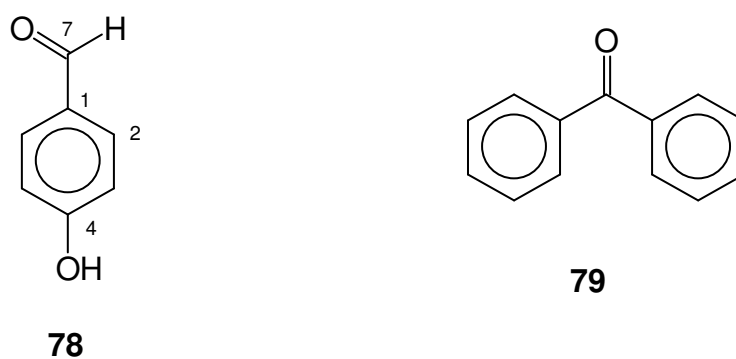
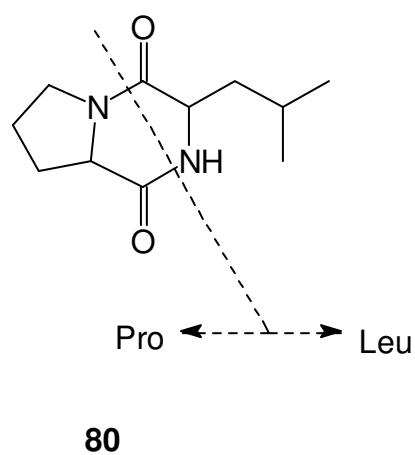


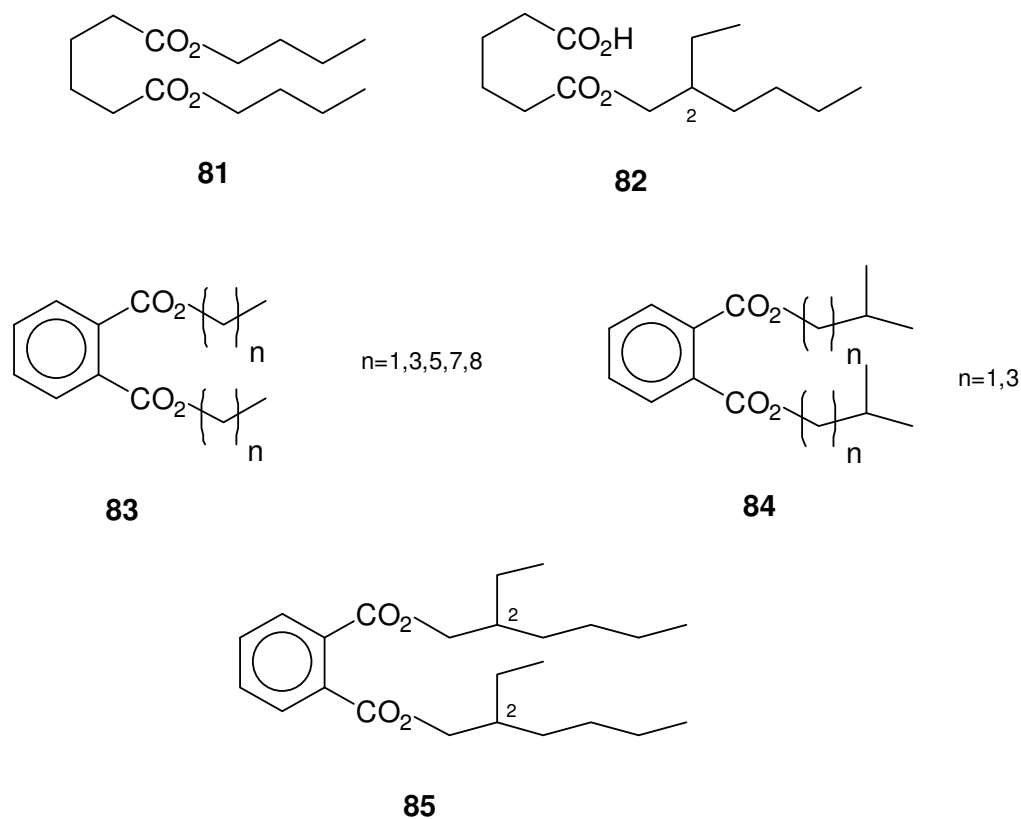
Figura III-21. Terpenoides volátiles identificados en *Penicillium roqueforti*.



**Figura III-22.** Componentes volátiles, de la ruta del ácido shikímico, identificados en *Penicillium roqueforti*.



**Figura III-23.** Componentes volátiles, de la ruta de los aminoácidos, identificados en *Penicillium roqueforti*.



**Figura III-24.** Otros componentes volátiles identificados en *Penicillium roqueforti*.

### III-3.2.3. Ausencia de toxinas en el caldo de cultivo

Los intentos de encontrar metabolitos implicados en la ruta biogénica de PR-toxina en el caldo de cultivo usado resultaron, pues, infructuosos al no detectarse ninguno de los trazadores químicos volátiles propuestos por Demyttenaere y col. (2002), Jelen (2002) y Calvert y col. (2002) (compuestos **17** y **26-36**) a pesar de que dichos componentes se encuentran en las bases de datos Nist y Wiley del equipo GC-MS utilizado. En consistencia con esta observación, tampoco se ha encontrado ni un solo componente químico no volátil que se pueda vincular biogénicamente con la PR-toxina (compuestos **6** y/ o **7-13**).

### III-3.2.4. Presencia de dipéptidos cíclicos en el caldo de cultivo

Sin embargo, hay que resaltar aquí la identificación de *ciclo-ProLeu* {3-isobutilhexahidropirrol[1,2-a]pirazin-1,4-diona} (**80**). Esta sustancia, que se había aislado previamente tanto a partir de peptona (Kosuge y Kamiya, 1960) como de diversos caldos de

cultivo fúngico (Stopsack y col., 1991), pertenece estructuralmente a una familia - dipéptidos cíclicos - que presentan un amplio espectro de actividad biológica. Así, la misma *ciclo-ProLeu* (**80**) se ha propuesto como aditivo alimentario de sabor amargo con actividad fungicida (Stopsack y col., 1991), la *ciclo-ProTyr* y la *ciclo-ProPhe*, inicialmente descritas como fitotoxinas del hongo *Alternaria alternata* (Stierle y col., 1988), han sido comercializadas como plaguicidas biorracionales por su elevada estabilidad y baja toxicidad hacia los mamíferos - el herbicida *Scythe* - (Bobylev y col., 1999), y otras han sido patentadas por su actividad antiinflamatoria y antialérgica (Orihashi y col., 2000). Obsérvese que las mismas roquefortinas C (**4**) y D (**5**), discutidas anteriormente, son dipéptidos *ciclo-TryHis* ligeramente transformados.

### III-3.2.5. Presencia de hidrocarburos y ácidos grasos libres en el caldo de cultivo

Algunos organismos marinos usan hidrocarburos sencillos o ácidos grasos, que son prácticamente insolubles en el agua de mar, como señales químicas (Yasumoto y col., 2000). En unos casos actúan como feromonas sexuales (Maier y Müller, 1986) y, en otros, como factores alelopáticos (Kakisawa y col., 1988). No es de extrañar, pues, la identificación en el caldo de cultivo de *n*-alcanos (**40**, n= 12, 14, 17-20, 23-24) y ácidos grasos libres (**44**, n= 11; **50**).

### III-3.3. Estudio químico del micelio

Después de extraer el caldo de cultivo y fraccionarlo según la Figura III-16 se rastreó minuciosamente todas las fracciones, tanto por GC-MS para sus componentes volátiles como por refraccionamiento (CCF, cromatografía en columna, cromatografía de exclusión por tamaño molecular) y estudio espectroscópico (RMN) identificándose y cuantificándose las siguientes sustancias:



### III-3.3.1. Componentes volátiles en el micelio

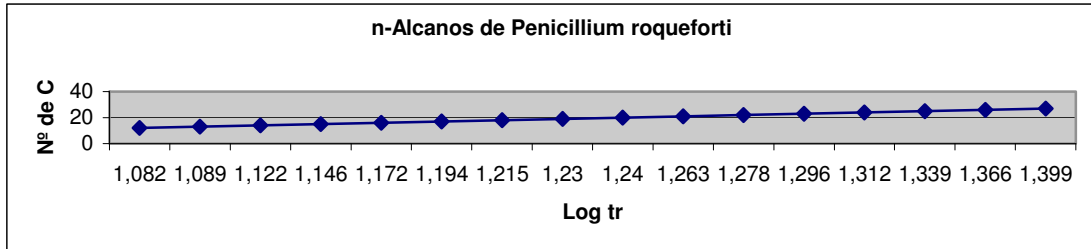
Se identificaron y cuantificaron por GC-MS, lo que rindió los datos de la Tabla III-2. Si se reúnen dichas sustancias por criterios estructurales (Figuras III-17 hasta III-24) se puede deducir que se han identificado y cuantificado *n*-alcanos (**40**), 1-alquenos (**41**), 1-alcanoles (**42**), 2-alkuil-1-alcanoles (**43**), ácidos grasos libres - saturados (**44, 48**) e insaturados (**46**) -, amidas de ácidos grasos (**51**), ésteres metílicos y etílicos de ácidos grasos - saturados (**45, 49, 56, 57**) e insaturados (**47, 52-55**) -, triglicéridos insaturados (**58**), diglicéridos (**59**), monoglicéridos - saturados (**61**) e insaturados (**60, 62, 63**) -, ceras - ésteres de ácidos y alcoholes grasos (**64, 65 y 70**) -, éteres grasos (**68**), catabolitos lipídicos (**71-73**), mono-, sesqui- y diterpenos de cadena lineal (**75-77**), hidrocarburos aromáticos de la ruta del ácido shikímico (**78, 79**) y ftalatos de dialquilo (**83-85**).

Tr (min.)		MICELIO	
		mg	ppm (mg x kg <sup>-1</sup> )
12,075	Dodecano ( <b>40</b> ; n= 9)	0,0003	0,0036
12,166 ± 0,012	Éster metílico del ácido (2-pentadecil-1,3-dioxolan-4-il) hexadecanoico ( <b>61</b> )	3,27	36,37
12,437	1-Dodecanol ( <b>42</b> ; n= 10)	0,0002	0,0022
12,524 ± 0,007	2-Butil-1-octanol ( <b>43</b> ; n= 3, m= 3)	0,39	4,34
13,235	Tetradecano ( <b>40</b> ; n= 11)	0,0058	0,065
13,252	2-Hexil-1-octanol ( <b>43</b> ; n= 3, m= 5)	0,055	0,61
13,427	(Z,Z)-1,1'-[1,2-etanodiil bis(oxi)]bis- 9-octadeceno ( <b>68</b> )	0,0005	0,0052
13,454	4-Hidroxi-benzaldehido ( <b>78</b> )	0,10	1,11
13,684 ± 0,004	Éster metílico del ácido 9-oxo-nonanoico ( <b>71</b> )	3,57	39,71
13,830	Éster metílico del ácido 10-undecenoico o ( <b>72</b> )	0,23	2,56
13,972	1-Pentadeceno ( <b>41</b> ; n= 12)	0,098	1,09
14,005	Isovalerato de geranilo ( <b>75</b> )	10,28	114,35
14,471	3,7,11-trimetil-1-dodecanol ( <b>76</b> )	0,34	3,78
14,751	Éster 1-(hidroximetil)-1,2-etanodiílico del ácido hexadecanoico ( <b>59</b> )	0,050	0,56
14,771 ± 0,005	Ácido tetradecanoico ( <b>44</b> ; n= 12)	0,0013	0,0145
14,843 ± 0,002	1-Hexadeceno ( <b>41</b> ; n= 13)	0,96	10,68
14,857 ± 0,010	1-Tridecanol ( <b>42</b> ; n= 11)	0,29	3,23
15,063 ± 0,001	Ftalato de dietilo ( <b>83</b> ; n= 1)	0,24	2,67
15,548 ± 0,006	Benzofenona ( <b>79</b> )	1,56	17,35
15,602	Éster dibutílico del ácido hexanodioico ( <b>81</b> )	0,039	0,43
15,642 ± 0,000	Heptadecano ( <b>40</b> ; n= 14)	0,024	0,27
15,655 ± 0,015	2-Hexil-1-decanol ( <b>43</b> ; n= 5, m= 5)	0,37	4,12
15,890 ± 0,008	Éster metílico del ácido tetradecanoico ( <b>45</b> ; n= 12)	0,164	1,82
15,906	Ácido pentadecanoico ( <b>44</b> ; n= 13)	0,22	2,45
16,220	Ácido cis-3-octil-oxiranooctanoico ( <b>48</b> )	0,045	0,50
16,338 ± 0,010	1-Hexadecanol ( <b>42</b> ; n= 14)	0,32	3,56
16,348 ± 0,022	1-Eicosanol ( <b>42</b> ; n= 18)	1,80	20,02

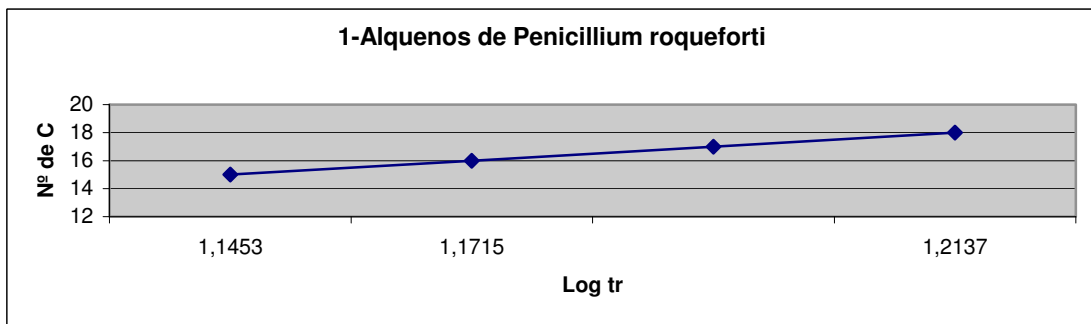
Tr (min.)		MICELIO	
		mg	ppm (mg x kg <sup>-1</sup> )
16,418	Octadecano (40; n= 15)	0,20	2,22
16,501	Éster (Z)-eicosílico del ácido 9-hexadecenoico (65; n= 5)	0,14	1,56
16,509	Éster metílico del ácido 2-octilciclopropanododecanoico (49)	0,63	7,01
16,538	Ácido 9-hexadecenoico (46; n= 5, m= 7)	1,01	11,23
16,604 ± 0,020	Éster metílico del ácido pentadecanoico (45; n= 13)	2,89	32,15
16,711	6,10,14-trimetil- 2-pentadecanona (77)	1,43	15,91
17,008 ± 0,001	Ftalato de bis(2-metilpropilo) (84; n= 1)	1,18	13,13
17,160 ± 0,015	Éster metílico del ácido (Z)-9-Hexadecenoico (47; n= 5, m= 7)	34,40	382,66
17,273 ± 0,006	Éster metílico del ácido 14-metil-pentadecanoico (56)	15,00	166,85
17,289 ± 0,019	Éster metílico del ácido hexadecanoico (45; n= 14)	169,38	1884,09
17,653 ± 0,009	Ftalato de dibutilo (83; n= 3)	20,15	224,14
17,928 ± 0,020	Éster metílico del ácido heptadecanoico (45; n= 15)	0,87	9,68
18,352	Éster etílico del ácido 13-formiltridecanoico (73)	0,099	1,10
18,360 ± 0,008	9-Octadecenamida (51)	0,86	9,57
18,385 ± 0,004	Éster metílico del ácido 11-octadecenoico (47; n= 5, m= 9)	26,18	291,21
18,389	Trioleína (58)	0,26	2,89
18,394 ± 0,009	Éster metílico del ácido 8,11-octadecadienoico (52; n= 5, m= 6)	9,06	100,78
18,550 ± 0,028	Éster metílico del ácido octadecanoico (45; n= 16)	5,46	60,73
18,558	Éster metílico del ácido 16-metil-heptadecanoico (57)	1,04	11,57
18,811	Éster 2-hidroxi-1-(hidroximetil)-etílico del ácido (Z,Z)-9,12-octadecadienoico (62)	0,064	0,71
18,962	Ácido eicosanoico (44; n= 18)	2,78	30,92
19,048 ± 0,058	Éster 2-(octadeciloxi) etílico del ácido hexadecanoico (70)	0,12	1,33
19,542	Éster metílico del ácido 7,10,13-eicosatrienoico (54)	12,60	140,16
19,748 ± 0,005	Tricosano (40; n= 20)	0,53	5,90
19,793 ± 0,024	Éster (Z,Z)-9-octadecenílico del ácido 9-Hexadecenoico (64; n= 5)	1,00	11,12
19,796	Éster (Z)-9-octadecenílico del ácido (Z)-9-octadecenoico (64; n= 7)	0,0040	0,0445
19,814 ± 0,004	Ácido (Z)-13-docosenoico ( <i>erúxico</i> ) (46; n= 7, m= 11)	0,93	10,34
19,8175 ± 0,001	Éster eicosílico del ácido (Z)-9-octadecenoico ( <i>oleico</i> ) (65; n= 7)	5,84	64,96
20,205	Éster metílico del ácido 6,9,12,15-docosatetraenoico (55)	7,73	85,98
20,413	Ftalato de bis(4-metilpentilo) (84; n= 3)	0,14	1,56
20,724	Éster metílico del ácido cis-(2-fenil-1,3-dioxolan-4-il)-9-octadecenoico (60)	0,38	4,23
21,454	Éster etílico del ácido (Z,Z)-9,12-octadecadienoico ( <i>linoleico</i> ) (53)	6,18	68,74
21,820	Pentacosano (40; n= 22)	2,86	31,81
22,143	Éster 2,3-dihidroxi-propílico del ácido (Z,Z)-9,12-octadecadienoico (63)	4,40	48,94
22,244	Éster metílico del ácido docosanoico (45; n= 20)	0,46	5,12
22,486	1-Docosanol (42; n= 20)	2,28	25,36
22,648 ± 0,003	Ftalato de bis(2-etilhexilo) (85)	0,99	11,01
22,746 ± 0,013	Ftalato de dihexilo (83; n= 5)	0,86	9,57
25,823	Éster metílico del ácido tetracosanoico (45; n= 22)	1,14	12,68
26,389 ± 0,0226	Ftalato de dioctilo (83; n= 7)	3,34	37,15
<b>Volátiles</b>		<b>369,29</b>	<b>4107,74</b>
<b>No volátiles</b>		<b>14434,71</b>	<b>160564,12</b>
<b>Totales</b>		<b>14804,00</b>	<b>164671,86</b>

**Tabla III-2.** Componentes volátiles identificados y cuantificados en el micelio de *Penicillium roqueforti*.

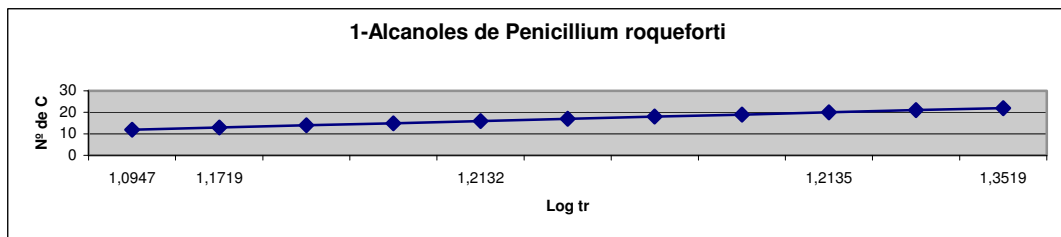
Obsérvese cómo las series homólogas de los componentes volátiles identificados se comportan de forma lineal en los gráficos que resultan de representar el tamaño de la cadena hidrocarbonada (N° de C) frente al logaritmo del tiempo de retención (log Tr) (Figuras III-25 a III-29).



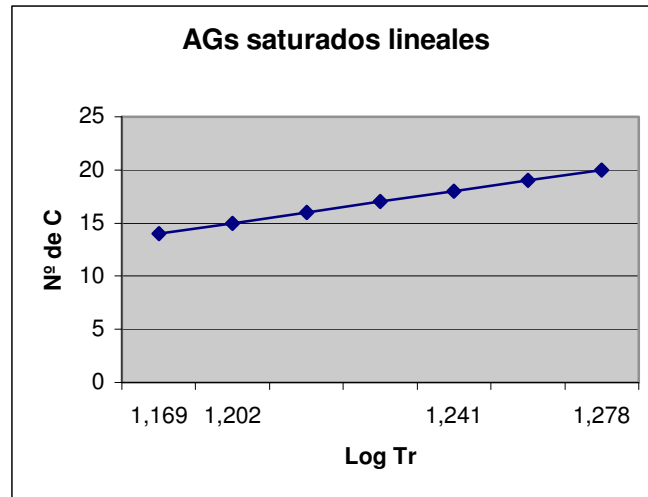
**Figura III-25.** Comportamiento en CG de los *n*-alcanos de *Penicillium roqueforti* (**40**; n= 9, 11-12, 14-15, 17-20, 22-24) y patrones comerciales (**40**; n= 10, 13, 16 y 21).



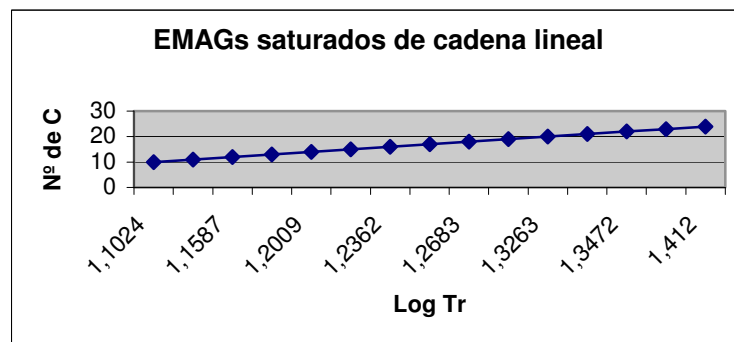
**Figura III-26.** Comportamiento en CG de los 1-alquenos de *Penicillium roqueforti* (**41**; n= 12-13) y el patrón comercial 1-octadeceno (**41**; n= 15).



**Figura III-27.** Comportamiento en CG de los 1-alcanoles de *Penicillium roqueforti* (**42**; n= 10-11, 14, 18 y 20). La posición cromatográfica del 1-eicosanol (**42**; n= 18) se comprobó por inyección de una muestra comercial del mismo.



**Figura III-28.** Comportamiento en CG de los ácidos grasos saturados de cadena lineal identificados en *Penicillium roqueforti* (44; n= 12-13 y 18) y el ácido esteárico comercial (44; n= 16).



**Figura III-29.** Comportamiento en CG de los ésteres metílicos de los ácidos grasos saturados de cadena lineal encontrados en *Penicillium roqueforti* (45; n= 12-16, 20 y 22) y varios patrones comerciales (45; n= 8-11, 17-18).

### III-3.3.1.1. Presencia de ésteres metílicos de ácidos grasos ramificados en el micelio

Los ácidos grasos metilramificados están ampliamente distribuidos en la naturaleza (Duncan y col., 1974; Perry y col., 1979; Seyama y col., 1983; Thiel y col., 1999; Carballeira y col., 2001; Nechev y col., 2002). Ahora se sabe que se forman por incorporación selectiva del metilmalonil-CoA por el enzima “ácido-graso-sintetasa” (Seyama y col., 1983) y que este paso biogénico es característico de bacterias que producen relativamente altas concentraciones de estos ácidos grasos *iso-* y *anteiso-*metilramificados, los cuales son, por tanto, aceptados como marcadores moleculares de la materia orgánica de origen bacteriano (Leo y Parker, 1966; Cooper

y Blumer, 1968, Cranwell, 1973; 1974; Grimalt y Albaigés, 1990; Kaneda, 1991; Carballeira y col., 2001). Es por ello que la identificación en *P. roqueforti* de los ésteres metílicos de los ácidos 14-metilpentadecanoico (**56**) y 16-metilheptadecanoico (**57**) - dos derivados de ácidos grasos *iso*-metilramificados -, es un indicio de la presencia de bacterias del genero *Mycobacterium* asociadas a este hongo (Lambert y col., 1986; Chou y col., 1996, Carballeira y col., 2001; Nechev y col., 2002). Aparte de su identificación por la huella dactilar en GC-MS, las *iso*-metilsustituciones propuestas en **56** y **57** se confirmaron por los fragmentos relativamente intensos que se observan en GC-MS para  $M^+$ -43 (m/z 227 y 255 respectivamente) junto a la disminución de las intensidades de los fragmentos  $M^+$ -29 (m/z 241 y 269 respectivamente) (Anderson, 1978).

#### III-3.3.1.2. Presencia de ftalatos de dialquilo en el micelio

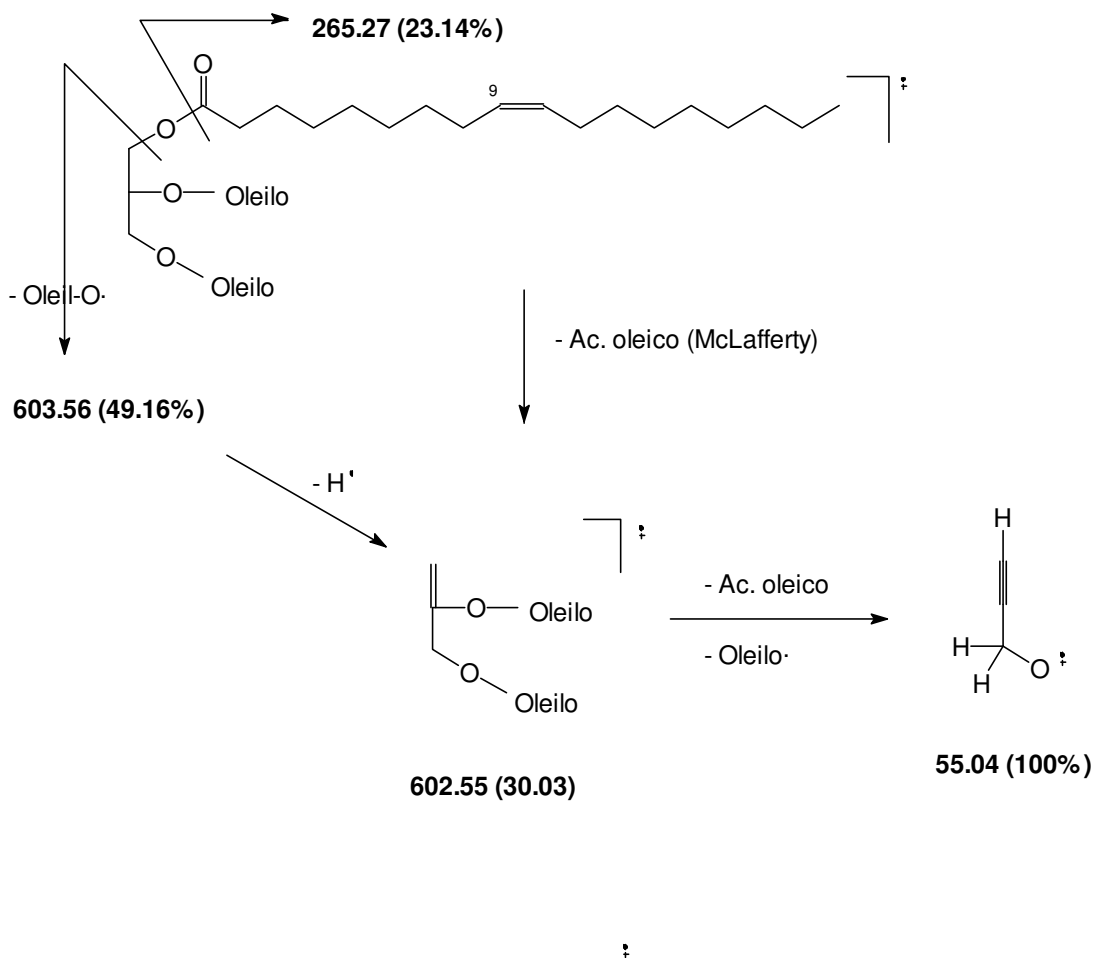
El ftalato de bis-(2-etilhexilo) (**85**) se ha propuesto anteriormente como un auténtico metabolito en el hongo *Penicillium olsonii* (Amade y col., 1994). Sin embargo, esta sustancia, conocida tanto por las siglas internacionales DEHP {di(2-ethylhexyl)phthalate} como DOP (dioctylphthalate) se usa ampliamente como plasticida del PMMA {poly(methyl methacrylate)} y el PVC {poly(vinyl chloride)}. Esta sustancia emigra de los materiales plásticos y se introduce en los fluidos biológicos donde se bioacumula con el paso del tiempo, fenómeno que ha provocado incluso problemas de salud en seres humanos que han estado expuestos a diversos materiales plásticos (Freemantle, 2004). Es por ello que la identificación de las sustancias **83-85**, tanto en el caldo de cultivo como en el micelio de *P. roqueforti* plantea dudas sobre su origen debido a que el cultivo masivo se realizó, precisamente, en recipientes de plástico (ver parte experimental).

### III-3.3.2. Componentes no volátiles identificados y cuantificados en el micelio de *P. roqueforti*

El material “no volátil” obtenido a partir del micelio fue fraccionado y analizado por espectroscopía (fundamentalmente RMN) lo que ha llevado a deducir que está constituida sólo por alcanos de alto peso molecular (**40**; 1,29 %), ceras con estructura molecular del tipo **64-67** (0,37 %), ceras esteroidales insaturadas (1,11 %), ceras de otros tipos (2,73 %), ftalatos de alquilo de alto peso molecular (3,15 %), triglicéridos insaturados (trioleína **58** y otros; 2,56 %), peróxido del ergosterol (**86**; 12,63 %), 9(11)-dehidroperóxido del ergosterol (**87**; 2,15 %), 4-hidroxibenzaldehído (**78**; 0,92 %), fosfo- y glicolípidos no identificados (0,31 %) y compuestos polihidroxílicos - manitol **89** y la hexosa **92** - (72,78 %). Obsérvese que algunos de estos compuestos fueron descritos en el apartado anterior por haber sido detectados también como componentes volátiles.

Entre estos componentes lipídicos no volátiles se pudieron purificar y caracterizar sólo las sustancias mayoritarias, a saber: trioleína (**58**), peróxido del ergosterol (**86**) y 9(11)-dehidroperóxido del ergosterol (**87**). Entre los componentes aromáticos monocíclicos de la ruta del ácido shikímico se pudo purificar y caracterizar el 4-hidroxibenzaldehído (**78**). Entre los componentes del metabolismo primario se identificaron el manitol (**89**) y una hexosa (**92**).

La trioleína (**58**) se aisló pura a partir de la fracción menos polar del extracto del micelio como un aceite amarillento. En su espectro de IR se observan bandas a 3029,48; 3006,99 y 1653,08 (CH=CH); a 1738,68 (C=O) y a 1232,81 (C-O) y en su espectro de masas (Figura III-30) se observan fragmentaciones típicas de un trioleato de alquilo.

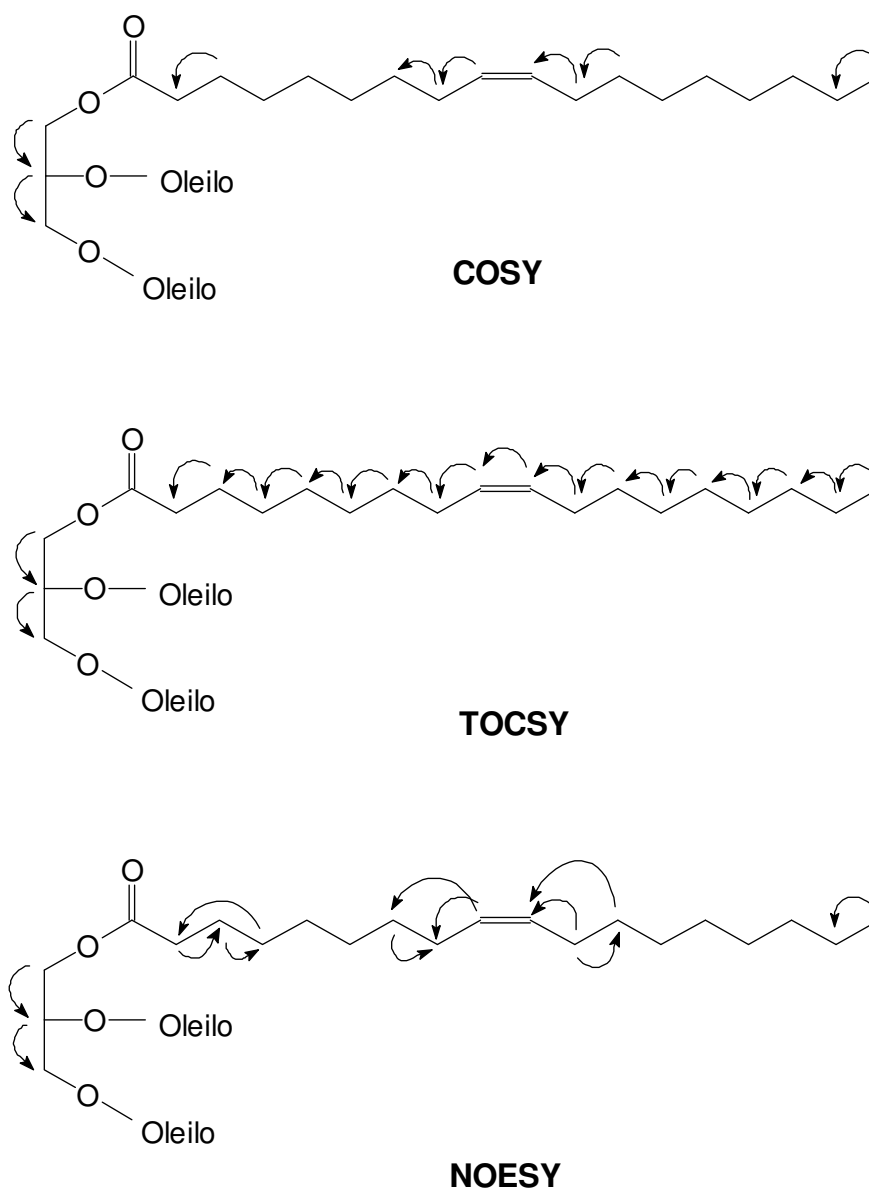


**Figura III-30.** Fragmentaciones que presenta en espectrometría de masas el triglicérido trioleína.

En su espectro de <sup>1</sup>H-RMN se observan seis protones olefínicos a δ 5,34; cinco protones geminales a oxígeno a δ 5,27 (1H, dd, J= 4,3 Hz; J= 5,9 Hz); 4,30 (2H, dd, J= 4,3 Hz; J= 11,9 Hz) y 4,14 (2H, dd, J= 5,9 Hz; J= 11,9 Hz); seis hidrógenos en alfa a carbonilo a δ 2,30; doce hidrógenos alílicos a δ 2,01; seis hidrógenos en beta a carbonilo a δ 1,61; sesenta hidrógenos de metilenos de cadenas hidrocarbonadas lineales a δ 1,27; y nueve hidrógenos de los metilos terminales a δ 0,89.

En su espectro de <sup>13</sup>C-RMN se observan tres señales correspondientes a carbonilos de ésteres a δ 173,73; 173,132 y 172,723; señales típicas de dobles enlaces a δ 129,892 y 129,592; carbonos enlazados a oxígeno a δ 68,810 y 62,006; y catorce señales típicas de metilenos y metilos a δ 34,092- 14,018.

Finalmente, los espectros de correlación  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (COSY, TOCSY y NOESY) son consistentes con la estructura asignada a este metabolito (Figura III-31).



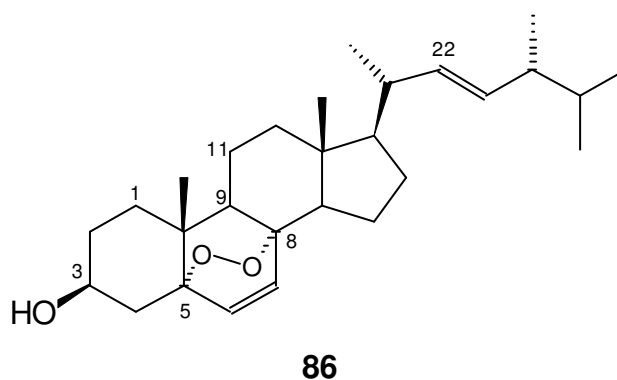
**Figura III-31.** Correlaciones  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  observadas en los espectros en dos dimensiones del triglicérido trioleína.

Otra sustancia que se pudo aislar y caracterizar espectroscópicamente es el  $5\alpha,8\alpha$ -epidioxiergosta-6,22-dien- $3\beta$ -ol, a la que se denomina usualmente como peróxido del ergosterol (**86**). El producto, que cristaliza a partir de metanol, posee un punto de fusión de 178- 180 °C y una rotación óptica específica de  $-25^\circ$ . Su espectro de masas de alta resolución muestra un pico



correspondiente al ión molecular a  $m/z$  428,32890 ( $C_{28}H_{44}O_3$ ). En este espectro se observan, además de la ruptura típica de la cadena lateral del ergosterol ( $m/z$  303,19601), pérdidas de agua ( $m/z$  410,31140) y de oxígeno ( $m/z$  396,33612). Esta última fragmentación tiene una intensidad del 33,6 % del pico base en el espectro de masas, hecho que confirma la existencia de un puente peroxídico. En el espectro IR aparece una señal estrecha a  $3618,18\text{ cm}^{-1}$  y otra ancha entre  $3600,00$  y  $3200,00\text{ cm}^{-1}$  correspondientes a un grupo hidroxilo (libre y asociado respectivamente) y una banda a  $973,53\text{ cm}^{-1}$  característica de un doble enlace trans en C-22 (González y col., 1983).

El espectro de  $^1\text{H}$ -RMN muestra dos multipletes en  $\delta$  5,12 y 5,08 característicos de un doble enlace en posición 22 sobre la cadena lateral del ergosterol, así como un sistema AB centrado en  $\delta$  6,33 ( $\delta_A$  6,46 y  $\delta_B$  6,20 con  $J_{AB} = 8,40\text{ Hz}$ ) característico de un puente endoperóxido entre los carbonos 5 y 8 de los ergosteroides. Dicho puente de oxígeno se confirma en el espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN (Tabla III-3) con las señales a  $\delta$  82,135 y 79,406 asignadas a los carbonos 5 y 8 respectivamente. Obsérvese que el resto de las señales desplazadas en los espectros de protón y de carbono (Tabla III-3) son consistentes con la estereoestructura **86**.



**Figura III-32.**  $5\alpha, 8\alpha$ -Epidioxiergosta-6,22-dien-3 $\beta$ -ol (*Peróxido del ergosterol*).

C	$\delta$ ( $^{13}\text{C}$ )	$\delta$ ( $^1\text{H}$ )
18	12,859	0,771 (3H, s)
28	17,547	0,863 (3H, d, J= 6,8 Hz)
19	18,163	0,839 (3H, s)
21	19,624	0,954 (3H, d, J= 6,4 Hz)
26	19,932	0,772 (3H, d, J= 6,8 Hz)
27	20,617	0,788 (3H, d, J= 6,4 Hz)
11	20,866	
15	23,389	
4	28,630	
16	29,686	
2	30,106	
25	33,053	
1	34,683	1,0- 2,2 (20 H, m)
10	36,956	
12	39,335	
20	39,712	
24	42,760	
13	44,550	
9	51,081	
14	51,671	
17	56,195	
3	66,465	3,93 (m, 1H)
8	79,406	
5	82,135	
7	130,733	6,46 (1H, d, J= 8,40 Hz), sist. AB
23	132,295	5,12 (1H, m)
22	135,183	5,08 (1H, m)
6	135,390	6,20 (1H, d, J= 8,40 Hz), sist. AB

**Tabla III-3.** Espectros ( $^{13}\text{C}$ -RMN y  $^1\text{H}$ -RMN,  $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) del peróxido del ergosterol (86).

Por otra parte, en el espectro DEPT se desplazan señales positivas para 6  $\text{CH}_3$ , 7 CH y 4  $\text{C}=\text{CH}$ , así como negativas para 7  $\text{CH}_2$ .

En el espectro  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY se observa correlación entre los protones olefínicos que conforman el sistema AB a  $\delta$  6,20 y 6,46; así como entre los protones olefínicos en C-22 y C-23 y los metinos alílicos sobre C-20 ( $\delta$  1,99) y C-24 ( $\delta$  1,82).

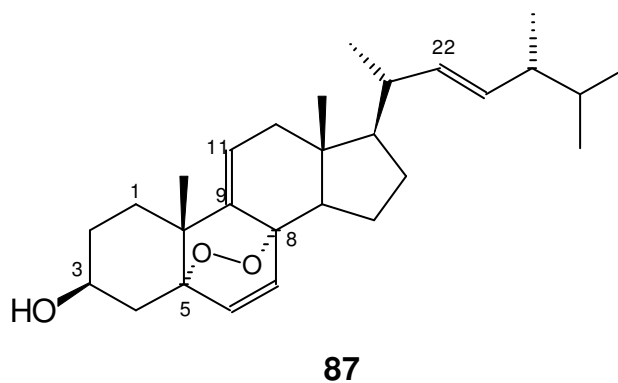
En el espectro HSQC se observa correlación entre los dos protones olefínicos centrados en  $\delta$  6,20 y 6,46 y los dos carbonos olefínicos directamente enlazados a ellos y que desplazan señales en  $\delta$  135,390 y 130,733; osea, el H sobre C-6 y el propio C-6 por un lado y el H sobre C-7 con el

propio C-7 por otro. También se observa correlación entre los dos protones olefínicos centrados en  $\delta$  5,08 y 5,12 y los dos carbonos olefínicos directamente enlazados a ellos que desplazan señales en  $\delta$  135,183 y 132,295; o sea, el H sobre C-22 y el propio C-22 por un lado y el H sobre C-23 y el propio C-23 por otro. El resto de las correlaciones carbono-protón que se observan en este espectro son consistentes con las asignaciones propuestas en la Tabla III-3.

En el espectro HMBC se observa correlación entre los dos protones olefínicos en C-7 ( $\delta$  6,46) y C-6 (6,20) y los dos carbonos puente del endoperóxido (C-5 a  $\delta$  82,135 y C-8 a  $\delta$  79,406). También entre los dos protones olefínicos en C-22 ( $\delta$  5,08) y C-23 ( $\delta$  5,12) y los carbonos vecinales C-20 ( $\delta$  39,712) y C-24 ( $\delta$  42,760) respectivamente.

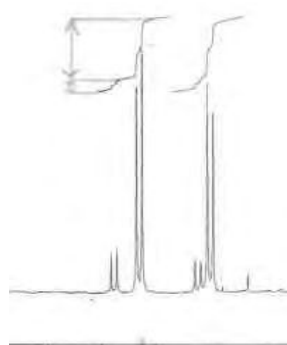
Otra sustancia, que no se pudo aislar en su forma pura, se presenta mezclada con el anteriormente descrito peróxido del ergosterol (**86**) conformando con él un sólido blanco con p.f.= 171-176 °C y  $[\alpha]_D^{20} = -9,7$  (CHCl<sub>3</sub>, c 1,2). En el espectro IR aparece una señal ancha entre 3600 y 3200 cm<sup>-1</sup> correspondiente a grupos hidroxilo y su espectro de masas muestra un pico correspondiente al ión molecular a 428,32761 (4,7 %, C<sub>28</sub>H<sub>44</sub>O<sub>3</sub>), acompañado de otra señal a 426,31196 (1,5 %, C<sub>28</sub>H<sub>42</sub>O<sub>3</sub>). En este espectro se observan además las rupturas típicas de la cadena lateral del ergosterol (M-C<sub>9</sub>H<sub>17</sub> a m/z 303,19458 y 301,17893), la pérdida de oxígeno (M-O<sub>2</sub> a m/z 396,33778 y 394,32213) y de agua (M-H<sub>2</sub>O a m/z 410,31703 y 408,30139).

El espectro de <sup>1</sup>H-RMN muestra un multiplete en  $\delta$  5,2 característico de un doble enlace en posición 22 sobre la cadena lateral del ergosterol y dos sistemas AB superpuestos y centrados en  $\delta$  6,41 y 6,48 respectivamente con J= 8,7 Hz para ambos.



**Figura III-33.**  $5\alpha$ ,  $8\alpha$ -Epidioxiergosta-6, 9(11), 22-trien-3 $\beta$ -ol [9(11)-Dehidroperóxido del ergosterol].

Después de consultar la bibliografía se ha identificado este material como una mezcla del peróxido del ergosterol y su 9(11)-dehidroderivado (Fisch y col., 1973). La relación cuantitativa de estos productos en nuestra mezcla se obtuvo por integración de los protones olefínicos del sistema AB en el espectro de RMN (400 MHz), resultando que se trata de una mezcla de peróxido del ergosterol (**86**) (79 %) y 9(11)-dehidroperóxido del ergosterol (**87**) (21 %).



**Figura III-34.** Integración de las señales correspondientes a los hidrógenos  $C_6\text{-H}$  y  $C_7\text{-H}$  en el espectro de una mezcla de los endoperóxidos **86** (79 %) y **87** (21 %) a 400 MHz.

Esta relación cuantitativa se confirmó por el método de las rotaciones ópticas. Según éste, se ha construido un gráfico representando los valores experimentales de la rotación óptica de la mezcla frente al porcentaje de peróxido de ergosterol. Al entrar en esta gráfica los datos de la rotación óptica aportados por Fisch y col. (1973) por un lado y Mediavilla (1984) por otro (Tabla III-4) se observó una relación lineal entre el valor de  $[\alpha]_D$  y el porcentaje de peróxido de ergosterol:

$$\% \text{ Peróxido ergosterol} = 70 - 0,91 \times [\alpha]_D$$

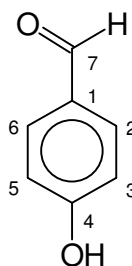
<b>Mezcla 0: 100 {9(11)-dehidroperóxido del ergosterol puro}</b>	<b>+ 80,0</b>
Nuestra mezcla (fracción Prm-L-2-b-1)	-9,7
Mezcla 81,5: 18,5 (Mediavilla, 1984)	-12,5
Mezcla 84: 16 (Fisch y col., 1973)	-14,2
Mezcla 100: 0 (Peróxido de ergosterol puro)	-32,9

**Tabla III-4.** Rotación óptica descrita para mezclas de peróxido del ergosterol (**86**) y el 9(11)-dehidroperóxido del ergosterol (**87**).

Al entrar en esta ecuación el valor de la rotación óptica obtenida para este material ( $[\alpha]_D^{20} = -9.7$ ) resultó un valor para el % de peróxido del ergosterol de 78,8; dato que consideramos consistente con el 79,0 % obtenido por integración del espectro de  $^1\text{H}$ -RMN. Finalmente, resaltar que en el espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de esta mezcla pueden observarse las pequeñas señales de los seis carbonos olefínicos del 9(11)-dehidroperóxido del ergosterol, siendo relevantes las señales asignadas para el carbono 9 a  $\delta$  130,970 ( $\delta$  51,081 en el peróxido del ergosterol) y el carbono 11 a  $\delta$  125,000 ( $\delta$  20,866 en el peróxido del ergosterol). También el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de esta mezcla muestra una señal a  $\delta$  5,48 (0,21 H, m) que hemos asignado al protón vinílico sobre el carbono 11.

Por otra parte, el 4-hidroxibenzaldehído (**78**) se obtuvo puro por cristalización a partir de metanol (p.f.= 121- 122 °C). Su estructura se elucidó a partir de sus datos espectroscópicos,

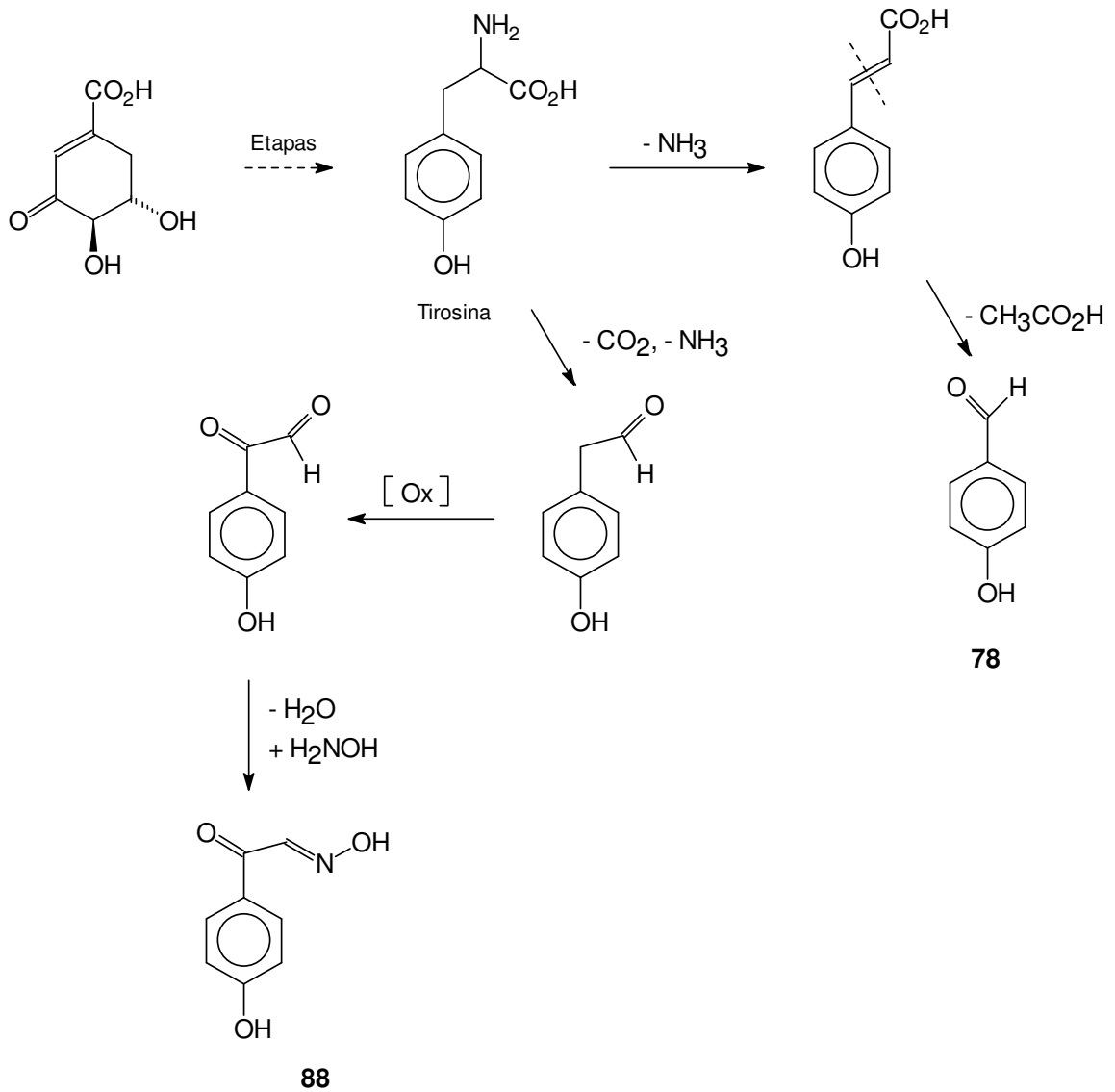
fundamentalmente la espectroscopía de RMN (Tabla III-5), la cual delata a un sistema aromático monocíclico p-disustituido mediante las señales características de un sistema AB producido por el acoplamiento de los protones aromáticos en orto. En el espectro IR se aprecian bandas a 3590,81  $\text{cm}^{-1}$  (-OH libre); 3338,71  $\text{cm}^{-1}$  (-OH asociado); 3002,84  $\text{cm}^{-1}$  (Ar-H) y 1687,99  $\text{cm}^{-1}$  (C=O conjugado con anillo aromático); y, finalmente, en el espectro de masas se detecta el ión molecular a  $m/z = 106,0794$ . Todos estos datos son consistentes con la estructura asignada (**78**). Por otra parte, las asignaciones del espectro de  $^{13}\text{C}$  (Tabla III-5) se apoyaron en el espectro  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -COSY, en el que se aprecia correlación entre la señal a  $\delta$  132,195 ( $\text{C}_2$  y  $\text{C}_6$ ) de la proyección de carbono y la señal a  $\delta$  7,812 ( $\text{C}_2\text{-H}$  y  $\text{C}_6\text{-H}$ ) de la proyección de protón por un lado y entre la señal a  $\delta$  115,556 ( $\text{C}_3$  y  $\text{C}_5$ ) de la proyección de carbono y la señal a  $\delta$  6,948 ( $\text{C}_3\text{-H}$  y  $\text{C}_5\text{-H}$ ) de la proyección de protón por otro. Además, todos los espectros de correlación protón-protón (COSY, TOCSY y NOESY) demuestran proximidad estructural entre los protones aromáticos ( $\text{C}_2\text{-H} \rightarrow \text{C}_3\text{-H}$  y  $\text{C}_6\text{-H} \rightarrow \text{C}_5\text{-H}$ ), lo que nos confirma que, en efecto, se encuentran en disposición “orto”.

**78****Figura III-35.** 4-Hidroxibenzaldehído

C	$\delta$ ( $^{13}\text{C}$ ), $\text{CDCl}_3/\text{DOCD}_3$	$\delta$ ( $^1\text{H}$ ), $\text{CDCl}_3$
1	128,299	7,812 (2H, d, J= 8,541 Hz)
2 y 6	132,195	6,949 (2H, d, J= 8,541 Hz)
3 y 5	115,556	
4	163,226	9,881 (1H, s)
7	191,584	5,522 (1H, s, -OH)

**Tabla III-5.** Espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN y  $^1\text{H}$ -RMN del 4-hidroxibenzaldehído (300 MHz).

Esta sustancia, si bien es la primera vez que se la describe en hongos, está estructuralmente relacionada con otros metabolitos previamente conocidos en este tipo de organismos e implicados en la ruta del ácido shikímico, como la oxima del 2-(4-hidroxifenil)-2-oxacetaldehido (**88**; Figura III-36), metabolito aislado previamente de *Penicillium olsonii* (Amade y col., 1994).



**Figura III-36.** Ruta del ácido shikímico produciendo las alomonas **78** (en nuestra cepa de *Penicillium roqueforti*) y **88** (en una cepa de *Penicillium olsonii*).

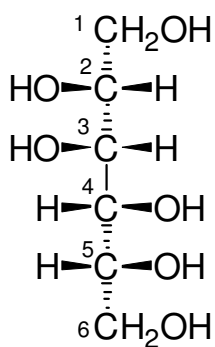
Este resultado plantea dudas sobre su origen biogénico en la esponja marina *Isodictya erinacea*, a partir de la cual ha sido aislado, asignándosele un papel de alomona dado que repele al mayor depredador de esponjas presente en su hábitat, la estrella marina *Perknaster fuscus* (Moon y col., 1998). Tras este descubrimiento, adquiere importancia la idea de que podría ser producida por algún hongo simbiote que habita sobre la mencionada esponja. Apoyando esta idea está el hecho de que otras alomonas de naturaleza fenólica hayan sido identificadas entre los componentes volátiles de otras esponjas (Nechev y col., 2002), ostras (Chung y col., 2001) y algas (Kamenarska y col., 2000).

En la fracción más polar se identificaron los compuestos polihidroxicos **89** y **92**. Así, del espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de la misma, disuelta en  $\text{DOCD}_3$ , se deduce la estructura de un monosacárido en su forma de  $\alpha$ -piranosa { $\delta$  5,10 (1H, d,  $J = 3,6$  Hz,  $\text{CH}$  anomérico); 3,83- 3,21 (9H, m,  $\text{OH}$ ,  $\text{NH}$ ,  $\text{CH} + \text{CH}_2$  geminales a oxígeno u otro heteroátomo)}. La posición del protón anomérico - el protón sobre C-1- en el espectro de  $^1\text{H}$ -NMR aparece en todas las piranosas a campos magnéticos relativamente bajos ( $\delta$  4,42- 5,42) debido a que el carbono al cual está unido, C-1, está enlazado a dos átomos de oxígeno electrón atrayentes (Van der Veen, 1963). Por otra parte, según la bibliografía (Van der Veen, 1963), los protones anoméricos de los isómeros  $\alpha$  (aquellos en los que el hidroxilo del carbono anomérico es  $\alpha$ ) resuenan, cuando las muestras se disuelven en  $\text{D}_2\text{O}$ , a  $\delta$   $5,22 \pm 0,01$  (en  $\text{DOCD}_3$  aparecerían a  $\delta$  aún más bajos) y muestran constantes de acoplamiento  $J_{1,2} = 3,2 \pm 0,5$  Hz, características de acoplamientos axial-ecuatorial. Por otra parte, también se sabe que la sustitución del grupo hidroxilo en C-2 por un grupo  $-\text{NH}_3^+\text{Cl}^-$  o un grupo  $-\text{NHCOCH}_3$  tiene un marcado efecto sobre el desplazamiento químico del protón anomérico adyacente (Van der Veen, 1963). Además, en la mayor parte de los monosacáridos en que es posible la mutarrotación, la resonancia del protón anomérico del isómero  $-\beta$  es más intensa que la del isómero  $-\alpha$ , con la excepción, precisamente, de la N-acetil glucosamina, que desplaza sólo una señal achacable al protón anomérico del isómero  $-\alpha$  ( $\delta$  5,19;  $J_{1,2} = 2,7$  Hz en  $\text{D}_2\text{O}$ ), habiéndose justificado mediante la hipótesis de un puente de hidrógeno O-



H<sup>17</sup>N entre el hidroxilo axial y el NHCOCH<sub>3</sub> ecuatorial de la forma -α (Van der Veen, 1963). El espectro de <sup>13</sup>C-RMN también es consistente con dicha deducción (δ 94,897 para el carbono anomérico y 74,383- 54,716 para los otros cinco carbonos), y es consistente con los datos previamente publicados para la glucosamina y sus derivados (Bock y Pedersen, 1974).

Mediante un análisis de esta fracción por HPLC con una columna Shodex OH Pak SB806 HQ termostatada a 30 °C (agua con un 0,05 % de NaN<sub>3</sub> como eluyente a un flujo de 1,0 ml/ min. y un detector de índice de refracción), después de filtrarla a través de un cartucho Sep-Pak C<sub>18</sub> de Waters se dedujo que está constituida por dos componentes, uno minoritario (30,63 %) cuyo tiempo de retención coincide con el del D-(-)-manitol (Tr= 11,481) y otro mayoritario (69,11 %) cuyo tiempo de retención (Tr= 12,711) se aproximó al de muestras auténticas de monosacáridos comerciales como D-(+)-glucosa (Tr= 11,481) o D-(+)-Manosa (Tr= 11,188). Un estudio más detallado de los espectros de <sup>1</sup>H-RMN y <sup>13</sup>C-RMN confirmó las deducciones anteriores observándose el espectro de la sustancia minoritaria {coincidente con el de una muestra auténtica del D-(-)-manitol} (Tabla III-6) superpuesto al de una hexosa en su forma de piranosa. Es por ello que le hemos asignado la estructura de D-(-)-manitol (**89**) a dicho metabolito minoritario (Tabla III-6).



**89**

**Figura III-37.** D-(-)-Manitol

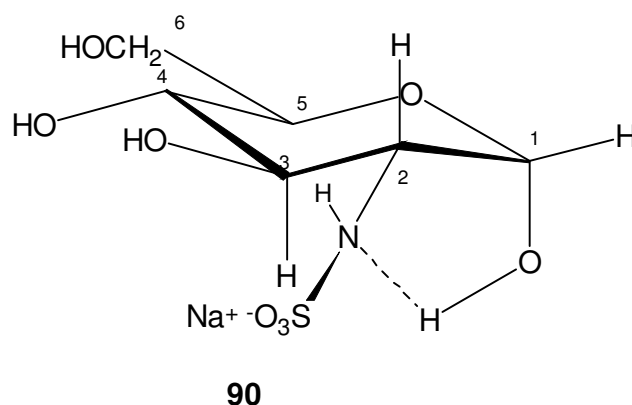
C	$\delta$ ( $^{13}\text{C}$ ), $\text{DOCD}_3$	$\delta$ ( $^1\text{H}$ ), $\text{DOCD}_3$
1 y 6	128,299	
2 y 5	132,195	3,82752 – 3,59146 (8H)
3 y 4	115,556	2,15096 (0,7H)

**Tabla III-6.** Espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN y  $^1\text{H}$ -RMN del D-(-)-Manitol (**89**) (300 MHz).

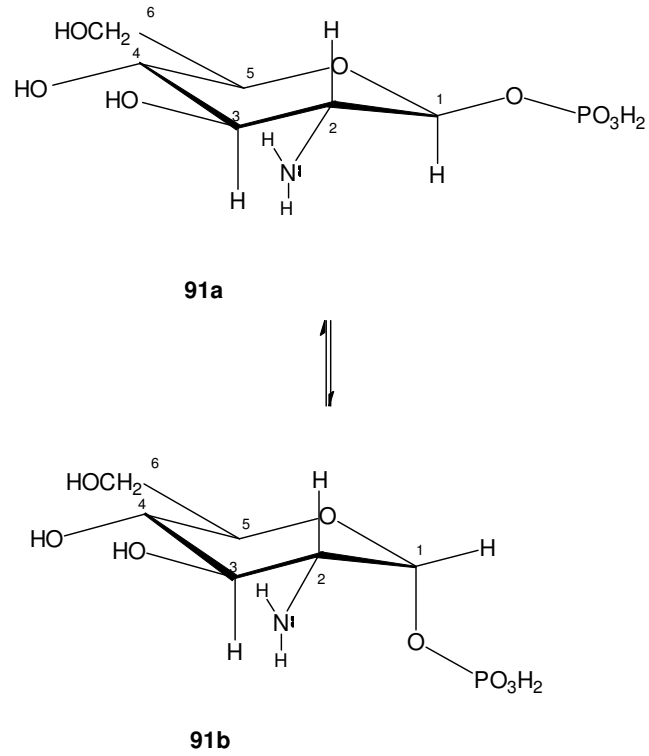
Una comparación de los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN de la piranosa desconocida - es el componente mayoritario - con los de la  $\alpha$ -D-(+)-glucosa, el clorhidrato de la  $\alpha$ -D-(+)-glucosamina y la sal sódica de la  $\alpha$ -D-(+)-glucosamina 2-sulfato (Tabla III-7) indica que se diferencia de estas piranosas, fundamentalmente, en la posición de algunas señales, como la correspondiente al carbono anomérico (a  $\delta$  94,897) y el protón sobre C-2 que se desplaza en forma de un doble doblete a  $\delta$  3,4685 ( $J_{1,2} = 3,6$  Hz;  $J_{2,3} = 9,8$  Hz). En este sentido, tanto el espectro  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY como el TOCSY y el NOESY muestran una clara correlación entre el protón anomérico a  $\delta$  5,0998 y el mencionado doble doblete a  $\delta$  3,4685. Ello permite asignar esta señal al protón unido al carbono 2 del anillo de piranosa, el cual, por otro lado, se acopla con el protón enlazado al carbono 3 con una constante de acoplamiento típicamente *trans*-diaxial de  $J_{2,3} = 9,8$  Hz. Una constante de acoplamiento  $J_{1,2}$  de 3,6 Hz indica, por otro lado, que estamos ante una glucopiranosa de la serie  $-\alpha$  (Walker y col., 1978) y un desplazamiento químico del protón anomérico a  $\delta$  5,0998 es consistente, según la bibliografía (Hall y col., 1983), con una estructura de glucosamina N-fosforilada. Por cromatografía en columna –baja presión, fase reversa- se pudo acceder a una muestra cristalina de este componente. Un espectro de masas de alta resolución consistente con la fórmula  $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_8\text{NP}$  y los datos de RMN (Tabla III-7) son consistentes con los descritos en la bibliografía para un 2-deoxy, 2-amino azúcar descrito en la bibliografía para el micelio de *Penicillium notatum*, y cuya estructura quedó sin elucidar (Applegarth, 1966). Apoyando esto resultó que el análisis químico de la pared celular de *Penicillium roquefortii*

resultó muy similar al de *Penicillium notatum*, encontrándose en la misma tanto fosfato como hexosaminas (Applegarth y Bozoian, 1968). Por otra parte, y en consistencia con estos datos bibliográficos, un ensayo positivo con molibdato del producto separado por cromatografía en columna indica que, en efecto, se trata de un éster del ácido fosfórico (Hanes y Isherwood, 1949; Harris y Turvey, 1970a,b; Inoue y Nagasawa, 1973; Yoza y col., 1977; Tshako y col., 1980; Mulloy y col., 1994; Ojala y col., 1995; Yates y col., 1995).

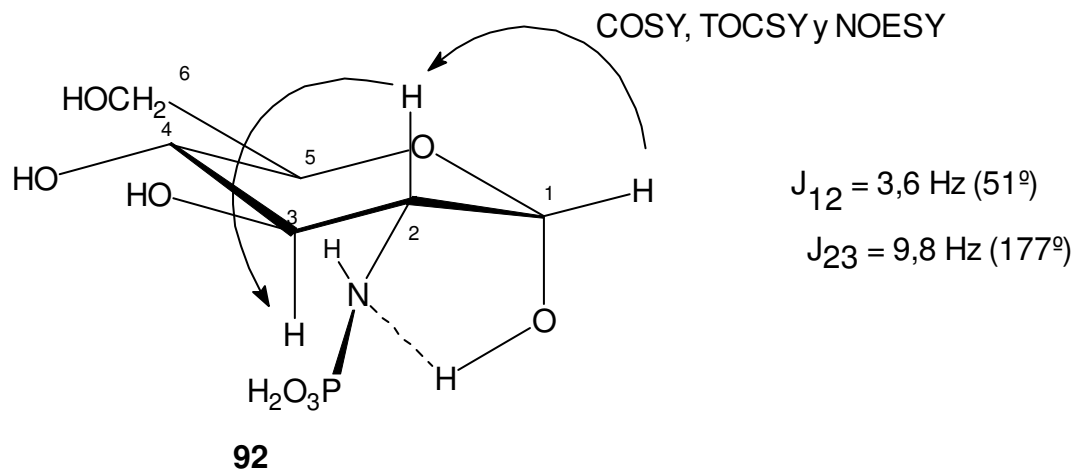
Para abundar más en esta deducción, comentar que, así como la O-sulfatación de hexosas produce desplazamientos paramagnéticos del protón geminal al grupo O-sulfato de 0,7- 0,8 ppm (Inoue y Nagasawa, 1973; Kamerling y col., 1988) y la N-sulfatación de hexosaminas provoca desplazamientos paramagnéticos de 0,47- 0,57 ppm para el H geminal al grupo N-sulfato (Lloyd y col., 1964; Inoue y Nagasawa, 1973), es lógico que la O-fosfatación genere desplazamientos paramagnéticos aún mayores en dicho protón geminal al O-fosfato, > 0,70 - 0,80 ppm, y la N-fosfatación de la glucosamina los genere > 0,47- 0,57, como el valor aquí observado, de 0,84 ppm (0,46 ppm respecto al clorhidrato de la glucosamina) (Tabla III-7). Todo apunta en la dirección de que nuestra sustancia es la 2-deoxi-2-fosfoamino- $\alpha$ -D-glucopyranosa (**92**) (Figura III-40), la estructura que proponemos en este trabajo para este metabolito.



**Figura III-38.** Sal sódica de 2-deoxi-2-sulfoamino- $\alpha$ -D-glucopyranosa.



**Figura III-39.** Epimerización de la  $\alpha$ -D-glucosamina-1-fosfato.



**Figura III-40.** 2-Deoxi-2-fosfami- $\alpha$ -D-glucopiranososa (estructura asignada a la hexosa cíclica aislada de *P. roqueforti*).

Carbono	<sup>13</sup> C-RMN de la α-D-glucosa (DOCD <sub>3</sub> )	<sup>13</sup> C-RMN del clorhidrato de la α-D-glucosamina (DOCD <sub>3</sub> )	<sup>13</sup> C-RMN de la sal sódica de la α-D-glucosamina 2(N)-sulfato (DOCD <sub>3</sub> )	<sup>13</sup> C-RMN de la hexosa aislada (DOCD <sub>3</sub> )	
1	93,976	90,822	93,082	94,897	
2	72,973	56,232	59,914	54,716	
3	74,879	71,731	72,779	71,801	
4	71,885	71,466	72,319	73,107	
5	73,880	73,317	73,756	74,383	
6	62,771	62,189	62,823	62,469	
Protón	<sup>1</sup> H-RMN de la α-D-glucosa	<sup>1</sup> H-RMN del clorhidrato de la α-D-glucosamina	<sup>1</sup> H-RMN de la sal sódica de la α-D-glucosamina 2(N)-sulfato	<sup>1</sup> H-RMN de la α-D-glucosamina 1-fosfato	<sup>1</sup> H-RMN de la hexosa aislada
C <sub>1</sub> -H	5,0967 (1H, d, J= 3,7 Hz)	5,2816 (1H, d, J= 3,6 Hz)	5,3735 (1H, d, J= 3,3 Hz)	5,6457 (1H, dd, J= 3,3 Hz; J= 7,0 Hz)	5,0998 (1H, d, J= 3,6 Hz)
C <sub>3</sub> -H, C <sub>5</sub> -H, C <sub>6</sub> -H	3,79396- 3,66530 (4H, m)	3,80364- 3,70133 (4H, m)	3,79947- 3,56384 (4H, m)	3,8444- 3,7581 (4H, m)	3,82106- 3,56785 (4H, m)
C <sub>4</sub> -H	3,36604- 3,32151 (2H, incluye al C <sub>2</sub> -H)	3,37146- 3,26863 (1H)	3,39564- 3,36535 (1H)	3,4115- 3,2746 (1H)	3,34062- 3,22075 (1H)
C <sub>2</sub> -H	---	3,0129 (1H, dd, J= 3,6 Hz; J= 10,4 Hz)	3,1808 (1H, dd, J= 3,3 Hz; J= 10,2 Hz)	3,1063 (1H, ddd, J= 2,1 Hz; J= 3,4 Hz; J= 10,5 Hz)	3,4685 (1H, dd, J= 3,6 Hz; J= 9,8 Hz; J <sub>2p</sub> =0 Hz)
OH, NH	2,15144 (0,3 H, s)	2,12821 (0,5 H, s)	2,1508 (1 H, s)	2,1398 (0,1 H, s)	2,800 (0,1 H, s)

**Tabla III-7.** Datos de <sup>13</sup>C-RMN y <sup>1</sup>H-RMN de la α-D-glucosa, el clorhidrato de la α-D-glucosamina, la sal sódica de la α-D-glucosamina 2-sulfato, de la α-D-glucosamina-1-fosfato y del compuesto polihidroxílico mayoritario de *P. roqueforti* (DOCD<sub>3</sub>, 300 MHz).

Obsérvese que la estructura alternativa de 2-O-sulfato-α-D-glucosa ha sido descartada, fundamentalmente, por la ausencia en el espectro de RMN de la señal correspondiente al carbono 2, la cual tendría que aparecer a unas 6,39 ppm hacia campos bajos con respecto a la correspondiente a dicho carbono en la D-(+)-glucosa, osea, a unos 79,3627 ppm (72,9727 ± 6,3900) (Archbald y col., 1981). Obsérvese, también, que la estructura alternativa de 2-N-sulfato-α-D-glucosa (2-deoxi-2-sulfoamino-α-D-glucopiranos, **90**) ha sido descartada, fundamentalmente, por la ausencia en el espectro de RMN de la señal correspondiente al carbono 2, la cual tendría que aparecer a unas 3,68 ppm hacia campos bajos con respecto a la correspondiente a dicho carbono en la D-(+)-glucosamina, osea, a unos 59,914 ppm. En

consistencia con nuestra asignación, el desplazamiento químico que presenta el protón geminal al grupo fosfámico  $\text{-NHPO}_3\text{H}$  ( $\delta$  3,4685) se encuentra desplazado hacia campos bajos con respecto al protón geminal al grupo amonio  $\text{-NH}_3^+\text{Cl}^-$  del clorhidrato de la glucosamina ( $\delta$  3,0129) en 0,4556 ppm, lo cual está de acuerdo con los saltos que han sido descritos para el hidrógeno en C-2 como consecuencia de la N-fosfatación de hexosaminas y, al mismo tiempo, en desacuerdo con los saltos que aparecen descritos en la literatura para el hidrógeno en C-2 como consecuencia de la O-sulfatación de hexosaminas, el cual es del orden de 0,6660 ppm (Kamerling y col., 1988).

Desde el punto de vista de la biogénesis, comentar que la glucosamina N-fosfatada (**92**) es un metabolito que los hongos biosintetizan mediante fosfotransferasas, justificándose la N-fosfatación por la mayor nucleofilia del grupo  $\text{-NH}_2$  que los grupos  $\text{-OH}$  (Tshako y col., 1980).

Según la bibliografía, las paredes celulares de *Penicillium charlesii* G. Smith presentan un contenido en hidrato de carbono total neutro del 69 %. Los principales polisacáridos presentes son la quitina y la celulosa. La glucosamina, que comprende el 12 % de la pared celular, está presente principalmente como quitina (Bulman y Chittenden, 1976). Encontrar una glucosamina N-fosfatada es nuevo en la bibliografía, y aporta luz sobre el modo en que la glucosamina se incorpora a la biogénesis de la quitina: la 2-Deoxi-2-fosfámico- $\alpha$ -D-glucopiranososa (**92**) se transpone por sustitución nucleofílica intramolecular para dar  $\alpha$ -D-glucosamina-1-fosfato (**91b**) que, a su vez, se epimeriza espontáneamente para dar la  $\beta$ -D-glucosamina-1-fosfato (**91a**) y, ambos epímeros, **91a** y **91b** contienen el grupo saliente adecuado en C-1 para que un hidroxilo en C-4 pueda atacar nucleofílicamente ( $\text{SN}_1 - \text{SN}_2$ ) y elabore las uniones 1-4 de la quitina.

### III-4. Conclusiones

1. Se ha aislado del medio marino una nueva cepa de *Penicillium roqueforti*.
2. Se ha producido, a escala de laboratorio, la biomasa de *Penicillium roqueforti* necesaria para su estudio químico.
3. La cepa cultivada de *P. roqueforti* no ha suministrado ni un solo componente químico volátil que esté implicado en la ruta biogénica de la PR-toxina {los trazadores químicos propuestos por Demyttenaere y col., (2002), Jelen (2002) y Calvert y col., (2002)}, a saber: los hidrocarburos **17** y **26–36** a pesar de que dichos componentes volátiles se encuentran en las bases de datos Nist y Wiley del equipo GC-MS utilizado (Saturn de Varian).
4. La cepa estudiada de *P. roqueforti* no ha suministrado ni un solo componente químico volátil que esté implicado en la ruta biogénica de la PR-toxina, a saber, los eremofilanos **6-13**.
5. No se ha encontrado indicio alguno de que la cepa estudiada de *P. roqueforti* produzca botriodiplodina (**24**), la micotoxina descrita por Moreau y col. (1982) en una cepa de *P. roqueforti* no productora de PR-toxina.
6. Se identificaron en el caldo de cultivo 26 componentes volátiles pertenecientes a los grupos de los *n*-alcanos (**40**), 1-alcanoles (**42**), 2-alquil-1-alcanoles (**43**), ácidos grasos libres - saturados (**44**) e insaturados (**50**) -, amidas de ácidos grasos (**51**), ésteres metílicos de ácidos grasos poliinsaturados (**52**), monoglicéridos (**61**), ceras - ésteres de ácidos y alcoholes grasos (**66, 67** y **70**) -, alcoholes grasos libres (**69**), monoterpenos de cadena lineal (**74**), dipéptidos cíclicos (**80**) y ftalatos de dialquilo (**82-85**).
7. Se identificaron en el micelio 64 componentes volátiles pertenecientes a los grupos de los *n*-alcanos (**40**), 1-alquenos (**41**), 1-alcanoles (**42**), 2-alquil-1-alcanoles (**43**), ácidos grasos libres - saturados (**44, 48**) e insaturados (**46**) -, amidas de ácidos grasos (**51**), ésteres metílicos y etílicos de ácidos grasos - saturados (**45, 49, 56, 57**) e insaturados (**47, 52-55**) -, triglicéridos insaturados (**58**), diglicéridos (**59**), monoglicéridos - saturados (**61**) e insaturados (**60, 62, 63**) -, ceras - ésteres de ácidos y alcoholes grasos (**64, 65** y **70**) -, éteres grasos (**68**), catabolitos lipídicos (**71-73**),

mono-, sesqui- y diterpenos de cadena lineal (75-77), hidrocarburos aromáticos de la ruta del ácido shikímico (78, 79) y ftalatos de dialquilo (81, 83-85).

8. Se identificaron cinco componentes no volátiles, que se describen aquí por primera vez en la especie *P. roqueforti*, a saber: peróxido del ergosterol (86), 9(11)-dehidroperóxido del ergosterol (87), el 4-hidroxi-benzaldehído (78), el D-(-)-manitol (89) y la 2-deoxi-2-fosfamino- $\alpha$ -D-glucopyranosa (92).

9. Se aporta un modelo que ilumina el modo en que la glucosamina se incorpora a la ruta biogénica de la quitina.

10. Se ha descubierto una cepa inusual de *P. roqueforti* que no produce micotoxinas y, paralelamente aporta importantes nutrientes y, por tanto, potencialmente aplicable al campo de la alimentación funcional - animal o humana -.

11. Se ha desarrollado un bioproceso para la producción industrial de Trioleína, Peróxido del ergosterol (86), 9(11)-dehidro peróxido del ergosterol (87), 4-hidroxibenzaldehído (78), y de la novedosa 2-deoxi-2-fosfamino- $\alpha$ -D-glucopyranosa (92).



## III-5. Experimental

### III-5.1. General

La cromatografía en columna en fase normal se realizó sobre gel de sílice de la casa Scharlau de 0,06- 0,2 mm (cabezas cromatográficas) y 0,04- 0,06 mm (adsorbentes en fase húmeda), tanto a media presión (sistema para cromatografía Büchi) como a baja presión (motores de Fluid Metering Inc. acoplados en serie a columnas de la marca Ace Glass Inc.). La cromatografía en columna en fase reversa se realizó mediante columnas LiChroprep RP-18 (40-63  $\mu\text{m}$ ) integradas en circuitos para cromatografía a baja presión basados en motores de Fluid Metering Inc.

La filtración a través de gel (cromatografía de exclusión por tamaño molecular) se realizó por gravedad a través de Sephadex LH-20 lipofílico, eluyendo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : Metanol (1: 1).

La cromatografía en capa fina en fase normal se realizó sobre capas de 0,25 mm de espesor de la marca Tracer Analítica con mezclas de hexano, benceno, acetato de etilo, cloroformo y metanol en las proporciones que se especifican en cada caso. La cromatografía en capa fina en fase reversa se realizó sobre capas RP-18F<sub>254s</sub> de 0,25 mm de espesor de la marca Merck con mezclas de acetonitrilo: metanol: agua (80: 18: 2). En todos los casos, el revelado de las mismas se realizó por pulverización con oleum (ácido sulfúrico al 4 %, ácido acético al 80 % y agua al 16 %) y calentándolas a 120 °C durante veinte minutos.

La cromatografía HPLC semipreparativa se realizó bajo las siguientes condiciones: columna Waters ODS (4,6 x 250 mm, con partículas de 10  $\mu\text{m}$  y tamaño de poro de 100 Å) para las separaciones en fase reversa, y una Alltech Econosphere de  $\text{SiO}_2$  (4,6 x 250 mm, con partículas de 10  $\mu\text{m}$  y tamaño de poro de 100Å) para las separaciones en fase normal. Ambas, en un aparato HPLC semipreparativo compuesto por una bomba isocrática Spectraphysics P100 y un detector UV Hewlett Packard 1050 de longitud de onda variable. En todos los casos se trabajó a temperatura ambiente (26 °C).

La cromatografía HPLC analítica se realizó en un aparato Shimadzu, modelo LC-9A, con un detector UV de la misma marca a 254 nm y un detector de índice de refracción asociado en serie. Las condiciones usadas fueron, bien una columna en fase normal con mezclas de *n*-hexano y acetato de etilo como eluyente a un flujo de 1,0 ml/ min., bien una columna Shodex OH Pak SB 806 HQ con agua con un 0,05 % de azida sódica como eluyente, también a un flujo de 1,0 ml/ min.

Las rotaciones ópticas específicas se midieron con un aparato Atago, modelo Polax-D.

Los espectros infrarrojos se realizaron en un espectrofotómetro Shimadzu modelo FTIR-8400S. Como disolvente se utilizó cloroformo para espectroscopía de la casa Merck. Los espectros realizados en película se obtuvieron con ventanas de cloruro sódico. El calibrado del aparato se verificó con la banda a 1603  $\text{cm}^{-1}$  del poliestireno.

Los espectros ultravioleta-visible se realizaron en un espectrofotómetro Shimadzu, modelo UV-1203, con etanol al 96 % para espectroscopía de la casa Merck.

Los datos espectroscópicos de RMN fueron proporcionados por aparatos de resonancia magnética nuclear, del tipo Bruker AC a 250 MHz, otro de tipo Bruker AMX a 300 MHz y mediante una unidad Varian Inova de 400 MHz. Se utilizó tetrametilsilano como referencia interna en los espectros de protón y cloroformo deuterado ( $\delta$  77,0) o metanol deuterado ( $\delta$  49,0) de la casa Aldrich para calibrar los espectros de carbono 13.

La espectrometría de masas se realizó tanto a baja como a alta resolución mediante las técnicas de ionización por impacto electrónico (IE) o ionización por bombardeo con átomos rápidos (FAB) a 70 eV en un espectrómetro de masas FISIONS VG Micromass, modelo VG Autospec. En el caso de los FAB (modo positivo) se utilizó como matriz el alcohol 3-nitrobenzílico.

Los puntos de fusión se realizaron en un aparato Gallenkamp, y están sin corregir.

La cromatografía analítica en fase gaseosa (GC-MS) se realizó en un aparato Saturn de Varian en las siguientes condiciones: columna CP-Sil 8 Low bleed, temperatura del inyector de 270 °C durante 10 min.; condiciones de split de inicial *on*, 0,01 min. *off* y 5 min. *on*; horno programado a 50 °C durante 5 min., calentado a 15 °C/ min. hasta 250 °C y mantenido a esta temperatura durante 10 min. (tiempo total de análisis de 28,33 min. para cada muestra); flujo de 1 ml/ min.; detector de masas en modo EI (rango de m/ z de 20 a 400). Los factores de respuesta se obtuvieron con patrones de alcanos (Dr. Ehrenstorfer GmbH Alkanes-Mix 10), ésteres metílicos de ácidos grasos (Supelco™ 37 Component FAME Mix), 1-alquenos (Fluka Chemika) y 1-alcoholes (Fluka chemika). El resto se asignaron por semejanza estructural con los anteriores. Así, a los componentes lipídicos éster 1-(hidroximetil)-1,2-etanodílico del ácido hexadecanoico (**59**), éster octadecílico del ácido hexadecanoico (**66**), el éster 2-octadeciloxietílico del ácido hexadecanoico (**70**) y el éster (2-pentadecil-1,3-dioxolan-4-il)-metílico del ácido hexadecanoico (**61**), se les asignó el factor obtenido experimentalmente para el éster metílico del ácido hexadecanoico (**45**; n= 14; 764,117 x 10<sup>-12</sup> mg/ kuenta). A los componentes aromáticos (bencenoides) se asignó el mismo factor que el tetrainsaturado éster metílico del ácido 6,9,12,15-Docosatetraenoico (**55**) y al dipéptido *cyclo*-ProLeu se le asignó el mismo factor que al éster metílico del ácido 10-Undecenoico (**72**) por parecerse en tamaño molecular y número de dobles enlaces.

	mg/ kuenta (x10 <sup>12</sup> )
4-Hidroxi-benzaldehido ( <b>78</b> )	911,246
Benzofenona ( <b>79</b> )	911,246
Ftalato de bis(2-etilhexilo) ( <b>85</b> )	911,246
Ftalato de bis(4-metilpentilo) ( <b>84</b> ; n= 3)	911,246
Ftalato de bis(2-metilpropilo) ( <b>84</b> ; n= 1)	911,246
2-Butil-1-octanol ( <b>43</b> ; n= 3, m= 3)	89,020
<i>Ciclo</i> -ProLeu ( <b>80</b> )	192,627
Éster metílico del ácido 2-octil-ciclopropanododecanoico ( <b>49</b> )	1248,300
Ftalato de dietilo ( <b>83</b> ; n= 1)	911,246
Ftalato de dibutilo ( <b>81</b> )	911,246
Ftalato de dihexilo ( <b>83</b> ; n= 5)	911,246
Ftalato de dioctilo ( <b>83</b> ; n= 7)	911,246
Docosano ( <b>40</b> ; n= 19)	259,050
Éster metílico del ácido docosanoico ( <b>45</b> ; n= 20)	394,737
1-Docosanol ( <b>42</b> ; n= 20)	259,050
Éster metílico del ácido 6,9,12,15-docosatetraenoico ( <b>55</b> )	911,246
Éster metílico del ácido (Z)-13-docosenoico ( <i>erucico</i> ) ( <b>46</b> ; n= 7, m= 11)	246,041
Dodecano ( <b>40</b> ; n= 9)	89,020
1-Dodecanol ( <b>42</b> ; n=10)	89,020
3,7,11-Trimetil-1-dodecanol ( <b>76</b> )	394,737
Eicosano ( <b>40</b> ; n= 17)	117,870
Ácido eicosanoico ( <b>44</b> ; n= 18)	1248,000
1-Eicosanol ( <b>42</b> ; n= 18)	117,870
Éster metílico del ácido 7,10,13-eicosatrienoico ( <b>54</b> )	756,191
2-Octadeciloxietanol ( <b>69</b> )	394,737
Isovalerato de geranilo ( <b>75</b> )	518,916
Heneicosano ( <b>40</b> ; n= 18)	183,620
Heptacosano ( <b>40</b> ; n= 24)	579,270
Heptadecano ( <b>40</b> ; n= 14)	66,340
Éster metílico del ácido heptadecanoico ( <b>45</b> ; n= 15)	269,605
Éster metílico del ácido 16-metilheptadecanoico ( <b>57</b> )	328,783
Hexacosano ( <b>40</b> ; n= 23)	551,320
Éster 1-(hidroximetil)-1,2-etanodílico del ácido tetradecanoico ( <b>59</b> )	764,117
Éster metílico del ácido hexadecanoico ( <b>45</b> ; n= 14)	764,117
Éster octadecílico del ácido hexadecanoico ( <b>66</b> )	764,117
Éster 2-(octadeciloxi) etílico del ácido hexadecanoico ( <b>70</b> )	764,117

	mg/ k cuenta (x10 <sup>12</sup> )
Éster (2-pentadecil-1,3-dioxolan-4-il) metílico del ácido hexadecanoico (61)	764,117
1-Hexadeceno (41; n= 13)	328,783
Ácido 9-hexadecenoico (46; n= 5, m= 7)	518,916
Éster metílico del ácido (Z)-9-hexadecenoico (47; n= 5, m= 7)	518,916
Éster tetradecílico del ácido (Z)-9-hexadecenoico (65; n= 5)	518,916
1-Hexadecanol (42; n= 14)	69,390
Éster dibutilico del ácido hexanedioico (81)	94,737
Éster mono(2-etilhexílico) del ácido hexanedioico (82)	394,740
2-Hexil-1-decanol (43; n= 5, m= 5)	69,390
2-Hexyl-1-octanol (43; n= 3, m= 5)	9,940
Éster metílico del ácido 9-oxo-nonanoico (71)	394,737
Éster 2,3-dihidropropílico del ácido (Z,Z)-9,12-octadecadienoico (63)	518,916
Éster etílico del ácido (Z,Z)-9,12-eicosadienoico ( <i>linoleico</i> ) (53)	518,916
Éster metílico del ácido 7,10-octadecadienoico (52; n= 6, m= 5)	518,916
Éster metílico del ácido 8,11-octadecadienoico (52; n= 5, m= 6)	518,916
Octadecano (40; n= 15)	80,840
Éster metílico del ácido octadecanoico (45; n= 16)	497,985
9-Octadecenamida (51)	328,783
1,1'-[1,2-etanodilbis(oxi)]-(Z,Z)-bis-9-octadeceno (68)	328,783
Ácido (E)-9-octadecenoico (50)	82,220
Éster metílico del ácido 11-octadecenoico (47; n= 5, m= 9)	192,627
Éster (2-fenil-1,3-dioxolan-4-il) metílico del ácido (Z)-9-octadecenoico (60)	328,783
Éster (Z,Z)-9-octadecenílico del ácido 9-octadecenoico (64)	328,783
Éster eicosílico del ácido (Z)-9-octadecenoico (65; n= 7)	518,916
(E)- 3,7-dimetil-2,6-Octadienal (74)	518,920
Éster 2-hidroxi-1-(hidroximetil) etílico del ácido (Z,Z)-9,12-octadecadienoico (62)	42,916
Éster metílico del ácido 8,11-octadecadienoico (52; n= 5, m= 6)	518,916
Ácido (Z)-3-octil-oxiranooctanoico (48)	497,985
Pentacosano (40; n= 22)	415,390
Pentadecano (40; n= 12)	69,100
Ácido pentadecanoico (44; n= 13)	236,763
Éster metílico del ácido pentadecanoico (45; n= 13)	236,763
Éster metílico del ácido 14-metilpentadecanoico (56)	764,117
6,10,14-trimetil-2-pentadecanona (77)	394,737
1-Pentadeceno (41; n= 12)	192,627
Éster 3-(octadeciloxi) propílico del ácido esteárico (67)	394,737
Éster metílico del ácido tetradecanoico (45; n= 22)	394,737
Ácido Tetradecanoico (44; n= 12)	512,766
Éster metílico del ácido tetradecanoico (45; n= 12)	512,766
Ácido 9-tetradecenoico (46; n= 5, m= 5)	518,916
Tricosano (40; n= 20)	346,520
Éster etílico del ácido 13-formiltridecanoico (73)	272,265
1-Tridecanol (42; n= 11)	83,700
Trioleina (58)	192,627
Éster metílico del ácido 10-undecenoico (72)	192,627
Tetradecano (40; n= 11)	79,940

**Tabla III-8.** Factores de respuesta en GC-MS usados en la cuantificación de los componentes volátiles de *Penicillium roqueforti*.

### III-5.2. Aislamiento e identificación de la cepa

El hongo fue aislado a partir de muestras de agua marina colectada en la playa de La Laja, Las Palmas de Gran Canaria, en pozas de marea ubicadas sobre una zona de afloramiento rocoso, donde se observa la presencia constante de sedimentos, detritus y restos vegetales en descomposición (Figura III-41). Las colonias en desarrollo fueron aisladas y repurificadas a través de placas de Petri en medio sólido KMV modificado (Tabla III-9). El hongo *Penicillium roqueforti* fue identificado por el Dr. Lawrence de CABI Bioscience, Surrey (UK) conforme al Anexo 1. Un ejemplar de la cepa se encuentra depositado en el laboratorio de Química Orgánica II, Departamento de Química de la ULPGC.



**Figura III-41.** Afloramiento rocoso en la playa de La Laja, localidad de colecta de la cepa de *Penicillium roqueforti*.

KMV		KMV modificado	
Agua marina (35 g/l)	1,0 l	Agua marina (35 g/l)	1,0 l
Gelatina hidrolizada	1,0 g	Gelatina hidrolizada	1,0 g
Glucosa	5,0 g	Glucosa	5,0 g
Peptona	0,1 g	Peptona	1,0 g
Extracto de levadura	0,1 g	Extracto de levadura	1,0 g
Ágar bacteriológico <sup>1</sup>	12,0 g	Ágar bacteriológico <sup>1</sup>	12,0 g

<sup>1</sup> Usado para la preparación del medio sólido

**Tabla III-9.** Composición del medio de cultivo KMV utilizado para organismos heterotróficos.

### III-5.3. Cultivo masivo del hongo

La producción de la biomasa fúngica se realizó en un sistema estático de cultivo, en cajas de plástico de (83 x 46 x 18) cm, conforme a la Figura III-42. El medio utilizado para la producción fúngica fue el caldo KMV modificado (Tabla III-9), el cual fue previamente esterilizado en una autoclave (20 min.) y repartido en varias cajas (1,2 l por caja). Tras 10 a 12 días de cultivo, la parte sólida sobrenadante fue recolectada y separada por filtración. El caldo colado se guardó en frigorífico para su posterior extracción líquido-líquido.



**Figura III-42.** Vista superior del cultivo masivo de *Penicillium roqueforti*.

### III-5.3.1. Análisis químico del caldo de cultivo

Doce litros de caldo de cultivo se extrajeron en embudo de decantación con 2,5 l de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (x3) para obtener 175 mg de un extracto bruto (**Pr-L-0**) el cual fue sometido al esquema de partición descrito anteriormente (Figura III-15).

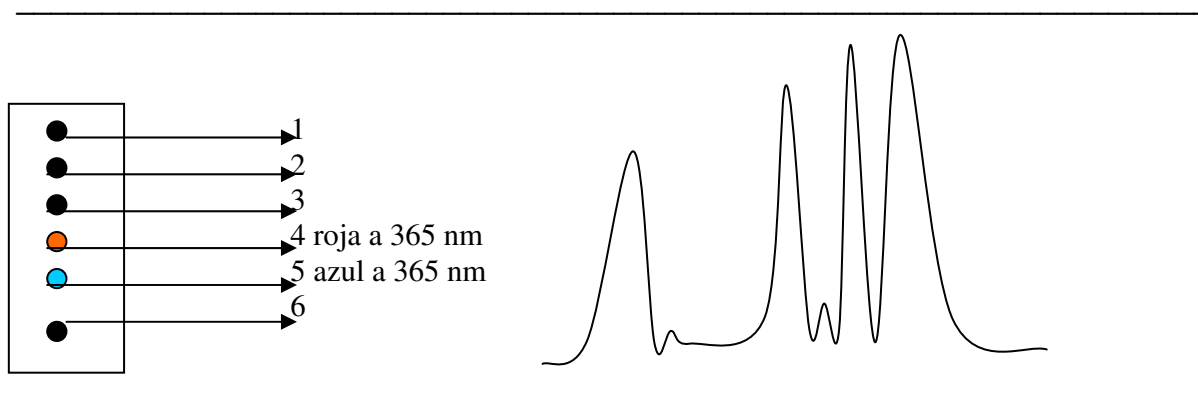
El espectro de  $^1\text{H}$ -RMN delató siete protones de ácidos carboxílicos a  $\delta$  12,5- 11,2; aromáticos a  $\delta$  8,5- 7,0; olefínicos a  $\delta$  5,9- 5,0; geminales a heteroátomos a  $\delta$  4,3- 3,5 y alifáticos a  $\delta$  3,0- 0,6.

Dicho extracto bruto se disolvió en 20 ml de agua y 180 ml de MeOH y se extrajo en embudo de decantación con hexano hasta que éste resultó incoloro (10 extracciones). La evaporación del disolvente dió 106 mg de la fracción liposoluble (**Pr-L-1**).

A la fracción hidrosoluble se le añadió más agua (160 ml) para obtener una fase acuosa de composición 50 %  $\text{H}_2\text{O}$ – 50 % MeOH que se reextrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (x3) para dar las fracciones **Pr-L-2** (soluble en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 52 mg) y **Pr-L-3** (17 mg).

#### Estudio de la fracción liposoluble-1 (Pr-L-1)

Por CCF (fase normal, Hexano: AcOEt, 80: 20) se detectaron 6 sustancias mayoritarias. Lo mismo se observó por HPLC (fase normal, Hexano: AcOEt, 80: 20) (Figura III-43):



**Figura III-43.** Cromatografías analíticas - en capa fina y HPLC - de la fracción **Pr-L-1**.

En el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de esta mezcla se detectaron protones aromáticos ( $\delta$  7,70 y 7,53), olefínicos ( $\delta$  5,38), geminales a heteroátomos ( $\delta$  4,31) y los propios de cadenas hidrocarbonadas alifáticas ( $\delta$  2,9- 0,7).

En el espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN se observaron carbonos carbonílicos ( $\delta$  178,187), aromáticos ( $\delta$  167,753), olefínicos ( $\delta$  130,939 y 128,859), geminales a heteroátomos ( $\delta$  77,543- 65,914) y de cadenas alifáticas ( $\delta$  37,469- 14,132).

La mezcla se sometió a HPLC semipreparativa en fase normal (Hexano: AcOEt, 80: 20, detector UV ajustado a 254 nm) proporcionando dos fracciones: **Pr-L-1-1** y **Pr-L-1-2**.

### Fracción Pr-L-1-1

Se trata de un aceite incoloro (50 mg). Por espectroscopía de  $^1\text{H}$ -RMN sólo se observan señales a  $\delta$  0,85- 1,86 por lo que se sospecha que se trata de una mezcla de alcanos. Un estudio por GC-MS permitió identificar y cuantificar los siguientes componentes volátiles:

Pentadecano,  $\text{C}_{15}$  (**40**; **n= 12**; Tr= 13,990; 0,037 mg)  
Heptadecano,  $\text{C}_{17}$  (**40**; **n= 14**; Tr= 15,642; 0,030 mg)  
Eicosano,  $\text{C}_{20}$  (**40**; **n= 17**; Tr= 17,393; 0,063 mg)  
*Ciclo-ProLeu* (**80**; Tr= 17,56; 0,211 mg)  
Heneicosano,  $\text{C}_{21}$  (**40**; **n= 18**; Tr= 18,327; 0,141 mg)  
Docosano,  $\text{C}_{22}$  (**40**; **n= 19**; Tr= 18,978; 0,142 mg)  
Tricosano,  $\text{C}_{23}$  (**40**; **n= 20**; Tr= 19,744; 0,250 mg)  
Hexacosano,  $\text{C}_{26}$  (**40**; **n= 23**; Tr= 23,242; 1,766 mg)  
Heptacosano,  $\text{C}_{27}$  (**40**; **n= 24**; Tr= 25,07; 0,588 mg)

Ello dió un total de 46,772 mg de material no volátil que se le asignó a los alcanos de más alto peso molecular, las cuales, o no se volatilizaron a la temperatura del inyector usada o se salieron del tiempo de análisis prefijado en el método.

### Fracción Pr-L-1-2

Se trata de un aceite incoloro (50 mg). Por  $^1\text{H}$ -RMN se observaron protones aromáticos ( $\delta$  7,70 y 7,53), olefínicos ( $\delta$  5,48- 5,26), geminales a heteroátomos ( $\delta$  4,42), en alfa a carbonilos ( $\delta$  2,80), de metilenos/ metinos alifáticos ( $\delta$  1,83- 1,20) y de metilos ( $\delta$  0,96- 0,81). Parece, pues, tratarse de una mezcla de ftalatos de alquilo y ácidos grasos insaturados. En efecto, un estudio por GC-MS reveló la presencia de los siguientes compuestos volátiles:

Ftalato de dibutilo (**83**; **n= 3**; Tr= 17,649; 5,126 mg)  
Éster metílico del ácido 7,10-octadecadienoico (**52**; **n= 6**, **m= 5**; Tr= 18,378; 0,178 mg)  
Éster octadecílico del ácido hexadecanoico (**66**; Tr= 18,646; 0,251 mg)  
Éster 2-(octadeciloxi) etílico del ácido hexadecanoico (**70**; Tr= 19,106; 0,119 mg)  
Ácido (E)-9-octadecenoico (**50**; Tr= 19,807; 0,039 mg)  
Ftalato de bis(4-metilpentilo) (**84**; **n= 3**; Tr= 20,407; 0,968 mg)  
2-Octadeciloxietanol (**69**; Tr= 21,805; 0,555 mg)  
Ftalato de bis(2-etilhexilo) (**85**; Tr= 22,645; 0,214 mg)  
Ftalato de dihexilo (**83**; **n= 5**; Tr= 22,735; 2,919 mg)  
Ftalato de dioctilo (**83**; **n= 7**; Tr= 26,367; 2,349 mg)

Con un peso total de 37,282 mg de material no volátil que se asignó, por espectroscopía de  $^1\text{H}$ -RMN, a una mezcla de ftalatos de alquilo de mayor tamaño molecular y a ácidos grasos

insaturados libres que, como antes, o no se volatilizaron a la temperatura del inyector usada o se salieron del tiempo de análisis prefijado en el método. En efecto, por recromatografía de esta fracción a través de sílica, eluyendo con hexano-acetato de etilo, se obtuvo una muestra pura (homogénea por CCF) de uno de estos ftalatos. A partir de su espectro de  $^1\text{H-RMN}$ , se le asignó la estructura del ftalato de dinonilo (**83**;  $n=8$ ):  $\delta$  7,70 (2H, dd); 7,53 (2H, dd); 4,32 (4H, t); 1,75 (4H, m); 1,48- 1,20 (24H, m) y 0,89 (6H, t).

### Estudio de la fracción liposoluble-2 (Pr-L-2)

Se obtuvieron 52 mg de una mezcla que por TLC analítica se reveló como ocho sustancias, coincidiendo los Rf's con cinco componentes de la fracción anterior **Pr-L-1**).

El espectro de  $^1\text{H-RMN}$  presentó protones aromáticos ( $\delta$  7,78- 7,47), geminales a heteroátomos ( $\delta$  4,28 por un lado y 3,90- 3,15 por otro) y típicos de cadenas hidrocarbonadas saturadas ( $\delta$  2,50- 0,75). Sospechándose, pues, en la presencia de ftalatos y componentes lipídicos saturados. Un análisis por GC-MS de esta fracción permitió identificar/ cuantificar los siguientes:

- Éster (2-pentadecil-1,3-dioxolan-4-il) metílico del ácido hexadecanoico (**61**; Tr= 12,154; 0,0088 mg)
- 2-Butil-1-octanol (**43**;  $n=3$ ,  $m=3$ ; Tr= 12,519; 0,0025 mg)
- Ácido tetradecanoico (**44**,  $n=12$ ; Tr= 14,776; 0,0063 mg)
- 1-Tridecanol (**42**;  $n=11$ ; Tr= 14,867; 0,0023 mg)
- Ftalato de dietilo (**83**;  $n=1$ ; Tr= 15,062; 0,0083 mg)
- 1-Hexadecanol (**42**;  $n=14$ ; Tr= 16,348; 0,003 mg)
- Ftalato de bis(2-metilpropilo) (**84**;  $n=1$ ; Tr= 17,009; 0,0167 mg)
- Ftalato de dibutilo (**83**;  $n=3$ ; Tr= 17,653; 1,3935 mg)
- Éster 3-(octadeciloxi) propílico del ácido esteárico (**67**; Tr= 17,948; 0,0024 mg)
- 9-Octadecenamida (**51**; Tr= 18,358; 0,0181 mg)
- Ácido (E)-9-octadecenoico (**50**; Tr= 19,814; 0,0087 mg)

Con un peso total de 50,5294 mg de material no volátil que se le asignó por espectroscopía de  $^1\text{H-RMN}$  a una mezcla de ftalatos y componentes lipídicos saturados del tipo de los anteriores aunque de mayor tamaño molecular que, como antes, o no se volatilizaron a la temperatura del inyector usada o se salieron del tiempo de análisis prefijado en el método. Así, por recromatografía en columna, se separaron distintas fracciones enriquecidas en: a) alcanos (**40**;  $\delta$  1,62- 0,77), b) ftalato de dinonilo {(**83**;  $n=8$ ):  $\delta$  7,70 (2H, dd); 7,53 (2H, dd); 4,32 (4H, t); 1,75 (4H, m); 1,48- 1,20 (24H, m) y 0,89 (6H, t)}, c) ftalato de dibutilo {(**83**;  $n=3$ ):  $\delta$  7,70 (2H, dd); 7,53 (2H, dd); 4,31 (4H, t); 1,72 (4H, m); 1,44 (4H, m); 0,96 (6H, t)}, d) ácidos grasos libres saturados (**44**;  $\delta$  1,85- 0,80) e) 1-alcoholes saturados (**42** y **43**;  $\delta$  3,80- 3,50; 1,85- 0,80).

### Estudio de la fracción liposoluble-3 (Pr-L-3)

La fracción bruta (17 mg) presenta un espectro de  $^1\text{H-RMN}$  que desplaza protones geminales a heteroátomos ( $\delta$  4,10- 3,15), de grupos  $-\text{NH}_2$  ( $\delta$  3,03) y de cadenas alifáticas ( $\delta$  2,50- 0,75).

Un análisis por GC-MS de esta fracción permitió identificar/ cuantificar los siguientes componentes lipídicos volátiles:

- (E)-3,7-dimetil-2,6-Octadienal (**74**; Tr= 12,179; 0,079 mg)
- Pentadecano,  $\text{C}_{15}$ , (**40**;  $n=12$ ; Tr= 13,992; 0,005 mg)
- 9-Octadecenamida (**51**; Tr= 18,366; 0,0489 mg)
- Ácido (E)-9-octadecenoico (**50**; Tr= 19,809; 0,03 mg)
- Éster mono(2-etilhexil) del ácido hexanedioico (**82**; Tr= 20,714; 0,143 mg)

Ello da un total de 16,694 mg que, por  $^1\text{H-RMN}$ , que se asignó a una mezcla de glicéridos insaturados ( $\delta$  5,46- 5,14; 4,37- 4,06; 2,53- 2,23; 1,84- 0,80) y compuestos polihidroxfílicos ( $\delta$  4,10- 3,15) que, como antes, o no se volatilizaron a la temperatura del inyector usada o se salieron del tiempo de análisis prefijado en el método.

### III-5.3.2. Estudio del micelio

Se obtuvieron 89,9 g de micelio húmedo. Este se extrajo por maceración en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (x3, 24 h c/ u, temperatura ambiente). Después de la filtración, evaporación y desecación (vacío) se obtuvieron 14,804 g de extracto bruto. El espectro de  $^1\text{H-RMN}$ , de esta mezcla de sustancias informó de la presencia de protones aromáticos ( $\delta$  8,4- 7,2), protones olefínicos ( $\delta$  6,6- 5,0), protones geminales a heteroátomos ( $\delta$  4,0- 3,2) y de cadenas hidrocarbonadas típicas ( $\delta$  3,0- 0,8). Éste se sometió al esquema de partición descrito en la Figura III-16.

Así, se disolvió en 200 ml de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y sometió a reparto en un embudo de decantación con otros 200 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ . La fase orgánica se separó y la acuosa se reextrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (x3). Las fases orgánicas se reunieron para dar 1,637 g de la fracción liposoluble bruta (**Prm-L-0**). El espectro de  $^1\text{H-RMN}$  de esta mezcla delata la presencia de protones olefínicos ( $\delta$  5,8- 5,0), geminales a heteroátomos ( $\delta$  4,0- 3,0) y cadenas hidrocarbonadas típicas ( $\delta$  3,0- 0,8).

Finalmente, la fracción liposoluble se repartió en tres subfracciones, a saber: **Prm-L-1**, **Prm-L-2** y **Prm-L-3**. La fase acuosa se reextrajo con 2-butanol para dar la denominada fracción hidrosoluble (**Prm-H-0**).

#### Estudio de la fracción liposoluble-1 (Prm-L-1)

Supuso 540 mg de un aceite incoloro que, por TLC analítica, se presentó como una mezcla de 5 sustancias mayoritarias. Por GC-MS se identificaron/ cuantificaron las siguientes sustancias volátiles:

- 2-Hexil-1-decanol (**43**; **n= 5**, **m= 5**; Tr= 15,670; 0,083 mg)
- Éster metílico del ácido pentadecanoico (**45**; **n= 13**; Tr= 16,622; 0,61 mg)
- Ftalato de bis (2-metilpropilo) (**84**; **n= 1**; Tr= 17,008; 1,179 mg)
- Éster metílico del ácido (Z)-9-hexadecenoico (**47**; **n= 5**, **m= 7**; Tr= 17,175; 0,316 mg)
- Éster metílico del ácido hexadecanoico (**45**; **n= 14**; Tr= 17,302; 12,16 mg)
- Ftalato de dibutilo (**81**; Tr= 17,662; 5,66 mg)
- Éster metílico del ácido heptadecanoico (**45**; **n= 15**; Tr= 17,942; 0,44 mg)
- Éster metílico del ácido 8,11-octadecadienoico (**52**; **n= 5**, **m= 6**; Tr= 18,403; 8,060 mg)
- Éster metílico del ácido octadecanoico (**45**; **n= 16**; Tr= 18,568; 1,93 mg)
- Ftalato de dihexilo (**83**; **n= 5**; Tr= 22,759; 0,318 mg)

Con un peso total de 409,24 mg que, de nuevo, correspondieron al material no volátil. Como antes, o no se volatilizaron a la temperatura del inyector usada o se salieron del tiempo de análisis prefijado en el método. Su espectro de  $^1\text{H-RMN}$  delató protones aromáticos ( $\delta$  7,7 (m); 7,5 (m); un sistema AB a  $\delta$  6,8- 6,0, protones olefínicos ( $\delta$  5,6- 5,0), protones geminales a heteroátomos ( $\delta$  4,1- 3,0) y cadenas hidrocarbonadas ( $\delta$  3,0- 0,5). En su espectro de  $^{13}\text{C-RMN}$  se observaron carbonos carbonílicos ( $\delta$  178- 173), carbonos olefínicos ( $\delta$  142- 116), carbonos geminales a heteroátomos ( $\delta$  83- 60) y carbonos saturados típicos de cadenas hidrocarbonadas ( $\delta$  56- 11). Esto parece indicar la presencia abundante de ftalatos de alquilo, peróxido del ergosterol y triglicéridos insaturados.



Se procedió a una filtración a través de Sephadex LH-20 lipofílico eluyendo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: MeOH (1: 1), lo que rindió tres fracciones que se muestran homogéneas por CCF:

**Prm-L-1-a** (290 mg)

**Prm-L-1-b** (105 mg)

**Prm-L-1-c** (110 mg)

La mezcla **Prm-L-1-a** se fraccionó a su vez por HPLC semipreparativa (fase normal, Hex: AcOEt, 80: 20) para dar tres subfracciones: **Prm-L-1-a-1**, **Prm-L-1-a-2** y **Prm-L-1-a-3**. Todas ellas se analizaron por RMN y GC-MS como se describe a continuación.

#### **Prm-L-1-a-1:**

Se trata de 45 mg de un aceite en el que, por GC-MS, se identificaron las siguientes sustancias volátiles:

Ftalato de dietilo (**83**; **n= 1**; Tr= 15,064; 0,205 mg)

Octadecano (**40**; **n= 15**; Tr= 16,418; 0,2 mg)

Éster metílico del ácido hexadecanoico (**45**; **n= 14**; Tr= 17,297; 1,891 mg)

Ftalato de dibutilo (**81**; Tr= 17,653; 0,923 mg)

Éster metílico del ácido heptadecanoico (**45**; **n= 15**; Tr= 17,933; 0,12 mg)

Éster metílico del ácido 8,11-octadecadienoico (**52**; **n= 5**, **m= 6**; Tr= 18,391; 3,62 mg)

Éster metílico del ácido 16-metilheptadecanoico (**57**; Tr= 18,558; 1,04 mg)

Éster (Z,Z)-9-octadecenílico del ácido 9-octadecenoico (**64**; Tr= 19,817; 0,47 mg)

Ftalato de dioctilo (**83**; **n= 7**; Tr= 26,41; 0,492 mg)

Ello dió un total de 36,039 mg de material no volátil, presumiblemente formado por componentes que, como antes, o no se volatilizaron a la temperatura del inyector usada o se salieron del tiempo de análisis prefijado en el método. Éste se identificó, por integración del espectro de <sup>1</sup>H-RMN, como una mezcla (1,0: 1,6) de peróxido del ergosterol (**86**) { $\delta$  6,55- 6,14 (sistema AB característico)} y triglicéridos insaturados del tipo de la trioleína (**58**) { $\delta$  5,28 (m); 4,34- 4,01 (dos dd característicos); 2,79 (t); 2,31 (t); 2,04 (m); 1,63 (m); 1,29 (m); 0,92 (t)}.

#### **Prm-L-1-a-2:**

Se trata de 187 mg de un aceite en el que, por GC-MS, se identificaron las siguientes sustancias volátiles:

Éster metílico del ácido 9-oxo-nonanoico (**71**; Tr= 13,687; 3,42 mg)

Éster metílico del ácido 10-undecenoico (**72**; Tr= 13,830; 0,23 mg)

Éster metílico del ácido tetradecanoico (**45**; **n= 12**; Tr= 15,898; 0,07 mg)

Éster metílico del ácido pentadecanoico (**45**; **n= 13**; Tr= 16,598; 1,57 mg)

Éster metílico del ácido hexadecanoico (**45**; **n= 14**; Tr= 17,270; 154,73 mg)

Éster metílico del ácido 11-octadecenoico (**47**; **n= 5**, **m= 9**; Tr= 18,389; 25,38 mg)

Con un peso total de 1,60 mg de material no volátil cuyo componente, como antes, o no se volatilizó a la temperatura del inyector usada o se salió del tiempo de análisis prefijado en el método. Éste se identificó a partir del espectro de <sup>1</sup>H-RMN como peróxido del ergosterol (**86**) {( $\delta$  6,55- 6,14 (dd característico)) del sistema AB producido por los protones vinílicos en C-6 y C-7.

**Prm-L-1-a-3:**

Se trata de 53 mg de un aceite amarillo en el que se identificaron por GC-MS los siguientes componentes volátiles:

- 1-Dodecanol (**42**; **n= 10**; Tr= 12,437; 0,0002 mg)
- 1-Tridecanol (**42**; **n= 11**; Tr= 14,847; 0,2912 mg)
- 1-Hexadecanol (**42**; **n= 14**; Tr= 16,329; 0,3238 mg)
- Trioleína (**58**; Tr= 18,389; 0,26 mg)
- Ácido eicosanoico (**44**; **n= 18**; Tr= 18,962; 2,78 mg)
- 1-Docosanol (**42**; **n= 20**; Tr= 22,482; 2,28 mg)

Ello dió un total de 47,065 mg de material no volátil cuyos componentes, o no se volatilizaron a la temperatura del inyector usada, o se salieron del tiempo de análisis prefijado en el método. Éste se determinó, por  $^1\text{H}$ -RMN como una mezcla de triglicéridos insaturados del tipo de la trioleína (**58**) { $\delta$  5,22 (m); 4,35- 3,90 (dos dd característicos); 2,78 (t); 2,33 (t); 2,04 (m); 1,62 (m); 1,29 (m); 0,91 (m)}. El espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN también sostiene esta asignación {carbonos carbonílicos a  $\delta$  173,979- 173,948; olefínicos a  $\delta$  130,054- 127,927; geminales a oxígenos en la subunidad estructural de glicerol a  $\delta$  72,124- 62,001; y los propios de cadenas hidrocarbonadas alifáticas a  $\delta$  34,286- 14,163}.

En efecto, por recromatografía a través de gel de sílice con hexano-acetato de etilo 98: 2 se obtuvieron 17 mg de un aceite homogéneo por CCF cuyos datos espectroscópicos fueron consistentes con la estructura de la trioleína (**58**):

IR ( $\text{CHCl}_3$ ).- 3029,48; 3006,99; 1738,68; 1653,08; 1232,81; 1168,45  $\text{cm}^{-1}$

$^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ ).-  $\delta$  5,34 (6H, t, J= 5,6 Hz); 5,27 (1H, dd, J= 4,3 Hz; J= 5,9 Hz); 4,30 (2H, dd, J= 4,3 Hz; J= 11,9 Hz); 4,14 {2H, dd (J= 5,9 Hz; J= 11,9 Hz); 2,30 (6H, t, J= 7,5 Hz); 2,01 (12H, m); 1,61 (6H, m); 1,27 (60H, m); 0,89 (9H, t, J= 6,6 Hz)}.

EM, m/z (%).- 603,5567 ( $\text{M}^+\text{-C}_{18}\text{H}_{33}\text{O}_2$ ; 49,16 %); 602,5514 ( $\text{M}^+\text{-C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$ ; 30,03 %); 265,2749 ( $\text{C}_{18}\text{H}_{33}\text{O}$ ; 23,14 %); 55,0413 (100 %).

$^{13}\text{C}$ -RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).-  $\delta$  14,018; 22,606; 24,767; 27,087; 27,130; 29,022; 29,094; 29,248; 29,454; 29,623; 29,684; 31,835; 33,930; 34,092; 62,006; 68,810; 129,592; 129,892; 172,723; 173,132; 173,73.

La fracción **Prm-L-1-b** (105 mg) es una mezcla de, al menos, seis sustancias, hecho que se revela por TLC analítica. Por HPLC, sin embargo, se separaron diez sustancias mayoritarias, de las que fueron identificadas por GC-MS sólo los siguientes componentes volátiles:

- Éster metílico del ácido hexadecanoico (**45**; n= 14; Tr= 17,288; 5,01 mg)
- Ftalato de dibutilo (**81**; Tr= 17,647; 2,631 mg)
- Éster metílico del ácido octadecanoico (**45**; n= 16; Tr= 18,554; 0,67 mg)
- Ftalato de dihexilo (**83**; n= 5; Tr= 22,745; 0,155 mg)
- Ftalato de dioctilo (**83**; n= 7; Tr= 26,398; 0,144 mg)

Su fraccionamiento se abordó por HPLC semipreparativa (fase normal, Hex: AcOEt, 80: 20) para dar las siguientes subfracciones: **Prm-L-1-b-1** y **Prm-L-1-b-2**.

**Prm-L-1-b-1:**

Se trata de 78 mg de un material semisólido cuyo análisis por GC-MS permitió identificar/ cuantificar las siguientes sustancias volátiles:

- 1-Hexadeceno (**41**; **n= 13**; Tr= 14,845; 0,96 mg)
- Éster metílico del ácido pentadecanoico (**45**; **n= 13**; Tr= 16,584; 0,67 mg)
- 6, 10, 14-trimetil-2-pentadecanona, (**77**; Tr= 16,711; 1,43 mg)
- Éster metílico del ácido (Z)-9-hexadecenoico (**47**; **n= 5**, **m= 7**; Tr=17,145; 34,08 mg)
- Éster metílico del ácido 7,10,13-eicosatrienoico (**54**; Tr= 19,542; 12,6 mg)
- Éster metílico del ácido 6,9,12,15-docosatetraenoico (**55**; Tr= 20,205; 7,73 mg)
- Éster etílico del ácido (Z,Z)-9,12-eicosadienoico (*linoleico*) (**53**; Tr= 21,454; 6,18 mg)
- Éster 2,3-dihidroxipropílico del ácido (Z,Z)-9,12-octadecadienoico (**63**; Tr= 22,143; 4,4 mg)
- Éster metílico del ácido docosanoico (**45**; **n= 20**; Tr= 22,244; 0,46 mg)
- Éster metílico del ácido tetracosanoico (**45**; **n= 22**; Tr= 25,823; 1,14 mg)

Con un peso total de 8,35 mg de material no volátil cuyos componentes, como antes, o no se volatilizaron a la temperatura del inyector usada o se salieron del tiempo de análisis prefijado en el método. Un estudio de la curva integral del espectro de <sup>1</sup>H-RMN de esta fracción indica que se trata de una mezcla 1,0: 2,3: 0,4 de ftalatos de *n*-alquilo (**83**) { $\delta$  7,74- 7,45 (dos dd característicos); 4,3 (4H t característico)}; peróxido del ergosterol (**86**) y 9(11)-dehidroperóxido del ergosterol (**87**) { $\delta$  6,55- 6,20 (dos sistemas AB característicos ligeramente desplazados el uno del otro); 5,43- 5,10 (m, protones vinílicos); 3,96 (m característico de H geminal a hidroxilo en C-3)}; 2,14- 0,60 (m, x CH<sub>2</sub>; y CH<sub>3</sub>). Estas deducciones vienen confirmadas por el espectro de <sup>13</sup>C-RMN, en el que se observan carbonos carbonílicos ( $\delta$  179,440); aromáticos ( $\delta$  167,80); olefínicos ( $\delta$  135,000- 126,000); geminales a átomos de oxígeno ( $\delta$  82,000- 65,000); y metinos/ metilenos/ metilos ( $\delta$  55,000- 12,500).

**Prm-L-1-b-2:**

Se trata de 23 mg de un semisólido en el que, mediante un análisis por GC-MS, se identificaron/ cuantificaron las siguientes sustancias volátiles:

- Éster metílico del ácido 9-oxo-nonanoico (**71**; Tr= 13,680; 0,1500 mg)
- Éster 1-(hidroximetil)-1,2-etanodílico del ácido tetradecanoico (**59**; Tr= 14,751; 0,0501 mg)
- 1-Hexadeceno (**41**; **n= 13**; Tr= 14,842; 0,2276 mg)
- Éster metílico del ácido tetradecanoico (**45**; **n= 12**; Tr= 15,882; 0,094 mg)
- Ácido (Z)-3-octil-oxiranooctanoico (**48**; Tr= 16,220; 0,045 mg)
- Éster metílico del ácido pentadecanoico (**45**; **n= 13**; Tr= 16,595; 0,436 mg)
- Éster metílico del ácido 14-metilpentadecanoico (**56**; Tr= 17,267; 14,39 mg)
- Éster metílico del ácido heptadecanoico (**45**; **n= 15**; Tr= 17,908; 0,308 mg)
- Éster metílico del ácido 11-octadecenoico (**47**; **n= 5**, **m= 9**; Tr= 18,382; 0,7964 mg)
- Éster metílico del ácido octadecanoico (**45**; **n= 16**; Tr= 18,522; 1,46 mg)

Resultando un total de 5,0429 mg de material no volátil constituido por componentes que, como antes, o no se volatilizaron a la temperatura del inyector usada o se salieron del tiempo de análisis prefijado en el método. Un estudio de la curva integral del espectro de <sup>1</sup>H-RMN de esta fracción en lo referente a los dos sistemas AB desplazados a  $\delta$  6,65- 6,1 indica que se trata de una mezcla 6,0: 1,0 (86 %: 14 %) del peróxido del ergosterol (**86**) y del 9(11)-dehidroperóxido del ergosterol (**87**) { $\delta$  6,65- 6,21 (dos sistemas AB característicos, ligeramente desplazados); 5,45-

5,02 (m, protones vinílicos); 3,97 (m característico de H geminal a hidroxilo en C-3); 3,68 (protón hidroxílico); 2,42- 0,72 (m, metilenos y metilos). Esta fracción se sometió a HPLC semipreparativa (fase normal, hexano-acetato de etilo, 80: 20), lo que rindió unos 3 mg del peróxido del ergosterol puro (**86**):

P.f.= 177- 179 °C

IR (CHCl<sub>3</sub>).- 3618,18; 3024,99; 3011,06; 2957,69; 2933,7; 2871,04; 1603,24; 1461,19; 1377,92; 1221,18; 1208,93 y 973,53 ( $\Delta^{22}$ -trans) cm<sup>-1</sup>.

EM m/ z (%) 428,329 (1,8 %); 410,042 (1,0 %); 396,113 (100 %); 363,099 (88,2 %); 303,052 (1,7 %); 271,062 (19,0 %); 253,076 (17,2 %); 217,061 (11,6 %).

<sup>1</sup>H-RMN (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>).- 6,58- 6,11 (2H, sistema AB característico,  $\underline{\text{CH}}=\underline{\text{CH}}$ ); 5,17- 5,00 (2H, m, C= $\underline{\text{CH}}$ ); 3,98 (1H, m,  $\underline{\text{CH}}\text{-OH}$ ); 2,15- 1,19 (20H, m,  $\underline{\text{CH}}$  y  $\underline{\text{CH}}_2$ ); 1,08- 0,74 (18H,  $\underline{\text{CH}}_3$ ).

<sup>13</sup>C-RMN (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>).- 12,921; 17,595; 18,231; 19,691; 19,986; 20,669; 20,933; 23,433; 28,681; 29,721; 30,140; 33,090; 34,721; 36,987; 39,363; 39,767; 42,794; 44,580; 51,101; 51,707; 56,209; 66,504; 79,453; 82,046; 130,703; 132,305; 135,209; 135,411.

### La fracción Prm-L-1-c

Consistió en 110 mg de un material aceitoso que se mostró como una mezcla de seis sustancias por TLC analítica. Un análisis por GC-MS permitió identificar/ cuantificar los siguientes componentes volátiles:

2-Butil-1-octanol (**43**; n= 3, m= 3; Tr= 12,528; 0,14 mg)

2-Hexil-1-octanol (**43**; n= 3, m= 5; Tr=13,252; 0,055 mg)

3,7,11-trimetil-1-dodecanol (**76**; Tr= 14,471; 0,34 mg)

2-Hexil-1-decanol (**43**; n= 5, m= 5; Tr= 15,647; 0,131 mg)

Éster metílico del ácido hexadecanoico (**45**; n= 14; Tr= 17,290; 5,78 mg)

Ftalato de dibutilo (**81**; Tr= 17,647; 7,518 mg)

Éster metílico del ácido octadecanoico (**45**; n= 16; Tr= 18,552; 0,86 mg)

Ácido (Z)-13-docosenoico (*erucico*) (**46**; n= 7, m= 11; Tr= 19,815; 0,3 mg)

Ftalato de bis(2-etilhexilo) (**85**; Tr= 22,648; 0,94 mg)

Ello dió un total de 93,936 mg de material no volátil que, por HPLC semipreparativa, se fraccionó en dos, a saber, la fracción Prm-L-1-c-1 y la fracción Prm-L-1-c-2.

### Prm-L-1-c-1

Consistió en 55 mg de una sustancia sólida de color blanco que se identificó de nuevo como el peróxido del ergosterol (**86**) por sus constantes fisicoquímicas y datos espectroscópicos:

P.f.= 178- 180 °C (cristalizado a partir de metanol)

$[\alpha]_D^{20^\circ}$ (CHCl<sub>3</sub>, c 1,24) = -25°

IR (CHCl<sub>3</sub>).- 3618,18; 3024,99; 1603,24; 1461,19; 1377,92; 1221,18; 1208,93; 973,53 ( $\Delta^{22}$ -trans) cm<sup>-1</sup>.

EM, m/ z (%): 428,917 (1,4 %); 410,921 (3,0 %); 395,069 (33,6 %); 362,991 (16,2 %); 336,997 (7,2 %); 252,956 (7,1 %); 151,972 (28,8 %); 80,981 (48,6 %); 68,991 (93,7 %); 28,105 (100 %).

EMAR, m/ z (fórmula): 428,32890 (C<sub>28</sub>H<sub>44</sub>O<sub>3</sub>); 410,31140 (C<sub>28</sub>H<sub>42</sub>O<sub>2</sub>); 396,33612 (C<sub>28</sub>H<sub>44</sub>O); 303,19601 (C<sub>19</sub>H<sub>27</sub>O<sub>3</sub>).

<sup>1</sup>H-RMN (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>).- 6,58- 6,19 (2H, sistema AB característico,  $\underline{\text{CH}}=\underline{\text{CH}}$ ); 5,23 (2H, m, C= $\underline{\text{CH}}$ ); 4,01 (1H, m,  $\underline{\text{CH}}\text{-OH}$ ); 3,65 (1H,  $\underline{\text{OH}}$ ); 2,20- 1,18 (20H, m,  $\underline{\text{CH}}$  y  $\underline{\text{CH}}_2$ ); 1,08- 0,75 (18H,  $\underline{\text{CH}}_3$ ).

$^1\text{H}$ -RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).- Ver la tabla III-3.

$^{13}\text{C}$ -RMN (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).- 12,890; 17,595; 18,200; 19,675; 19,986; 20,653; 20,902; 23,417; 28,681; 29,721; 30,140; 33,090; 34,705; 36,972; 39,363; 39,782; 42,794; 44,580; 51,086; 51,691; 56,209; 66,504; 79,453; 82,185; 130,784; 132,337; 135,240; 135,442.

$^{13}\text{C}$ -RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).- Ver tabla III-3.

### **Prm-L-1-c-2**

50 mg de un semisólido en el que, por GC-MS, han sido identificados algunos componentes volátiles minoritarios:

1-Pentadeceno (**41**; **n= 12**; Tr= 13,972; 0,098 mg)

1-Eicosanol (**42**; **n= 18**; Tr= 16,327; 0,073 mg)

Éster metílico del ácido 2-octil-ciclopropanododecanoico (**49**; Tr= 16,509; 0,63 mg)

Éster (Z,Z)-9-octadecenílico del ácido 9-octadecenoico (**64**; Tr= 19,769; 0,533 mg)

Con un peso total de 48,666 mg de material no volátil que, como antes, o no se volatilizó a la temperatura del inyector usada o se salieron del tiempo de análisis prefijado en el método. Un estudio del espectro de  $^1\text{H}$ -RMN indica que, de nuevo, se trata del peróxido del ergosterol (**86**) { $\delta$  6,57- 6,17 (2H, sistema AB característico,  $\text{CH}=\text{CH}$ ); 5,21 (2H, m,  $\text{C}=\text{CH}$ ); 4,10 (1H, m,  $\text{CH}-\text{OH}$ ); 2,43 (1H,  $\text{OH}$ ); 2,20- 1,16 (20H, m,  $\text{CH}$  y  $\text{CH}_2$ ); 1,09- 0,72 (18H,  $\text{CH}_3$ )}

### **Estudio de la fracción liposoluble-2 (Prm-L-2)**

Se obtuvieron 710 mg de este material, con aspecto de semisólido. Por CCF analítica, se observan 5 sustancias mayoritarias. Su espectro de  $^1\text{H}$ -RMN desplazó protones aromáticos ( $\delta$  8,4-6,91), olefínicos ( $\delta$  5,54- 5,22), geminales a heteroátomos ( $\delta$  4,51- 3,49) y los propios de cadenas hidrocarbonadas saturadas ( $\delta$  2,84- 0,75). El espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN delató carbonos carbonílicos ( $\delta$  173,529), aromáticos ( $\delta$  146,419- 142,103), olefínicos ( $\delta$  132,305- 127,880), geminales a heteroátomos ( $\delta$  76,642- 54,439) y típicos de cadenas hidrocarbonadas alifáticas ( $\delta$  42,825- 14,117). Estos datos indican la presencia de una mezcla de hidrocarburos aromáticos, endoperóxidos y triglicéridos poliinsaturados.

Esta fracción se filtró a través de Sephadex (LH-20 lipofílico), lo que originó las siguientes subfracciones: **Prm-L-2-a**, **Prm-L-2-b**, **Prm-L-2-c** y **Prm-L-2-d**.

### **Prm-L-2-a**

Se trata de 35 mg de un material aceitoso en el que se identificaron/ cuantificaron por GC-MS sólo dos componentes volátiles, presentes a nivel traza:

Ftalato de dibutilo (**81**; Tr= 17,657; 0,048 mg)

Éster metílico del ácido (Z)-13-docosenoico (*erucico*) (**46**; **n= 7**, **m= 11**; Tr= 19,816; 0,034 mg)

Ello dió un total de 34,918 mg de material no volátil que, como antes, o no se volatilizó a la temperatura del inyector usada o se salieron del tiempo de análisis prefijado en el método. Un estudio del espectro de  $^1\text{H}$ -RMN ( $\delta$  1,92- 0,73) indica que se trata de una mezcla de alcanos de alto peso molecular.

**Prm-L-2-b**

Se trata de 355 mg de un aceite en el que, por GC-MS, se detectaron/ cuantificaron las siguientes sustancias volátiles traza:

2-Butil-1-octanol (**43**; **n= 3**, **m= 3**; Tr= 12,527; 0,0287 mg)

Ftalato de dibutilo (**83**; **n= 3**; Tr= 17,648; 7,352 mg)

Éster etílico del ácido 13-formiltridecanoico (**73**; Tr= 18,352; 0,0988 mg)

Éster 2-hidroxi-1-(hidroximetil) etílico del ácido (Z,Z)-9,12-octadecadienoico (**62**; Tr= 18,811; 0,0637 mg)

Éster 2-(octadeciloxi) etílico del ácido hexadecanoico (**70**; Tr= 18,990; 0,1233 mg)

Ftalato de bis(4-metilpentilo) (**84**; **n= 3**; Tr= 20,418; 0,14 mg)

Ftalato de dihexilo (**83**; **n= 5**; Tr= 22,745; 0,382 mg)

Ftalato de dioctilo (**83**; **n= 7**; Tr= 26,395; 0,316 mg)

Por HPLC analítica (fase normal, Hexano: AcOEt, 1: 1) se observan dos picos mayoritarios; éstos se separaron por HPLC semipreparativa en las mismas condiciones, resultando las siguientes fracciones: **Prm-L-2-b-1** y **Prm-L-2-b-2**.

**Prm-L-2-b-1**

Se trata de 270 mg de un sólido blanco que cristaliza a partir de metanol para dar cristales con p.f.= 171- 176 °C y  $[\alpha]_D^{20} = -9.7$  (CHCl<sub>3</sub>, c 1,2). En su espectro IR se observan grupos hidroxilos a 3400,00 cm<sup>-1</sup>. Por el resto de sus datos espectroscópicos (fundamentalmente la integral del espectro de <sup>1</sup>H-RMN a 400 MHz, en la zona de los dos sistemas AB que se resuelven en el intervalo  $\delta$  6,55- 6,15 se identificó como una mezcla 79: 21 del peróxido del ergosterol (**86**) y el 9(11)-dehidroperóxido del ergosterol (**87**). De nuevo, esta deducción se confirma mediante el espectro de <sup>13</sup>C-RMN a 250 MHz, en el que se encuentran los carbonos del componente mayoritario (**86**) a  $\delta$  12,875; 17,579; 18,185; 19,660; 19,970; 20,638; 20,902; 23,402; 28,665; 29,686; 30,094; 33,075; 34,690; 36,972; 39,332; 39,767; 42,779; 44,564; 51,070; 51,691; 56,194; 66,488; 79,453; 82,185; 130,768; 132,321; 135,224; 135,426 y algunos del minoritario a  $\delta$  125,000; 130,784; 130,970; 132,337; 135,240; 135,442; así como por el espectro de masas de alta resolución en el que se puede apreciar picos a m/z 428,32761 (4,7 %; calculado para C<sub>28</sub>H<sub>44</sub>O<sub>3</sub> 428,32905); 426,31196 (1,5 %; calculado para C<sub>28</sub>H<sub>42</sub>O<sub>3</sub> 426,31340); 410,3170 (10,7 %); 408,30139 (5,4 %); 396,33778 (32,2 %); 394,32213 (20,3 %); 303,19458 (5,9 %); 301,17893 (5,9 %).

**Prm-L-2-b-2**

Se trata de 30 mg de un material aceitoso en el que, por análisis GC-MS, se identificaron las siguientes sustancias:

Tetradecano (**40**; **n= 11**; Tr= 13,235; 0,0058 mg)

Heptadecano (**40**; **n= 14**; Tr= 15,642; 0,0240 mg)

Éster tetradecílico del ácido (Z)-9-hexadecenoico (**65**; **n= 5**; Tr= 16,501; 0,1400 mg)

Ello dió un total de 29,94 mg de material no volátil que, como antes, o no se volatilizó a la temperatura usada del inyector o se salieron del tiempo de análisis prefijado en el método. Por espectroscopía de <sup>1</sup>H-RMN, se revela como una mezcla de ceras esteroidales insaturadas ( $\delta$  5,56- 5,03 (C=CH); 4,81- 4,57 (COOCH); 2,84-2,64 (C=C-CH<sub>2</sub>-C=C); 2,15- 1,40 (CH<sub>2</sub>COO, CH y CH<sub>2</sub> de esqueletos esteroidales); 1,38- 1,11 (CH<sub>2</sub>, intensa, cadenas hidrocarbonadas largas); 1,04- 0,72 (CH<sub>3</sub>, intensa, metilos angulares de esqueletos esteroidales). Los intentos de separación de éstos resultaron infructuosos.

### Prm-L-2-c

Se trata de 109 mg de un material semisólido en el que, por análisis GC-MS, se detectaron los siguientes componentes volátiles:

Ftalato de dietilo (**83**; **n= 1**; Tr= 15,064; 0,0392 mg)  
1-Eicosanol (**42**; **n= 18**; Tr= 16,358; 0,0093 mg)  
Ftalato de dibutilo (**81**; Tr= 17,657; 1,6728 mg)  
Ftalato de bis(2-etilhexilo) (**85**; Tr= 22,651; 0,0523 mg)  
Ftalato de dioctilo (**83**; **n= 7**; Tr= 26,378; 0,034 mg)

Ello supone que esta fracción contiene 107,1924 mg de componentes no volátiles que, como antes, o no se volatilizaron a la temperatura usada del inyector o se salieron del tiempo de análisis prefijado en el método. Por HPLC semipreparativa en fase normal se obtuvieron dos subfracciones: **Prm-L-2-c-1** y **Prm-L-2-c-2**.

### Prm-L-2-c-1

Se trata de 10 mg de un material aceitoso en cuyo espectro de  $^1\text{H-RMN}$  se desplazan señales propias de ceras estructuralmente análogas a las identificadas por GC-MS en otras fracciones (**64-67**) ( $\delta$  5,57- 5,26 (C=CH); 4,81- 4,54 (COOCH); 2,83- 2,69 (C=C-CH<sub>2</sub>-C=C); 2,21- 1,48 (CH<sub>2</sub>CO, C=C-CH<sub>2</sub>); 1,43- 1,19 (CH<sub>2</sub>, intensa, cadenas hidrocarbonadas largas); 1,01- 0,74 (CH<sub>3</sub> terminales).

### Prm-L-2-c-2

Se trata de 83 mg de un material semisólido en el que se identificó un solo componente volátil por análisis GC-MS:

Éster dibutílico del ácido hexanodioico (**81**; Tr= 15,602; 0.039 mg)

Ello dió un total de 82,961 mg de material no volátil cuyos componentes, o no se volatilizaron a la temperatura usada del inyector o se salieron del tiempo de análisis prefijado en el método. Estos componentes se identificaron por integración del espectro de  $^1\text{H-RMN}$  como una mezcla 1,0: 2,0 de ftalatos de *n*-alquilo (**83**;  $n > 7$ ) { $\delta$  7,73 (2H, dd); 7,53 (2H, dd); 4,24 (4H, t)} y peróxido del ergosterol (**86**) { $\delta$  6,57- 6,17 (2H, sistema AB característico, CH=CH); 5,21 (2H, m, C=CH); 4,10 (1H, m, CH-OH); 2,17- 1,10 (m, CH y CH<sub>2</sub> del esqueleto esteroideal); 1,09- 0,72 (CH<sub>3</sub> angulares)}.

### Prm-L-2-d

Se trata de 105 mg de un aceite viscoso en el que, por análisis GC-MS, se pusieron de manifiesto los siguientes componentes volátiles:

4-Hidroxi-benzaldehido (**78**; Tr= 13,454; 0,1 mg)  
Benzofenona (**79**; Tr= 15,542; 0,064 mg)  
1-Eicosanol (**42**; **n= 18**, Tr= 16,352; 0,062 mg)  
Éster metílico del ácido pentadecanoico (**45**; **n= 13**; Tr= 16,622; 0,036 mg)  
Éster metílico del ácido hexadecanoico (**45**; **n= 14**; Tr= 17,290; 1,97 mg)  
9-Octadecenamida (**51**; Tr= 18,366; 0,85 mg)  
Éster metílico del ácido 8,11-octadecadienoico (**52**; **n= 5**, **m= 6**; Tr= 18,389; 1,0 mg)  
Éster metílico del ácido octadecanoico (**45**; **n= 16**; Tr= 18,556; 0,54 mg)

Tricosano (**40**; **n= 20**; Tr= 19,753; 0,53 mg)

Éster eicosílico del ácido (Z)-9-octadecenoico (**65**; **n= 7**; Tr= 19,817; 0,86 mg)

Con un total de 98,99 mg de material no volátil cuyos componentes, o no se volatilizaron a la temperatura usada del inyector o se salieron del tiempo de análisis prefijado en el método. Por análisis del espectro de  $^1\text{H-RMN}$  parece estar constituido por una mezcla de fenoles aldehídicos  $\{\delta 12,29; 12,10; 9,88; 7,91- 7,50; 7,15- 6,67\}$  y ceras. Éste se purificó por CC a baja presión (gel de sílice, hexano-acetato de etilo, 90: 10) lo que rindió la fracción **Prm-L-2-d-1** (25 mg), homogénea por CCF. Esta se cristalizó a partir de metanol para dar prismas incoloros de 4-hidroxibenzaldehído (**78**):

P.f.- 118- 119 °C (Metanol).

LR ( $\text{CHCl}_3$ ).- 3590,81; 3338,71; 3002,84; 1687,99; 1604,06; 1586,85; 1511,54; 1442,68; 1274,83; 1223,19; 1156,48; 1102,69; 859,53; 838,01  $\text{cm}^{-1}$ .

$^1\text{H-RMN}$ .- Ver tabla III-5

$^{13}\text{C-RMN}$ .- Ver tabla III-5

EM, m/z (%).- 106,0794 ( $\text{M}^+$ ; 2,5 %); 105,0747 ( $\text{M}^+\text{-H}$ ; 16,7 %); 79,0599 (52,61 %); 78,0516 ( $\text{M}^+\text{-CO}$ ; 25,43 %); 77,0444 ( $\text{M}^+\text{-H -CO}$ ; 72,4 %).

### Estudio de la fracción liposoluble-3 (Prm-L-3)

Se obtuvo como un aceite viscoso (380 mg) cuyo espectro de  $^1\text{H-RMN}$  ( $\text{DOCD}_3$ ) delata que se trata de uno o varios compuestos polihidroxílicos  $\{\delta = 5,16$  (1H, s ancho; 4,05- 3,35 (6H, m)). Este material se purificó por HPLC semipreparativa en fase reversa, lo que originó la fracción **Prm-L-3-1** (310 mg). Esta también se analizó por GC-MS, lo que permitió identificar/cuantificar las siguientes sustancias volátiles:

Benzofenona (**79**; Tr= 15,554; 1,5 mg)

1-Eicosanol (**42**; **n= 18**; Tr= 16,357; 1,66 mg)

Ácido 9-tetradecenoico (**46**; **n= 5**, **m= 5**; Tr= 16,538; 1,0054 mg)

Éster (2-fenil-1,3-dioxolan-4-il) metílico del ácido (Z)-9-octadecenoico (**60**; Tr= 20,724; 0,38 mg)

Ello dió un total de 305,45 mg de material no volátil cuyos componentes, o no se volatilizaron a la temperatura usada en el inyector o se salieron del tiempo de análisis prefijado en el método. Por análisis del espectro de  $^1\text{H-RMN}$  parece estar constituido por uno o varios monosacáridos en su forma de  $\alpha$ -piranosa  $\{\delta 5,10$  (1H, d, J= 3,6 Hz,  $\text{CH}$  anomérico); 3,83- 3,21 (9H, m,  $\text{CH}+\text{CH}_2$  geminales a grupos OH); el espectro de  $^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{DOCD}_3$ ) también apoyó dicha deducción ( $\delta 94,948$  para el carbono anomérico y 74,442- 54,716 para los otros carbonos).

Mediante un análisis de esta fracción por HPLC con una columna Shodex OH Pak SB806 HQ termostatada a 30 °C (agua con un 0,05 % de  $\text{NaN}_3$  como eluyente a un flujo de 1,0 ml/ min. y un detector de índice de refracción) después de filtrarla a través de un cartucho Sep-Pak  $\text{C}_{18}$  de Waters resultó estar constituida por dos componentes, uno minoritario (30,63 %) cuyo tiempo de retención (Tr= 11,481 min.) coincide con el del D-(-)-manitol {una inyección mixta de nuestra fracción Prm-L-3-1 con una muestra auténtica de D-(-)-manitol presentó el mismo cromatograma con el pico de la sustancia minoritaria (Tr= 11,481) incrementado en intensidad (57,38 %)} y otra mayoritaria (69,11 %) cuyo tiempo de retención (Tr= 12,711) no coincidió con muestras auténticas de monosacáridos comerciales como D-(+)-Glucosa (Tr= 11,481) o D-(+)-Manosa (Tr= 11,188).

Un estudio más detallado de esta sustancia supuso su purificación por recromatografía en columna de fase reversa (Merck, Lobar LiChroprep RP-18, 40- 63  $\mu\text{m}$ ; acetonitrilo: metanol:



agua, 80: 18: 2; CCF analítica con placas Merck RP-18F<sub>254S</sub>) y comparación de sus espectros de <sup>1</sup>H-RMN y <sup>13</sup>C-RMN (Tabla III-7) con los de patrones. Ello confirmó las deducciones anteriores observándose el espectro de la sustancia minoritaria {coincidente con el del D-(-)-manitol} superpuesto al del desconocido monosacárido en su forma de piranosa. Es por ello que se le ha asignado la estructura de D-(-)-manitol (**89**) a dicha sustancia minoritaria. A continuación se abordó la identificación de la mencionada “sustancia mayoritaria”. Una comparación de sus espectros de <sup>1</sup>H-RMN y <sup>13</sup>C-RMN con los de la D-(+)-glucosa, el clorhidrato de la D-(+)-glucosamina y las sales sódicas de la α-D-glucosamina 2(N)-sulfato y la α-D-glucosamina-1-fosfato (Tabla III-7) confirma que se trata de una hexosa en su forma cíclica - piranosa -, distinguiéndose de las anteriores, fundamentalmente, en la posición de las señales correspondientes al carbono anomérico a δ 94,9481 y un protón que se desplaza en forma de un doble doblete a δ 3,4685 (J<sub>ae</sub>= 3,6 Hz; J<sub>aa</sub>= 9,8 Hz). En este sentido, tanto el espectro <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H-COSY como el TOCSY y el NOESY muestran una clara correlación entre el protón anomérico a δ 5,0998 y el mencionado doble doblete a δ 3,4685. Ello permite asignar esta señal al protón unido al carbono 2 del anillo de piranosa, el cual, por otro lado, se acopla con el protón enlazado al carbono 3 con una constante de acoplamiento *trans*-diaxial de 9,8 Hz.

El espectro de masas de alta resolución (HRMS) de esta sustancia presentó un pico a m/z 207,029661 (C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>NP) que corresponde a [M-OOH]<sup>+</sup> así como un pico base a m/z 48,984330 [POH<sub>2</sub>]<sup>\*</sup>. Ello informa de que se trata de un compuesto organofosforado.

#### **Determinación del fósforo por el método heteropoliazul ortofosfórico.**

*Curva de calibrado:* Se pesaron, en matraz aforado de 25 ml, 64,2 mg de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O, se disolvió en agua y diluyó hasta 25 ml. A partir de ésta, por diluciones progresivas, se prepararon tres disoluciones patrón con 102,70; 4,10 y 0,16 µg respectivamente. De estas disoluciones se recogieron 10 ml e introdujeron en sendos matraces aforados de 25 ml de agua destilada. A continuación se añadieron 4 ml del reactivo Mo(V)/ Mo(VI) (Yoza y col., 1977; Tshako y col., 1980) y otros 6 ml de agua destilada. La mezcla se calentó en un baño de agua a 95 °C durante 1 h, se dejó enfriar, se diluyó con agua destilada hasta 25 ml y se midió la absorbancia a 830 nm mediante un espectrofotómetro “Thermo Electrón Corporation”.

Cada fracción (100 ml) del líquido que efluye de la columna en fase reversa (*LiChroprep RP-18*) con el metabolito puro según informa la TLC se llevaron a sequedad en rotavapor y redisolviéron en 10 ml de agua destilada. A continuación se añadieron 4 ml del reactivo Mo(V)/ Mo(VI) y otros 6 ml de agua destilada. La mezcla se calentó en un baño de agua a 95 °C durante 1 h, se dejó enfriar, se diluyó con agua destilada hasta 25 ml y se midió la absorbancia a 830 nm mediante el mismo espectrofotómetro. Lecturas directas en la curva de calibrado dieron cantidades de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O de 8,44– 13,44 µg (37– 59 µmoles de fosfato o glucosamina N-fosfatada). Las fracciones eluidas contuvieron, pues, el mencionado metabolito fosfatado (**92**) a concentraciones de 0,37– 0,59 M.

Es por ello que se le ha propuesto una estructura de α-hexosa con uno de sus hidroxilos (el C<sub>2</sub>-OH) sustituido por un grupo amino fosfatado, según se deduce del espectro de <sup>1</sup>H-NMR {C<sub>2</sub>H resuena a δ 3,4685 en forma de un doble doblete característico (J<sub>ae</sub>= 3,6 Hz; J<sub>aa</sub>= 9,8 Hz)} (**92**).

En este momento están en progreso los trabajos orientados hacia su síntesis y posible actividad biológica.

#### **Estudio de la fracción hidrosoluble (Prm-H-0)**

Fracción que se obtuvo directamente de la fase acuosa resultante de separar la liposoluble del extracto bruto, y que se reextrajo (igual volumen, x1) con 2-butanol. Por evaporación del disolvente se obtuvieron 1761 mg de un aceite viscoso (**Prm-H-0**) que se mostró como “muy polar” por cromatografía en capa fina en fase normal. En el espectro de <sup>1</sup>H-RMN de esta fracción bruta se observan protones geminales a heteroátomos (δ 3,83– 3,21) y los típicos de cadenas

hidrocarbonadas insaturadas ( $\delta$  5,32 y 2,31- 0,79). El espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN muestra carbonos olefínicos ( $\delta$  130,240- 127,865); geminales a heteroátomos ( $\delta$  77,590- 54,517) y típicos de cadenas hidrocarbonadas alifáticas ( $\delta$  31,507- 9,598). Se deduce, por tanto, la probable presencia de una mezcla de azúcares con impurezas de las fracciones lipídicas anteriores. En efecto, por GC-MS se detectaron los siguientes componentes lipídicos volátiles:

Isovalerato de geranilo (**75**; Tr= 14,005; 10,28 mg)  
 Éster tetradecílico del ácido (Z)-9-octadecenoico (*oleico*) (**65**; n= 7; Tr= 19,818; 4,98 mg)  
 Pentacosano (**40**; n= 22; Tr= 21,820; 2,86 mg)

Por HPLC a escala semipreparativa y fase reversa se separaron dos subfracciones, **Prm-H-0-1** y **Prm-H-0-2**.

### Prm-H-0-1

Se trató de 8,5 mg de un aceite viscoso. Por GC-MS se detectaron en él los siguientes componentes volátiles:

Dodecano (**40**; n= 9; Tr= 12,075; 0,00032 mg)  
 2-Butil-1-octanol (**43**; n= 3, m= 3; Tr= 12,517; 0,00053 mg)  
 1,1'-[1,2-etanodilbis(oxi)]-(Z,Z)-bis-9-octadeceno (**68**; Tr= 13,427; 0,00047 mg)  
 Ácido tetradecanoico (**44**; n= 12; Tr= 14,766; 0,00131 mg)  
 9-Octadecenamida (**51**; Tr= 18,352; 0,00475 mg)  
 Éster (Z)-9-octadecenílico del ácido (Z)-9-octadecenoico (**64**; Tr= 19,796; 0,00401 mg)

Ello dió un total de 8,49 mg de material no volátil cuyos componentes, o no se volatilizaron a la temperatura usada del inyector o se salieron del tiempo de análisis prefijado en el método. Por análisis del espectro de  $^1\text{H}$ -RMN parece estar constituido por fosfo- y glicolípidos que quedaron sin identificar.

### Prm-H-0-2

Se trató de 1670 mg de un material semisólido en el que, por GC-MS, se detectaron los siguientes componentes lipídicos volátiles:

Éster (2-pentadecil-1,3-dioxolan-4-il) metílico del ácido hexadecanoico (**61**; Tr= 12,178; 3,27 mg).  
 2-Butil-1-octanol (**43**; n= 3, m= 3; Tr= 12,528; 0,22 mg)  
 2-Hexil-1-decanol (**43**; n= 5, m= 5; Tr= 15,649; 0,16 mg)  
 Ácido pentadecanoico (**44**; n= 13; Tr= 15,906; 0,22 mg)  
 Éster metílico del ácido 14-metil-pentadecanoico (**56**; Tr= 17,279; 0,61 mg)  
 Ácido (Z)-13-Docosenoico (*erúico*) (**46**; n= 7, m= 11; Tr= 19,810; 0,59 mg)

Con un total de 1664,93 mg de material no volátil cuyos componentes, o no se volatilizaron a la temperatura usada del inyector o se salieron del tiempo de análisis prefijado en el método. Por análisis del espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (DOCD<sub>3</sub>) parece estar constituido por un monosacárido en su forma de piranosa { $\delta$  5,13 (1H, m,  $\text{CH}$  anomérico); 3,89- 3,35 (6H, m,  $4\text{CH}+1\text{CH}_2$  geminales a O u otros heteroátomos)}. Es por ello que, de nuevo, se le ha identificado como una mezcla de manitol (**89**) y la nueva hexosa N-fosfatada discutida anteriormente (**92**).

### III-6. Referencias Bibliográficas

- Amade, P., Mallea, M. and Bouaiacha, N. 1994 Isolation, structural identification and biological activity of two metabolites produced by *Penicillium olsonii* Bainier and Sartory. **J. Antibiot.**, v. 47, n. 2, p. 201-207.
- Anderson, B.A. 1978 Mass spectrometry of fatty acid pyrrolidides. **Prog. Chem. Fats Lipids**, v. 16, pp. 279-308.
- Applegarth, D.A. 1966 An unusual amino sugar derivative from the cell wall of *Penicillium notatum*. **Nature**, n. 5060, pp. 434-435.
- Applegarth, D.A. and Bozoian, G. 1968 The cell wall of *Penicillium roquefortii*. **Can. J. Microb.**, v. 14, pp. 489-490.
- Archbald, P.J., Fenn, M.D. and Roy, A.B. 1981 <sup>13</sup>C NMR studies of D-glucose and D-galactose monosulfates. **Carbohydrate Research**, v. 93, n. 2, pp. 177-190.
- Arnoux, B., Merrien, M.A., Pascard, C., Polonsky, J. and Scott, P.M. 1978 Crystal structure and absolute configuration of isofumigaclavine A, a metabolite of *Penicillium roqueforti*. **J. Chem. Res.**, v. 6, pp. 210-211.
- Arnoux, B., Pascard, C. and Moreau, S. 1977 Eremofortin D, a valencane-class sesquiterpene. **Acta Cryst. B: Struct. Cryst. and Crystal Chem.**, v. 33, n. 9, pp. 2930-2932.
- Bellinck, C. 1975 Chemical study of *Penicillium* and *Trichoderma* pigments. **Ann. Microbiol.**, v. 126 (A), n. 2, pp. 131-142.
- Bhat, B., Harrison, D.M. and Lamont, H.M. 1993 The biosynthesis of the mould metabolites Roquefortine and Aszonalenin from L-[2,4,5,6,7-<sup>2</sup>H<sub>5</sub>] Tryptophan. **Tetrahedron**, v. 49, n. 46, pp. 10663-10668.
- Blomquist, G., Andersson, B., Andersson, K. and Brondz, I. 1992 Analysis of fatty acids. A new method for characterization of molds. **J. Microb. Methods**, v. 16, n. 1, pp. 59-68.

- Bobylev, M.M., Bobyleva, L.I. and Strobel, G.A. 1999 Natural products containing phenylalanine as potential bioherbicides. *In: Biologically Active Natural Products: Agrochemicals and Pharmaceuticals*. Cutler H.G. and Cutler S.J. (eds.) CRC Press, Boca Raton, pp. 169-174.
- Bock, K. and Pedersen, C. 1974 A study of  $^{13}\text{C}$  coupling constants in Hexopyranoses. **J. Chem. Soc. Perkin II**, pp. 293-297.
- Boysen, M.E., Jacobsson, K.G. and Schnürer, J. 2000 Molecular identification of species from the *Penicillium roqueforti* group associated with spoiled animal feed. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, n. 4, pp. 1523-1526.
- Boysen, M., Skouboe, P., Frisvad, J. and Rossen, L. 1996 Reclassification of the *Penicillium roqueforti* group into three species on the basis of molecular genetic and biochemical profiles. **Microbiology**, v. 142, n. 3, pp. 541-549.
- Brueckner, H. and Reinecke, C. 1988 GC-MS detection of Aib-containing polypeptide mycotoxins (antibiotics) in *Penicillium roqueforti* and other filamentous fungi. **J. High Res. Chromat. Chromat. Commun.**, v. 11, n. 10, pp. 735-738.
- Bulman, R.A. and Chittenden, G.J.F. 1976 The mycelial cell wall of *Penicillium charlesii* G. Smith. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 444, pp. 202-211.
- Calvert, M.J., Ashton, P.R. and Allemann, R.K. 2002 Germacrene A is a product of the Aristolochene synthase-mediated conversion of Farnesylpyrophosphate to Aristolochene. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 124, n. 39, pp. 11636-11641.
- Carballeira, N.M., Miranda, C., Lozano, C.M., Nechev, J.T., Ivanova, A., Ilieva, M., Tzvetkova, I. and Stefanov, K. 2001 Characterization of novel methyl-branched chain fatty acids from a halophilic *Bacillus* species. **J. Nat. Prod.**, v. 64, pp. 256-259.
- Caruthers, J.M., Kang, I., Rynkiewicz, M.J., Cane, D.E. and Christianson, D.W. 2000 Crystal structure determination of aristolochene synthase from the blue cheese mold, *Penicillium roqueforti*. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 33, pp. 25533-25539.

- Chalier, P. and Crouzet, J. 1992 Production of lactones by *Penicillium roqueforti*. **Biotechnol. Lett.**, v. 14, n. 4, pp. 275-280.
- Chang, S.C., Lu, K.L. and Yeh, S.F. 1993 Secondary metabolites resulting from degradation of PR toxin by *Penicillium roqueforti*. **Appl. Environ. Microb.**, v. 59, n. 4, pp. 981-986.
- Chang, S.C., Wei, Y.H., Wei, D.L., Chen, Y.Y. and Jong, S.C. 1991 Factors affecting the production of Eremofortin C and PR toxin in *Penicillium roqueforti*. **Appl. Environ. Microb.**, v. 57, n. 9, pp. 2581-2585.
- Chang, S.C., Yeh, S.F., Li, S.Y., Lei, W.Y. and Chen, M.Y. 1996 A novel secondary metabolite relative to the degradation of PR toxin by *Penicillium roqueforti*. **Curr. Microbiol.**, v. 32, n. 3, pp. 141-146.
- Chou, S., Chedore, P., Haddad, A., Paul, N.R. and Kasatiye, S. 1996 Direct identification of *Mycobacterium* species in Bactec 7H12B medium by gas-liquid chromatography. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, n. 5, pp. 1317-1320.
- Chung, H.Y., Yung, I.K.S. and Kim, J.S. 2001 Comparison of volatile compounds in dried scallops (*Chlamys farreri* and *Patinopecten yessoensis*) prepared by boiling and steaming methods. **J. Agric. Chem.**, v. 49, pp. 192-202.
- Cooper, W.J. and Blumer, M., 1968 Linear, iso and anteiso fatty acids in recent sediments of the North Atlantic. **Deep-Sea Research**, v. 15, pp. 535-540.
- Cranwell, P.A., 1973 Branched-chain and cyclopropanoid acids in a recent sediment. **Chemical Geology**, v. 11, pp. 307-313.
- Cranwell, P.A., 1974 Monocarboxylic acids in lake sediments: indicators, derived from terrestrial and aquatic biota, of palaeoenvironmental trophic levels. **Chemical Geology**, v. 14, pp. 1-14.
- Dartey, C.K. and Kinsella, J.E. 1973 Metabolism of carbon-14-uniformly-labeled lauric acid to methyl ketones by the spores of *Penicillium roqueforti*. **J. Agric. Food Chem.**, v. 21, n. 6, pp. 933-936.

- Deligeorgopoulou, A. and Allemann, R.K. 2003 Evidence for differential folding of farnesyl pyrophosphate in the active site of aristolochene synthase: a single-point mutation converts aristolochene synthase into an (E)- $\beta$ -farnesene synthase. **Biochemistry**, v. 42, n. 25, pp. 7741-7747.
- Demyttenaere, J.C.R., Adams, A., Van Belleghem, K., De Kimpe, N., Konig, W.A. and Tkachev, A.V. 2002 De novo production of (+)-aristolochene by sporulated surface cultures of *Penicillium roqueforti*. **Phytochemistry**, v. 59, n. 6, pp. 597-602.
- Dolezalek, J. and Hoza, I. 1969 Effect of *Penicillium roqueforti* on the formation of aldehydes and methyl ketones. **Prumysl Potravin**, v. 20, n. 6, pp. 171-175.
- Duncan, W.R.H., Lough, A.K., Garton, G.A. and Brooks, P. 1974 Characterization of branched chain fatty acids from subcutaneous triacylglycerols of barley-fed lambs. **Lipids**, v. 9, pp. 669-673.
- Engel, G. und Spicher, G. 1985 Die Erreger der Schimmelbildung bei Backwaren. Differenzierung der von Schnittbrotten isolierten *Penicillium-roqueforti* Staemme nach duennschichtchromatographischer Auftrennung von Stoffwechselprodukten. **Getreide, Mehl und Brot**, v. 39, n. 4, pp. 123-125.
- Engel, G. and Teuber, M. 1983 Differentiation of *Penicillium roqueforti* strains by thin layer chromatography of metabolites. **Milchwissenschaft**, v. 38, n. 9, pp. 513-516.
- Fan, T.Y. and Kinsella, J.E. 1976 Changes in biochemical components during the germination of spores of *Penicillium roqueforti*. **J. Sci. Food Agric.**, v. 27, n. 8, pp. 745-752.
- Fisch, M.H., Ernst, R., Flick, B.H., Arditti, J., Barton, D.H.R., Magnus, P.D. and Menzies, I.D. 1973 Identity of ergosterol 5 $\beta$ , 8 $\beta$ -peroxide. **J. Chem. Soc. Chem. Commun.**, v. 23, pp. 530.
- Freemantle, M. 2004 Designer liquids in polymer systems. **Science Technology**, v. 82, n. 18, pp. 26-29.

- Frisvad, J.C. 1981 Physiological criteria and mycotoxin production as aids in identification of common asymmetric penicillia. **Appl. Environ. Microb.**, v. 41, n. 3, pp. 568-579.
- Gehrig, R.F. and Knight, S.G. 1958 Formation of ketones from fatty acids by spores of *Penicillium roqueforti*. **Nature**, v. 182, n. 4644, pp. 1237.
- Gock, M.A., Hocking, A.D., Pitt, J.I. and Poulos, P.G. 2003 Influence of temperature, water activity and pH on growth of some xerophilic fungi. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 1, n. 81, pp. 11-19.
- Godinho, M. and Fox, P. F. 1981 Effect of sodium chloride on the germination and growth of *Penicillium roqueforti*. **Milchwissenschaft**, v. 36, n. 4, pp. 205-208.
- González, A.G., Barrera, J.B. and Marante, F.J.T. 1983 The steroids and fatty acids of the basidiomycete *Scleroderma polyrhizum*. **Phytochemistry**, v. 22, n. 4, pp. 1049-1050.
- Grimalt, J.O. and Albaigés, J. 1990 Characterization of the depositional environment of the Ebro Delta (Western Mediterranean) by the study of sedimentary lipid markers. **Marine Geology**, v. 95, pp. 207-224.
- Hall, C.R., Inch, T.D., Pottage, C., Williams, N.E, Campbell, M.M. and Kerr, P.F. 1983 Use of carbohydrate derivatives for studies of Phosphorus stereochemistry. Preparation and some reactions of 1,3,2-Oxazaphospholidine-2-ones and -2-thiones derived from 2-Deoxy-3,4,6-tri-O-methyl-2-methylamino-D-glucopyranose. **J. Chem. Soc. Perkin Trans. I**, pp. 1067-1975.
- Hanes, C.S. and Isherwood, F.A. 1949 Separation of the phosphoric esters on the filter paper chromatogram. **Nature**, n. 4183, pp. 1107-1113.
- Harris, M.J. and Turvey, J.R. 1970a Sulphates of monosaccharides and derivatives. **Carbohydr. Res.**, v. 15, pp. 51-56.
- Harris, M.J. and Turvey, J.R. 1970b Sulphates of monosaccharides and derivatives. The conformations of glycoside sulphates in solution determined by N.M.R. spectroscopy. **Carbohydr. Res.**, v. 15, pp. 57-63.

- Hassanien, F.R., Ragab, M. and El-Makhzangy, A. 1986 Studies on the possibility of producing fats from food wastes by using microorganisms. Factors affecting fat production from different fungi. **Fette, Seifen, Anstrichmittel.**, v. 88, n. 1, pp. 33-38.
- Inoue, Y. and Nagasawa, K. 1973 Synthesis and spectral properties of N-sulfated and/ or O-sulfated amino alcohols. **J. Org. Chem.**, v. 38, n. 10, pp. 1810-1813.
- Jackson, H.W. and Hussong, R.V. 1958 Secondary alcohols in blue cheese and their relation to methyl ketones. **J. Dairy Sci.**, v. 41, pp. 920-924.
- Jelen, H.H. 2002 Volatile sesquiterpene hydrocarbons characteristic for *Penicillium roqueforti* strains producing PR toxin. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, n. 22, pp. 6569-6574.
- Kakisawa, H., Asari, F., Kusumi, T., Toma, T., Sakurai, T., Oohusa, T., Hara, Y., Chihara, M. 1988 An allelopathic fatty acid from the brown alga *Cladosiphon okamuranus*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 3, pp. 731-735.
- Kamenarska, Z.G., Dimitrova-Konaklieva, S., Nicolova, C.H., Kujungiev, A., Stefanov, K. and Popov, S. 2000 Volatile components of the freshwater algae *Spirogyra* and *Mongetia*. **Z. Naturforsch.**, v. 55, pp. 495-499.
- Kamerling, J.P., Rijkse, I., Maas, A.A.M., Van Kuik, J.A. and Vliegthart, J.F.G. 1988 Sulfated N-linked carbohydrate chains in porcine thyroglobulin. **Febs Lett.**, v. 241, pp. 246-250.
- Kaneda, T. 1991 *Iso-* and *anteiso-*fatty acids in bacteria: biosynthesis, function and taxonomic significance. **Microb. Rev.**, v. 55, pp. 288-302.
- Kanota, K. 1969 Toxic metabolites of *Penicillium roqueforti*. **Eisei Shikensho Hokoku**, v. 87, pp. 31-35.
- Kanota, K. 1970 Toxic metabolites of *Penicillium roqueforti*. Herzberg, M. (Ed.), **Proceedings of the U. S. - Jap. First Conf. Toxic Micro-Organisms**, Meeting Date 1968, pp. 129-132.
- Kaufmann, H.P., Ahmad, A.K.S. and Radwan, S.S. 1966 Component lipids of *Penicillium roqueforti* and *Penicillium caseicolum*. **Fette, Seifen, Anstric.**, v. 68, n. 6, pp. 498-503.



- Knight, S.G. 1966 Transformation: a unique enzymic activity of mold spores and mycelium. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 139, n. 1, pp. 8-15.
- Kolousek, J. and Michalik, S. 1954 Nitrogenous constituents and metabolites of *Penicillium roqueforti*. **Sbornik Ceskoslov. Akad. Zemedel. Ved.**, v. 27 (A), pp. 281-286.
- Kopp-Holtwiesche, B. and Rehm, H.J. 1990 Antimicrobial action of roquefortine. **J. Environ. Pathol., Toxicol. Oncol.**, v. 10, n. 1-2, pp. 41-44.
- Kosuge, T. and Kamiya, H. 1960 A new cyclic dipeptide from peptone. **Nature**, v. 188, pp. 1112.
- Kupchan, S.M, Briton, R.W., Ziegler, M.F. and Siegel, C.W. 1973 Bruceatin, a new potent antileukemic simaroubolide from *B. antidyserterica*. **J. Org. Chem.**, v. 38, pp. 178-179.
- Kubeczka, K.H. 1968 Comparative studies on the biogenesis of volatile secondary products. II Molds. **Archiv. Mikrobiol.**, v. 60. pp. 139-159.
- Lafont, P. and Debeaupuis, J.P. 1980 Photodensitometric determination of PR-toxin, metabolite of *Penicillium roqueforti*. **J. Chromatogr.**, v. 198, n. 4, pp. 481-488.
- Lambert, M.A., Moss, C.W., Silcox, V.A. and Good, R.C. 1986 Analysis of mycolic acid cleavage products and cellular fatty acids of *Mycobacterium* species by capillary gas chromatography. **J. Clin. Microbiol.**, v. 23, n. 4, pp. 731-736.
- Larroche, C., Arpah, M. and Gros, J.B. 1989 Methyl-ketone production by Calcium-alginate/Eudrasit RL entrapped spores of *Penicillium roqueforti*. **Enz. Microb. Technol.**, v. 11, n. 2, pp. 106-112.
- Larroche, C. and Gros, J.B. 1989 Batch and continuous 2-heptanone production Ca<sup>+</sup> alginate/Eudrasit RL entrapped spores of *Penicillium roqueforti* application to aroma production. **Biotechnol. Bioeng.**, n. 34, pp. 3038.
- Lawrence, R.C. 1965 Use of 2,4-dinitrophenylhydrazine for the estimation of micro amounts of carbonyls. **Nature**, v. 205, n. 4978, pp. 1313-1314.
- Lawrence, R.C. 1966 Oxidation of fatty acids by spores of *Penicillium roqueforti*. **J. Gen. Microbiol.**, v. 44, n. 3, pp. 393-405.

- Lawrence, R.C. 1967 Metabolism of triglycerides by spores of *Penicillium roqueforti*. **J. Gen. Microbiol.**, v. 46, n. 1, pp. 65-76.
- Lawrence, R.C. and Hawke, J.C. 1968 The oxidation of fatty acids by mycelium of *Penicillium roqueforti*. **J. Gen. Microbiol.**, v. 51, n. 2, pp. 289-302.
- Lee, B.H., Clothier, M.F., Dutton, F.E., Nelson, S.J., Johnson, S.S., Thompson, D.P., Geary, T.G., Whaley, H.D., Haber, C.L., Marshall, V.P., Gabe, I., McNally, P.L., Ciadella, J.I., Martin, D. G., Bowman, J.W., Baker, C.A., Coscarelli, E.M., Alexander-Bowman, S.J., Davis, J.P., Zinser, E.W., Wiley, V., Lipton, M.F. and Mauragis, M.A. 2002 Marcfortine and paraherquamide class of anthelmintics. **Curr. Top. Med. Chem.**, v. 2, n. 7, pp. 779-793.
- Leo, R.G. and Parker, P.L. 1966 Branched chain fatty acids in sediments. **Science**, v. 152, pp. 649-650.
- Lloyd, A.G., Wusteman, F.S., Tudball, N. and Dodgson, K.S. 1964 Preparation of Potassium 2-Deoxy-2-[<sup>35</sup>S]sulphoamino-D-glucose. **Biochem. J.**, v. 92, pp. 68-72.
- Lomascolo, A., Dubreucq, E., Perrier, V., Galzy, P. and Grimaud, J. 1994 Mycelial lipid composition of three *Penicillium* strains. **J. Dairy Sci.**, v. 77, n. 8, pp. 2160-2167.
- Maier, I. and Müller, D.G. 1986 Sexual pheromones in algae. **Biol. Bull.**, v. 170, pp. 145-175.
- Maheva, E., Djelveh, G., Larroche, C. and Gros, J.B. 1984 Sporulation of *Penicillium roqueforti* in solid substrate fermentation. **Biotechnol. Lett.**, v. 6, n. 2, pp. 97-102.
- Mediavilla, M.J. 1984 Metabolitos de hongos superiores. **Tesis Doctoral**, Universidad de La Laguna, pp. 58-61.
- Moon, B., Kaker, B.J., and McKlinton, B. 1998 Purine and nucleoside metabolites from the antarctic sponge *Isodictya erinacea*. **J. Nat. Prod.**, v. 61, n. 1, pp. 116-118.
- Moreau, S. 1981 *Penicillium roqueforti* toxin. In: **Progress in Mutation Research**, v. 2, Kappas A. (Ed.), Elsevier/ North-Holland Biomedical Press.

- Moreau, S., Biguet, J., Lablache-Combier, A., Baert, F., Foulon, M. et Delfosse, C. 1980a Structures et stereochemie des sesquiterpenes de *Penicillium roqueforti* PR toxin et eremofortines A, B, C, D, E. **Tetrahedron**, v. 36, n. 20-21, pp. 2989-2997.
- Moreau, S., Gaudemer, A., Lablache-Combier, A. et Biguet, J. 1976 Metabolites de *Penicillium roqueforti*: PR toxine et metabolites associes. **Tetrahedron Lett.**, n. 11, pp. 833-834.
- Moreau, S., Lablache-Combier, A. and Biguet, J. 1980b Production of eremofortins A, B, and C relative to formation of PR toxin by *Penicillium roqueforti*. **Appl. Environ. Microb.**, v. 39, n. 4, pp. 770-776.
- Moreau, S., Lablache-Combier, A., Biguet, J., Foulon, C. and Delfosse, M. 1982 Botryodiplodin, a mycotoxin synthesized by a strain of *Penicillium roqueforti*. **J. Org. Chem.**, v. 47, n. 12, pp. 2358-2359.
- Moreau, S., Moule, Y. and Bousquet, J.F. 1977 Relationships between the chemical structure and the biological properties of some eremophilane compounds related to PR toxin. **Ann. Nutr. Aliment.**, v. 31, n. 4-5-6, pp. 881-884.
- Mrozik, H. 1989 Use of the natural product marcfortines as antiparasitic agents. **US Patent** n° 88-233785, 4 p.
- Mulloy, B., Forster, M.J., Jones, C., Drake, A.F., Johnson, E.A. and Davies, D.B. 1994 The effect of variation of substitution on the solution conformation of heparin: a spectroscopic and molecular modeling study. **Carbohydrate Research**, v. 255, pp. 1-26.
- Nechev, J., Christie, W.W., Robaina, R., de Diego, F.M., Ivanova, A., Popov, S. and Stefanov, K. 2002 Chemical composition of the sponge *Chondrosia reniformis* from the Canary Islands. **Hydrobiologia**, v. 489, pp. 91-98.
- Ohmomo, S., Oguma, K., Ohashi, T. and Abe, M. 1978 Isolation of a new indole alkaloid, roquefortine D, from the cultures of *Penicillium roqueforti*. **Agric. Biol. Chem.**, v. 42, n. 12, pp. 2387-2389.

- Ohmomo, S., Sato, T., Utagawa, T. and Abe, M. 1975 Production of alkaloids and related substances by fungi. Isolation of festuclavine and three new indole alkaloids, roquefortine A, B, and C from the cultures of *Penicillium roqueforti*. **Nippon Nogei Kagaku Kaishi**, v. 49, n. 11, pp. 615-623.
- Ojala, W.H., Albers, K.E., Gleason, W.B. and Choo, C.G. 1995 Carbohydrates with relevance to the structure of glycosaminoglycans: the crystal structures of 2-deoxy-2-(sulfoamino)- $\alpha$ -D-glucopyranose sodium salt dehydrate, 2-amino-2-deoxy- $\alpha\beta$ -D-glucopyranose 3-(hydrogen sulphate) monohydrate, and 2-amino-2-deoxy- $\alpha$ -D-glucopyranose 6-(hydrogen sulphate) monohydrate. **Carbohydrate Research**, v. 275, n. 1, pp. 49-65.
- Olivigni, F.J. and Bullerman, L.B. 1978 Production of penicillic acid and patulin by an atypical *Penicillium roqueforti* isolate. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 35, n. 2, pp. 435-438.
- Orihashi, M., Kato, T. and Kakai, H. 2000 Diketopiperazine derivatives as inflammation inhibitors. **Japan Patente** n° JP 2000327575.
- Peberdy, J.F. 1985 Biology of *Penicillium*. In: **Biology of Industrial Microorganisms**. Demain, A.L. and Solomon, N.A. (Eds.), The Benjamin/ Cumm. Pub. Co., Inc., London, pp. 407-431.
- Perry, G.J., Volkman, J.K. and Johns, R.B. 1979 Fatty acids of bacterial origin in contemporary marine sediments. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 43, pp. 1715-1725.
- Pitt, J.I. 1979 **The Genus *Penicillium***. London, Academic Press, 346 p.
- Polonsky, J., Merrien, M.A. and Scott, P.M. 1977 Roquefortine and isofumigaclavine A, alkaloids from *Penicillium roqueforti*. **Ann. Nutr. Aliment.**, v. 31, n. 4-5-6, pp. 693-698.
- Polonsky, J., Merrien, M.A., Prangé, T., Pascard, C. and Moreau, S. 1980 Isolation and structure (x-ray analysis) of marcfortine A, a new alkaloid from *Penicillium roqueforti*. **J. Chem. Soc. Chem. Commun.**, v. 13, pp. 601-602.
- Prangé, T., Billion, M.A., Vuilhorgne, M., Pascard, C., Polonsky, J. and Moreau, S. 1981 Structures of marcfortine B and C (X-ray analysis), alkaloids from *Penicillium roqueforti*. **Tetrahedron Lett.**, v. 22, n. 21, pp. 1977-1980.

- Ragab, M., Hassanien, F. R. and El-Makhzangy, A. 1986 Studies on the possibility of producing fats from food wastes by using microorganisms. Physical and chemical properties of fat produced from different fungi. **Fette, Seifen, Anstrich.**, v. 88, n. 2, pp. 72-75.
- Ruddock, J. 1992 Manufacture of antiparasitic agents with cultures of *Penicillium roqueforti*. **GB Patente** n° 90-17922, 20 p.
- Salvadori, P. and Salvadori, B.B. 1967 Attack on some higher fatty acids by different strains of *Penicillium roqueforti*. **Lait**, v. 47, n. 469-470, pp. 605-611.
- Scott, P.M. 1984 PR Toxin. *In: Mycotoxins-production, isolation, separation and purification.* Betina, V. (Ed.), Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, The Netherlands.
- Scott, P.M., Kennedy, B.P.C., Harwig, J. and Blanchfield, B.J. 1977 Study of conditions for production of roquefortine and other metabolites of *Penicillium roqueforti*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 33, n. 2, pp. 249-253.
- Scott, P.M., Merrien, M.A. and Polonsky, J. 1976 Roquefortine and isofumigaclavine A, metabolites from *Penicillium roqueforti*. **Experientia**, v. 32, n. 2, pp. 140-142.
- Seyama, Y., Oaci, K., Imamura, T., Kasama, T. and Otsuka, H. 1983 Branched chain fatty acids in phospholipids of Guinea pig harderian gland. **J. Biochem.**, v. 94, pp. 1231-1239.
- Sharpell, F.H., Jr. 1985 Microbial flavors and fragrances. *In: Comprehensive Biotechnology.* Pergamon Press, New York, pp. 965-981.
- Shimp, J.L. and Kinsella, J.E. 1977a Composition of the mycelium of *Penicillium roqueforti*. **J. Food Sci.**, v. 42, n. 3, pp. 681-684.
- Shimp, J.L. and Kinsella, J.E. 1977b Lipids of *Penicillium roqueforti*. Influence of culture temperature and age on unsaturated fatty acids. **J. Agric. Food Chem.**, v. 25, n. 4, pp. 793-799.

- Stierle, A., Cardellina, J.H. and Strobel, G.A. 1988 Maculosin, a host-specific phytotoxin for spotted knapweed from *Alternaria alternata*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 85, pp. 8008-8013.
- Stopsack, H., Auweiler, J., Zepter, R. and Schmidt, M. 1991 Isolation and purification of 3-isobutylhexahydropyrrolo[1,2-a]pyrazyn-1,4-dione from fermentation media. **Ger. East Patente** n° DD287272.
- Szolysek, K. 1982 Toxic metabolites of *Penicillium roqueforti*. **Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny**, v. 33, n. 1-2, pp. 39-43.
- Thiel, V., Jenisch, A., Wörheide, G., Löwenberg, A., Reitner, J. and Michaelis, W. 1999 Mid-chain branched alkanolic acids from “living fossil” demosponges: a link to ancient sedimentary lipids? **Organic Geochemistry**, v. 30, pp. 1-14.
- Tsuhako, M., Fujita, N., Nakahama, A., Matsuo, T. 1980 The reaction of *cyclo*-Triphosphate with L-Valine. **Bull. Chem. Soc. Jpn.**, v. 53, pp. 1968-1972.
- Van der Veen, J.M. 1963 An N.M.R. study of the glycoside link in glycosides of glucose and galactose. **J. Org. Chem.**, v. 28, pp. 564-566.
- Yasumoto, M., Mada, K., Ooi, T. and Kusumi, T. 2000 New terpenoid components from the volatile oils of the soft corals *Clavularia viridis* and *Sarcophyton acutangulum*. **J. Nat. Prod.** v. 63, pp. 1534-1536.
- Yates, E.A., Mackie, W. and Lamba, D. 1995 The crystal and molecular structure of 2-sulfamino-2-deoxy- $\alpha$ -D-glucopyranose sodium salt.2H<sub>2</sub>O (glucosamine 2-sulfate). **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 17, n. 3-4, pp. 219-226.
- Yoza, N., Ishibashi, K. and Ohashi, S. 1977 Gel and ion-exchange chromatographic purification of reaction products between pyrophosphate and pyrophosphonate. **J. Chromatogr.**, v. 134, n. 2 pp. 497-506.

- Walker, T.E., London, R.E., Barker, R. and Matwiyoff, N.A. 1978 Dihedral-angle dependence of geminal, scalar coupling-constants in [1-<sup>13</sup>C]-aminosugars. **Carbohydrate Research**, v. 60, pp. 9-18.
- Wei, R.D., Schnoes, H. K., Hart, P. A. and Strong, F. M. 1975 Structure of PR toxin, a mycotoxin from *Penicillium roqueforti*. **Tetrahedron**, v. 31, n. 2, pp. 109-114.
- Wei, R.D., Schnoes, H.K., Smalley, E.B., Lee, S.S., Chang, Y.N. and Strong, F.M. 1976 Production, isolation, chemistry, and biological properties of *Penicillium roqueforti* toxin. **Proceedings of the 4<sup>th</sup> International Symp. Anim., Plant Microb. Toxins**, Meeting Date 1974, v. 2, pp. 137-144.
- Wei, R.D., Still, P.E., Smalley, E.B., Schnoes, H.K. and Strong, F.M. 1973 Isolation and partial characterization of a mycotoxin from *Penicillium roqueforti*. **Appl. Microbiol.**, v. 25, n. 1, pp. 111-114.
- Wei, Y.H., Chang, S.C., Li, S.Y. and Lu, C.Y. 1989 Secondary metabolites and enzymes involved in the biosynthesis and degradation of PR toxin. **Acad. Sin. Inst. Bot. Monogr. Ser.**, v. 9, pp. 371-390.
- Woloszyn, J., Szoltysek, K. and Ziobrowski, J. 1988 Use of an enzymic preparation of *Penicillium roqueforti* mycelium for descaling of fish-roach. **Pol. Przemysl Spozywczy**, v. 42, n. 10, pp. 297-298.

# *ANEXOS*



## Anexos

## Anexo 1

CABI BIOSCIENCE  
IDENTIFICATION SERVICES

**Report:** H275/01/YS4  
**Your ref:** Jaspars/Roberto/PMA

---

<b>Your number</b>	<b>IMI number</b>	<b>Identification and comments</b>
PM 001	386936	<b>Paecilomyces variotii</b> Bainier. Description found in Domsch <i>et al.</i> <i>A Compendium of Soil Fungi</i> . Academic Press, 534-536 pp. A common contaminant in air and often isolated from substrates originating from higher temperatures eg. compost. The species has also been isolated from sea water and wood exposed to sea water. This material has been discarded. Report from Dr Z. Lawrence.
PA 002	386937	<b>Penicillium roqueforti</b> Thom. A widely distributed agent of biodeterioration. Description found in Pitt, J.I. (1980), <i>The genus Penicillium and its teleomorphic states Eupenicillium and Talaromyces</i> . Academic Press, 345-356 pp. This species is capable of growing at low oxygen levels. It is found on cellophane wrapped foods, canned carbonated drinks, silage, as well as from cheese. Also isolated from soil. This material has been discarded. Report from Dr Z. Lawrence.

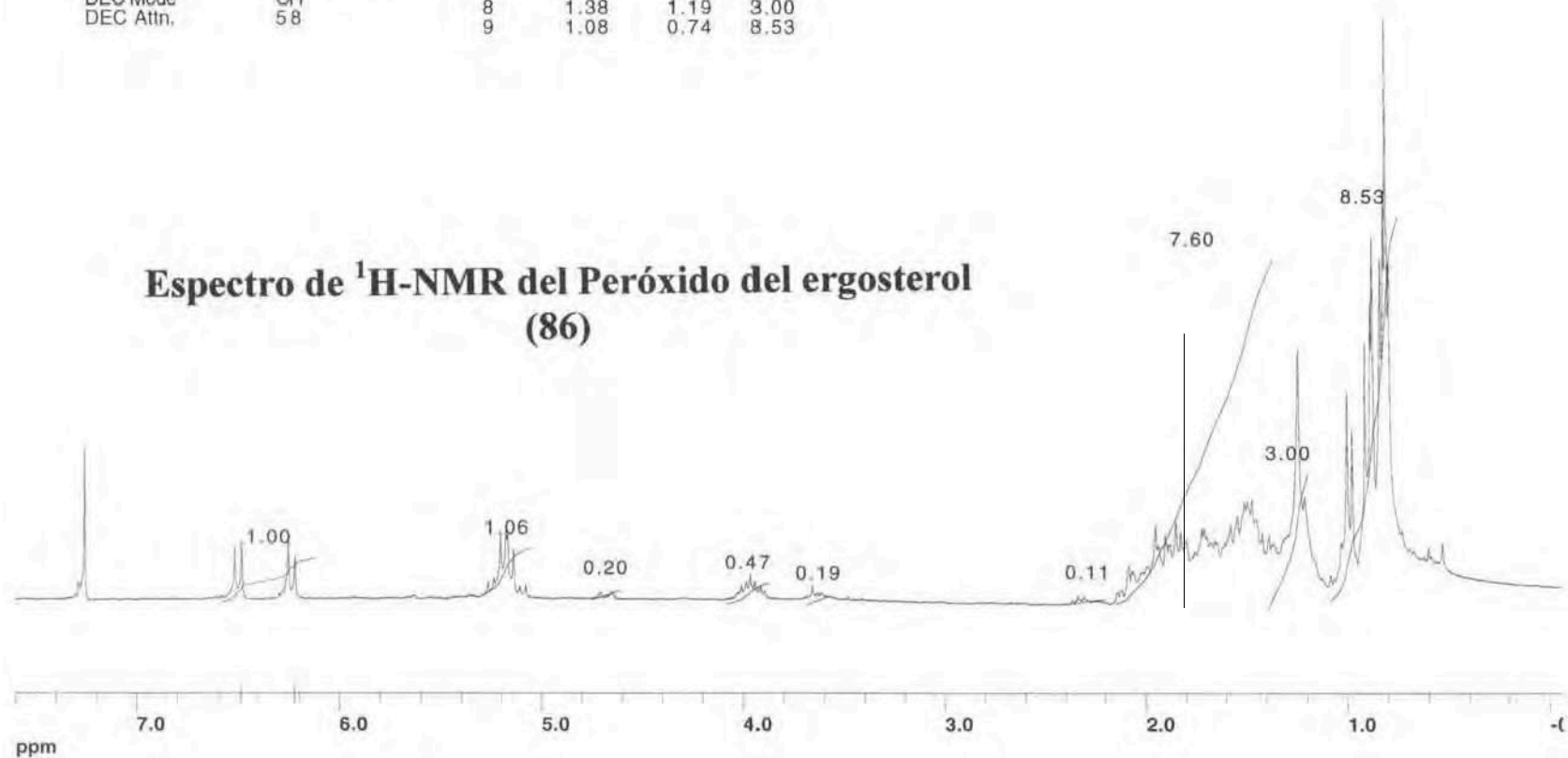
---

No. Points 16384  
No. Scans 16  
Dummy Scans 0  
Scan Count 16

H1 script run at: Tuesday, November 20, 2001 1:05:58 pm  
Macintosh HD:MacNMR 5.3-AC250\data:marcel.ROBERTO;PRM2005FHM1P5 CDCL3

			6.58	6.11	3.09
			5.20	5.09	1.06
			4.75	4.60	0.20
			4.08	3.87	0.47
			3.89	3.57	0.19
DE offset	0.000 kHz	6	2.38	2.19	0.11
RCVR gain	40	7	2.15	1.37	7.60
DEC Mode	OFF	8	1.38	1.19	3.00
DEC Attn.	58	9	1.08	0.74	8.53

### Espectro de $^1\text{H-NMR}$ del Peróxido del ergosterol (86)



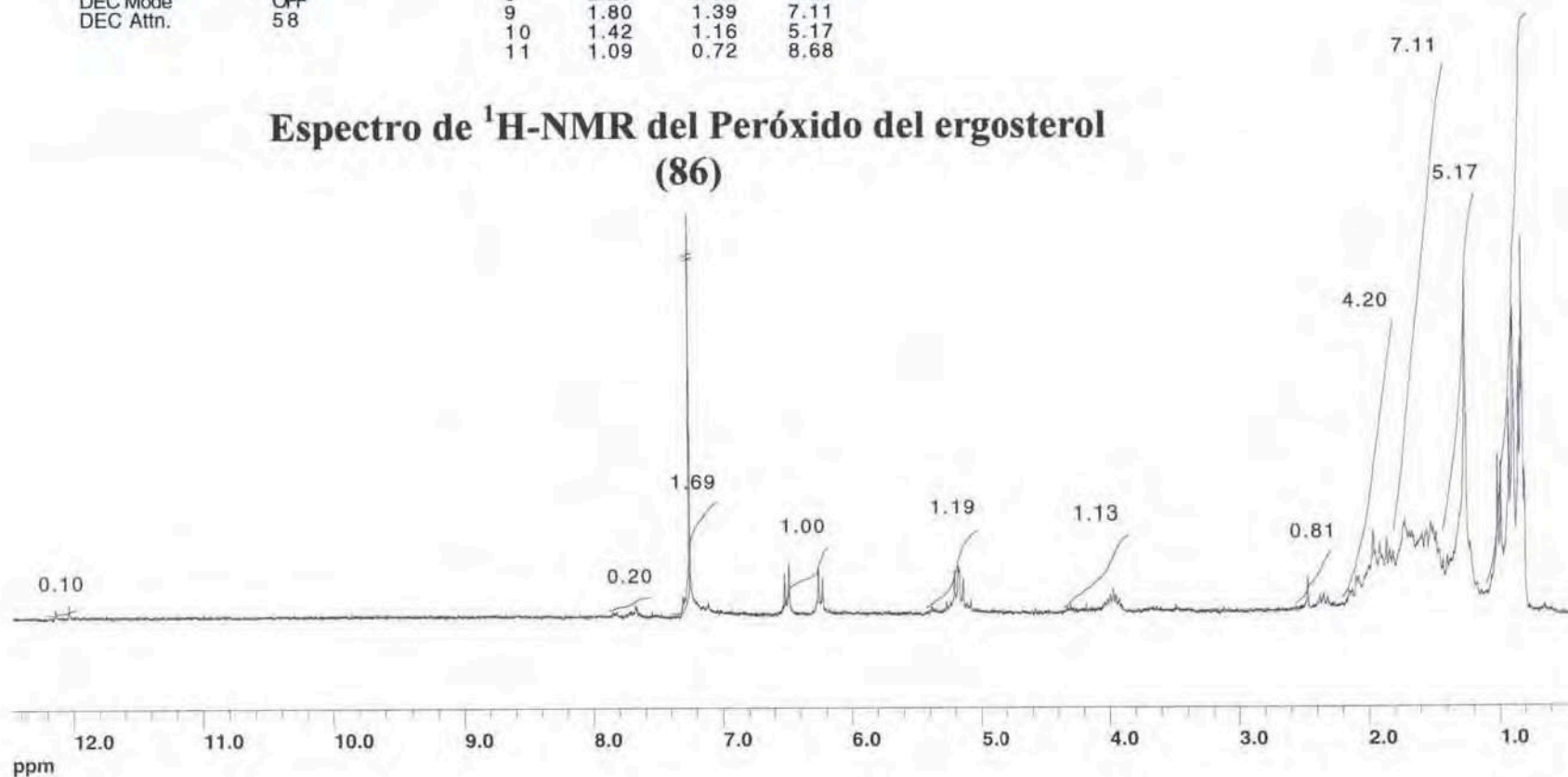
No. Points 16384  
 No. Scans 16  
 Dummy Scans 0  
 Scan Count 16  
 SW +/- 2500.0  
 Filter 2400  
 Acq. Time 3.277s  
 Dwell 200u  
 Obs Freq 250.1340000  
 Obs base 250.1300000  
 O1 offset 4.0000 KHz  
 dcplfreq 250.1340000  
 O2 offset 4.0000 KHz  
 RCVR gain 100  
 DEC Mode OFF  
 DEC Attn. 58

H1 script run at: Sunday, November 11, 2001 6:47:46 pm  
 Macintosh HD:MacNMR 5.3-AC250:data:marcel:ROBERTO:Prm3002FH-1H-CDCI3

#	Start ppm	Stop ppm	Integral
1	12.21	11.97	0.10
2	7.87	7.54	0.20
3	7.39	7.04	1.69
4	6.57	6.17	1.00
5	5.41	5.01	1.19
6	4.35	3.84	1.13
7	2.55	2.28	0.81
8	2.20	1.79	4.20
9	1.80	1.39	5.17
10	1.42	1.16	7.11
11	1.09	0.72	8.68

File created:  
 Sunday, November 11, 2001  
 6:48 pm

### Espectro de <sup>1</sup>H-NMR del Peróxido del ergosterol (86)



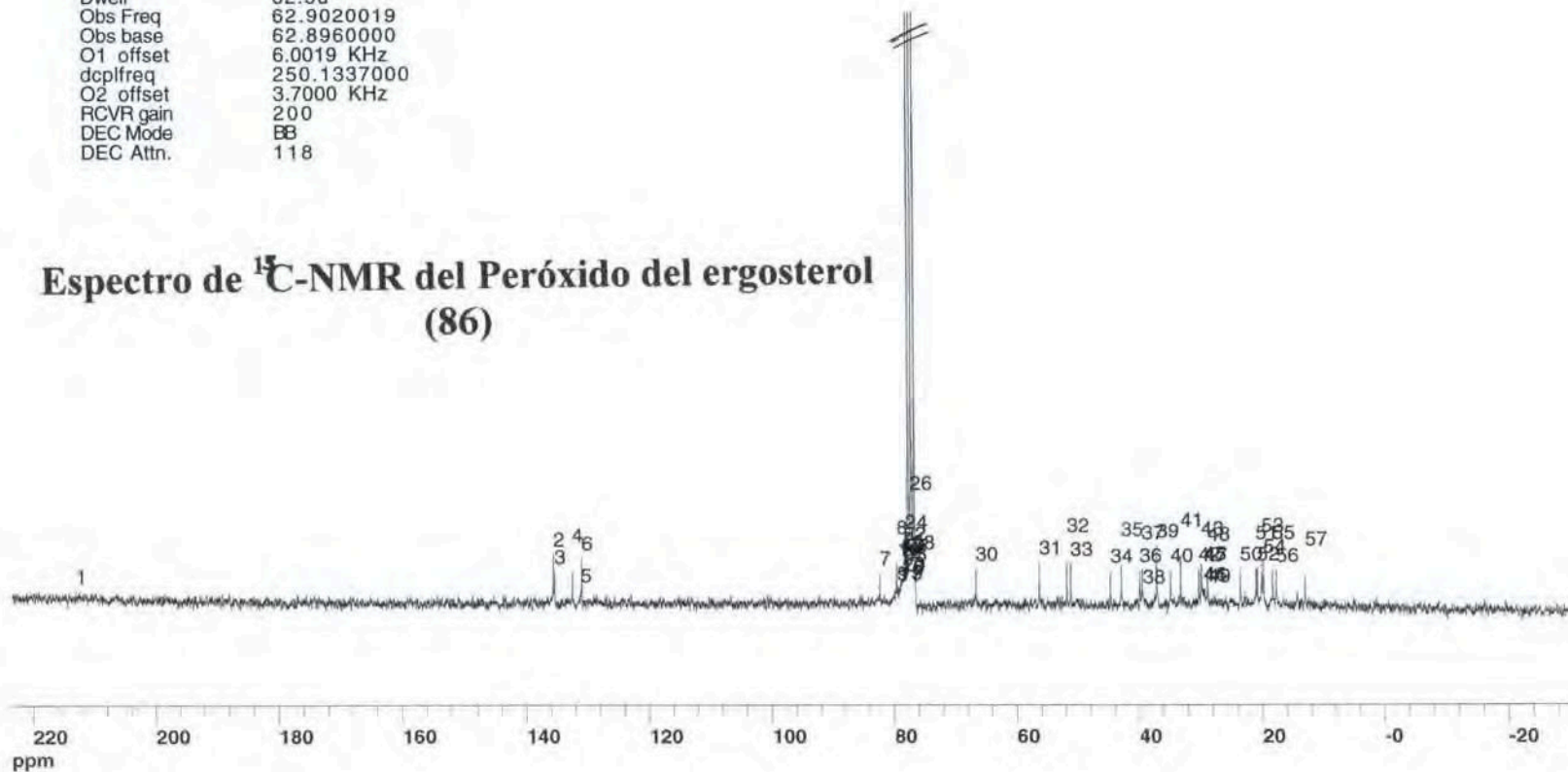
Anexo 3

C13 script run at: Sunday, November 11, 2001 7:40:58 pm  
 Macintosh HD:MacNMR 5.3-AC250:data:marcel:ROBERTO:Prm3001FH-13C-CDCI3

No. Points 16384  
 No. Scans -1  
 Dummy Scans 0  
 Scan Count 16132  
 SW +/- 8000.0  
 Filter 8000  
 Acq. Time 1.024s  
 Dwell 62.5u  
 Obs Freq 62.9020019  
 Obs base 62.8960000  
 O1 offset 6.0019 KHz  
 dcplfreq 250.1337000  
 O2 offset 3.7000 KHz  
 RCVR gain 200  
 DEC Mode BB  
 DEC Attn. 118

File created:  
 Sunday, November 11, 2001  
 7:40 pm

### Espectro de <sup>13</sup>C-NMR del Peróxido del ergosterol (86)



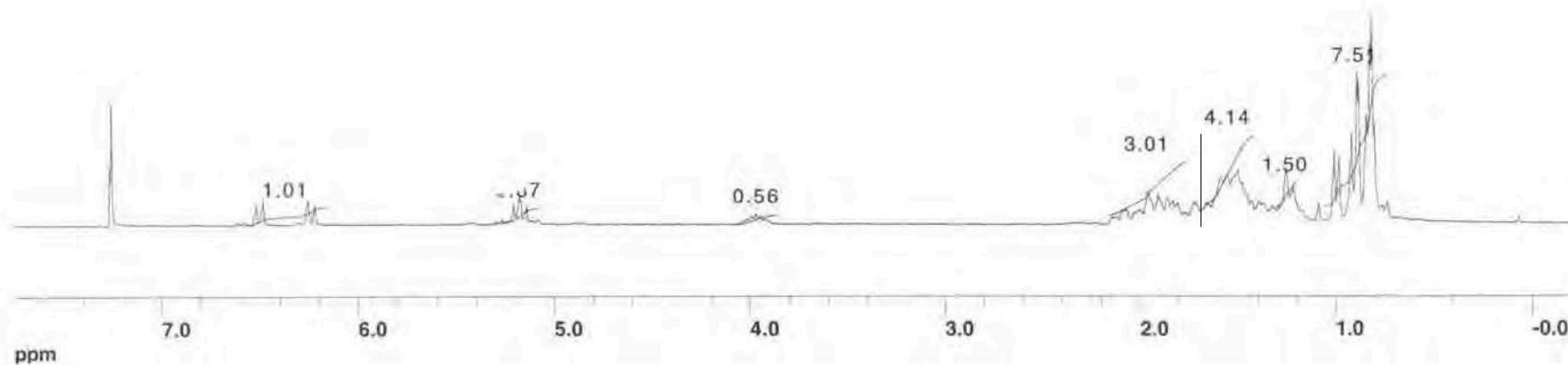
Anexo 4

H1 script run at: Tuesday, October 2, 2001 11:49:12 am  
 Macintosh HD:MacNMR 5.3-AC250:data:marcel:ROBERTO:Pm5003FHSc-1H-CDCI3

No. Points	16384	#	Start ppm	Stop ppm	Integral
No. Scans	16	1	6.57	6.15	1.01
Dummy Scans	0	2	5.28	5.07	0.87
Scan Count	16	3	4.07	3.86	0.56
SW +/-	2500.0	4	2.16	1.77	3.01
Filter	2400	5	1.67	1.41	4.14
Acq. Time	3.277s	6	1.30	1.19	1.50
Dwell	200u	7	1.05	0.73	7.51
Obs Freq	250.1340000				
Obs base	250.1300000				
O1 offset	4.0000 KHz				
dcplfreq	250.1340000				
O2 offset	4.0000 KHz				
RCVR gain	64				
DEC Mode	OFF				
DEC Attn.	58				

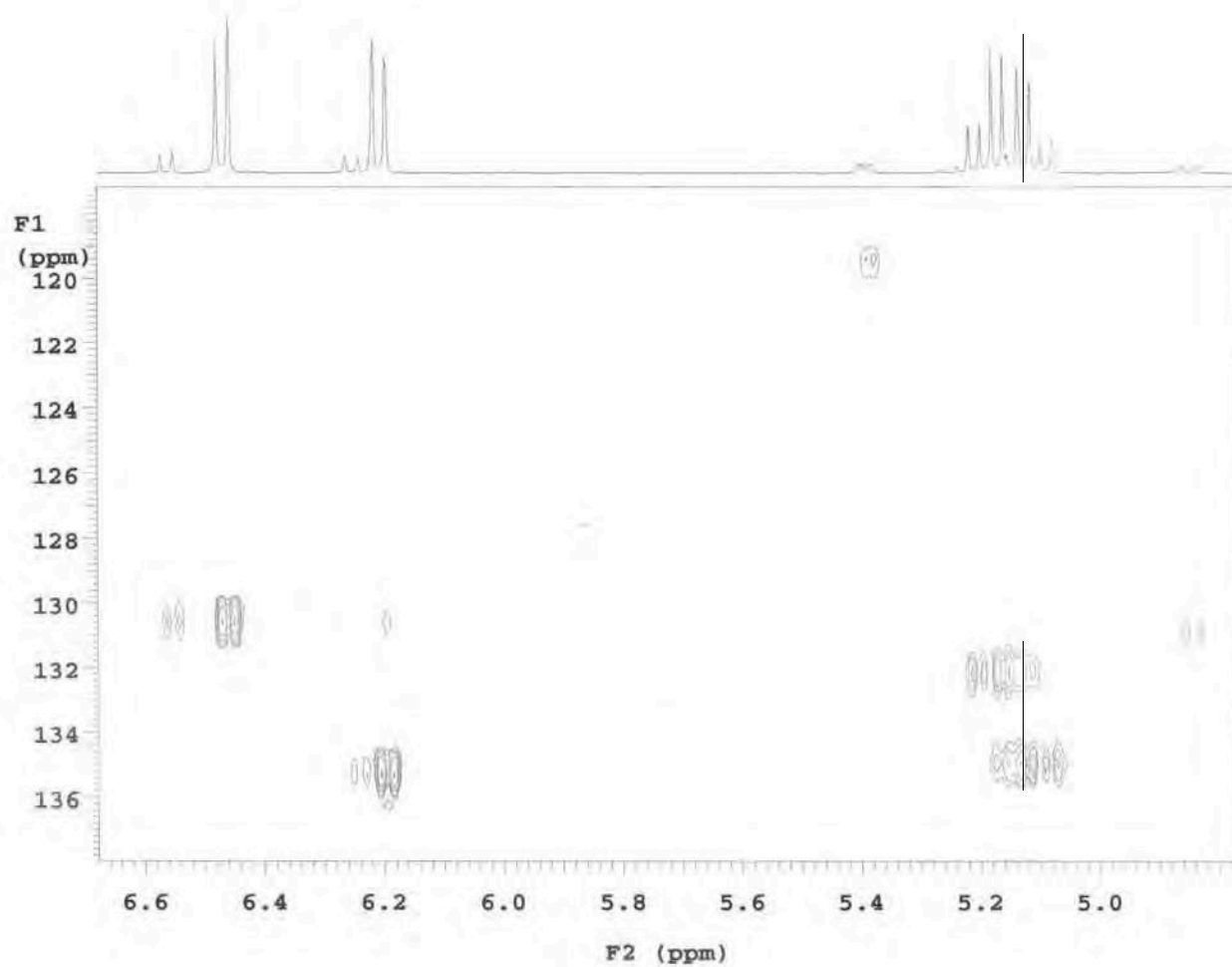
File created:  
 Tuesday, October 2, 2001  
 11:49 am

Espectro de <sup>1</sup>H-NMR del peróxido del ergosterol y su 9(11)-dehidroderivado



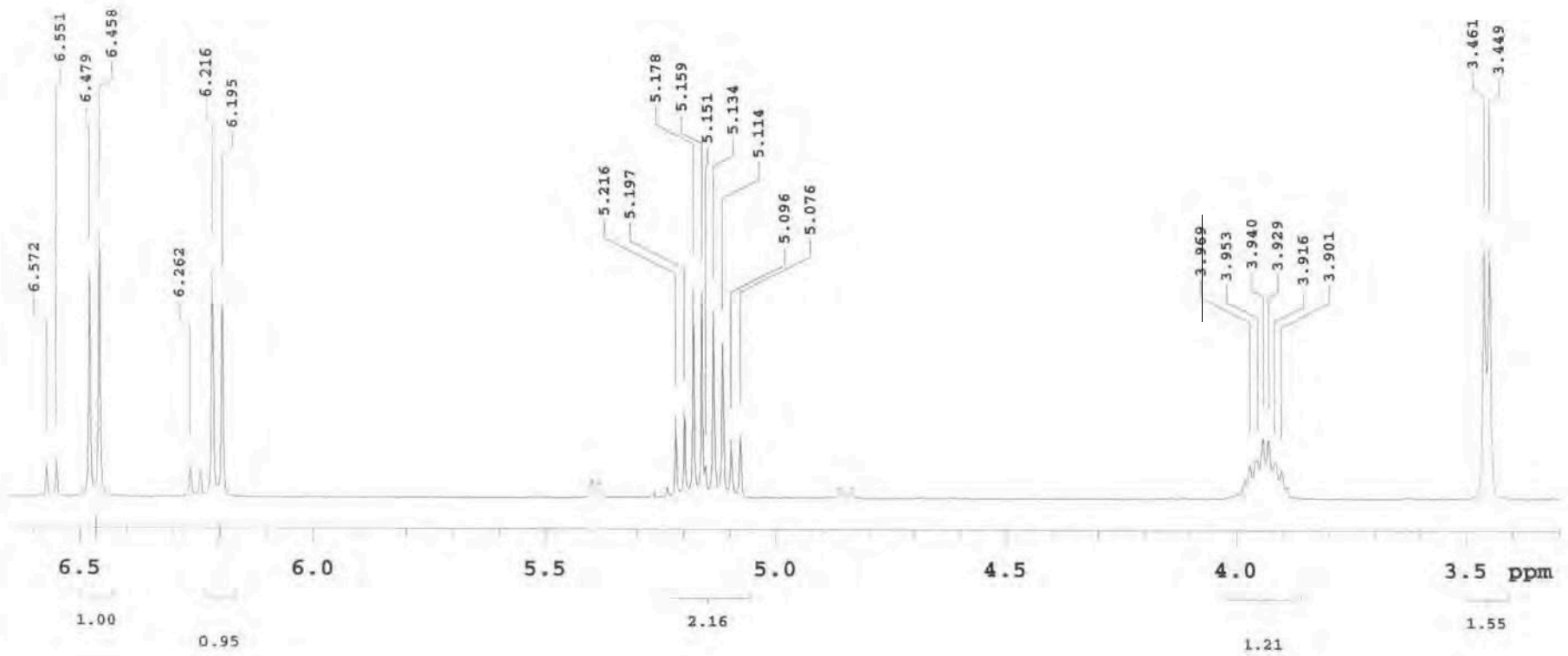
Anexo 5

### Espectro HSQC del peróxido del ergosterol y su 9(11)-dehidroderivado



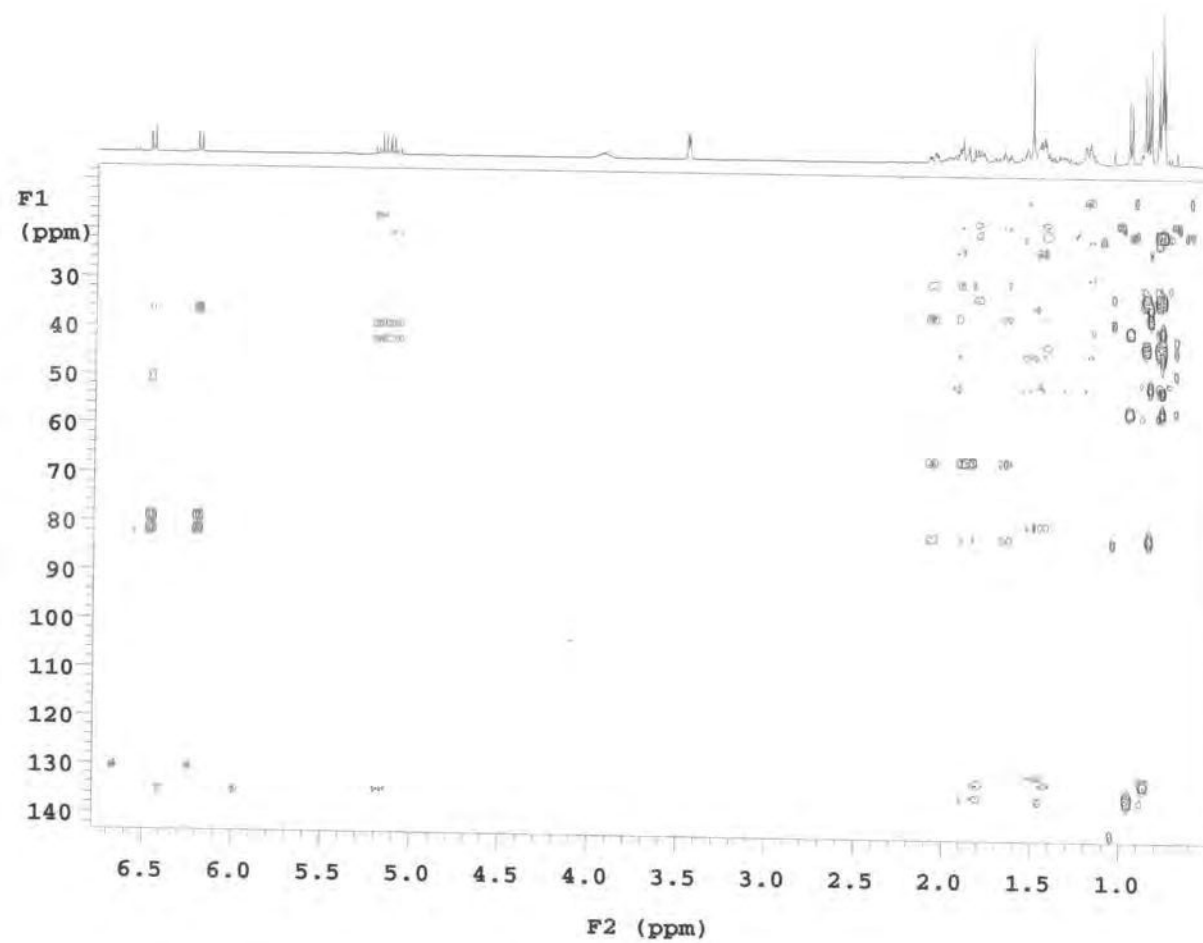
### Anexo 6

### Espectro de <sup>1</sup>H-NMR del peróxido del ergosterol y su 9(11)-dehidroderivado



### Anexo 7

Espectro HMBC del peróxido del ergosterol y su 9(11)-dehidroderivado





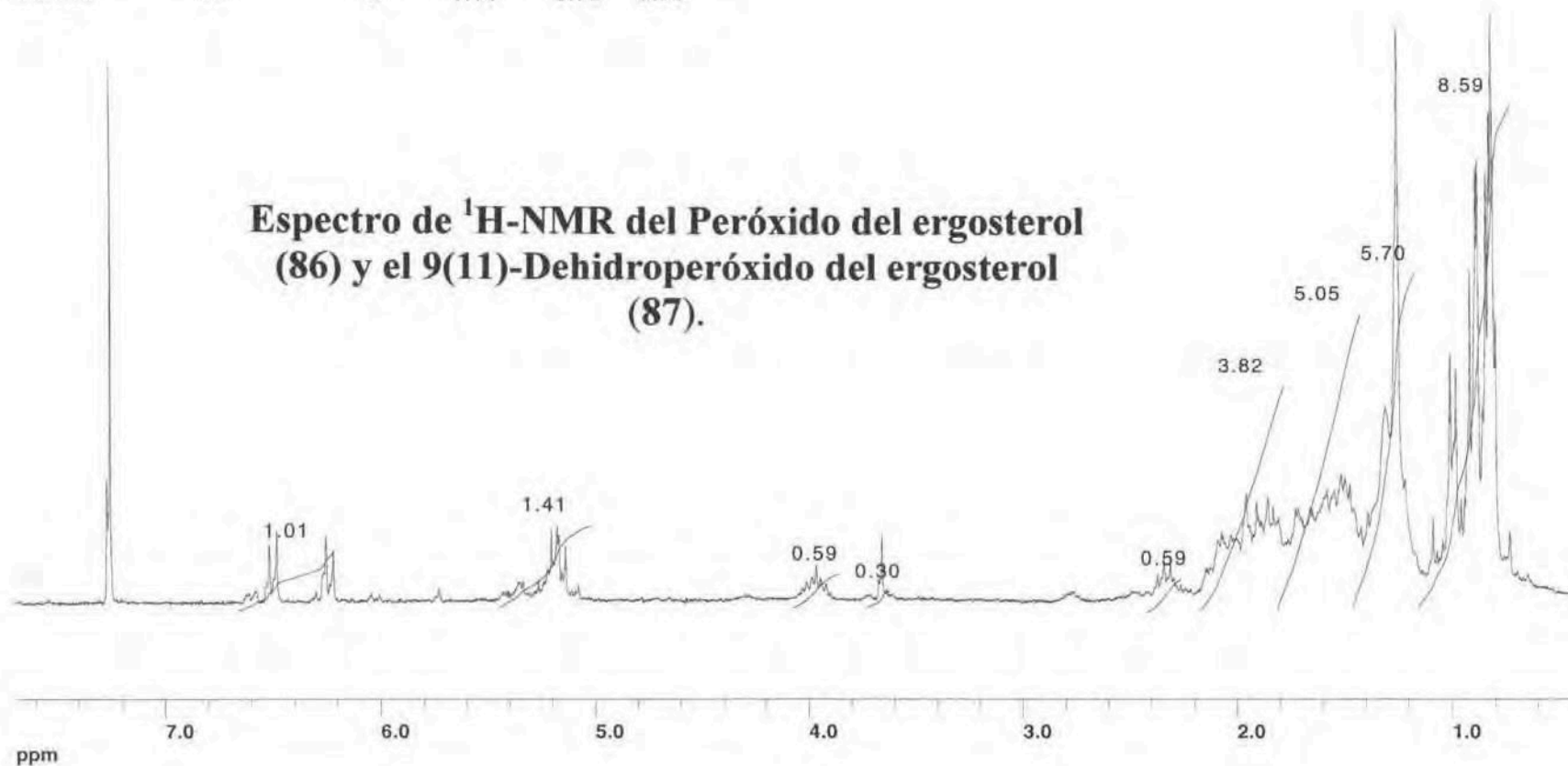


No. Points 16384  
 No Scans 16  
 Dummy Scans 0  
 Scan Count 16  
 SW +/- 2500.0  
 Filter 2400  
 Acq. Time 3.277s  
 Dwell 200u  
 Obs Freq 250.1340000  
 Obs base 250.1300000  
 Q1 offset 4.0000 KHz  
 Jcpifreq 250.1340000  
 Q2 offset 4.0000 KHz  
 RCVR gain 40  
 DEC Mode OFF  
 DEC Attn. 58

H1 script run at: Monday, November 19, 2001 6:01:49 pm  
 Macintosh HD:MacNMR 5.3-AC250:data:marcel:ROBERTO:Pm2004FH-1H-CDC13

#	Start ppm	Stop ppm	Integral
1	6.65	6.21	1.01
2	5.45	5.02	1.41
3	4.07	3.86	0.59
4	3.73	3.62	0.30
5	2.42	2.26	0.59
6	2.17	1.77	3.82
7	1.81	1.42	5.05
8	1.45	1.16	5.70
9	1.16	0.72	8.59

File created:  
 Monday, November 19, 2001  
 6:02 pm

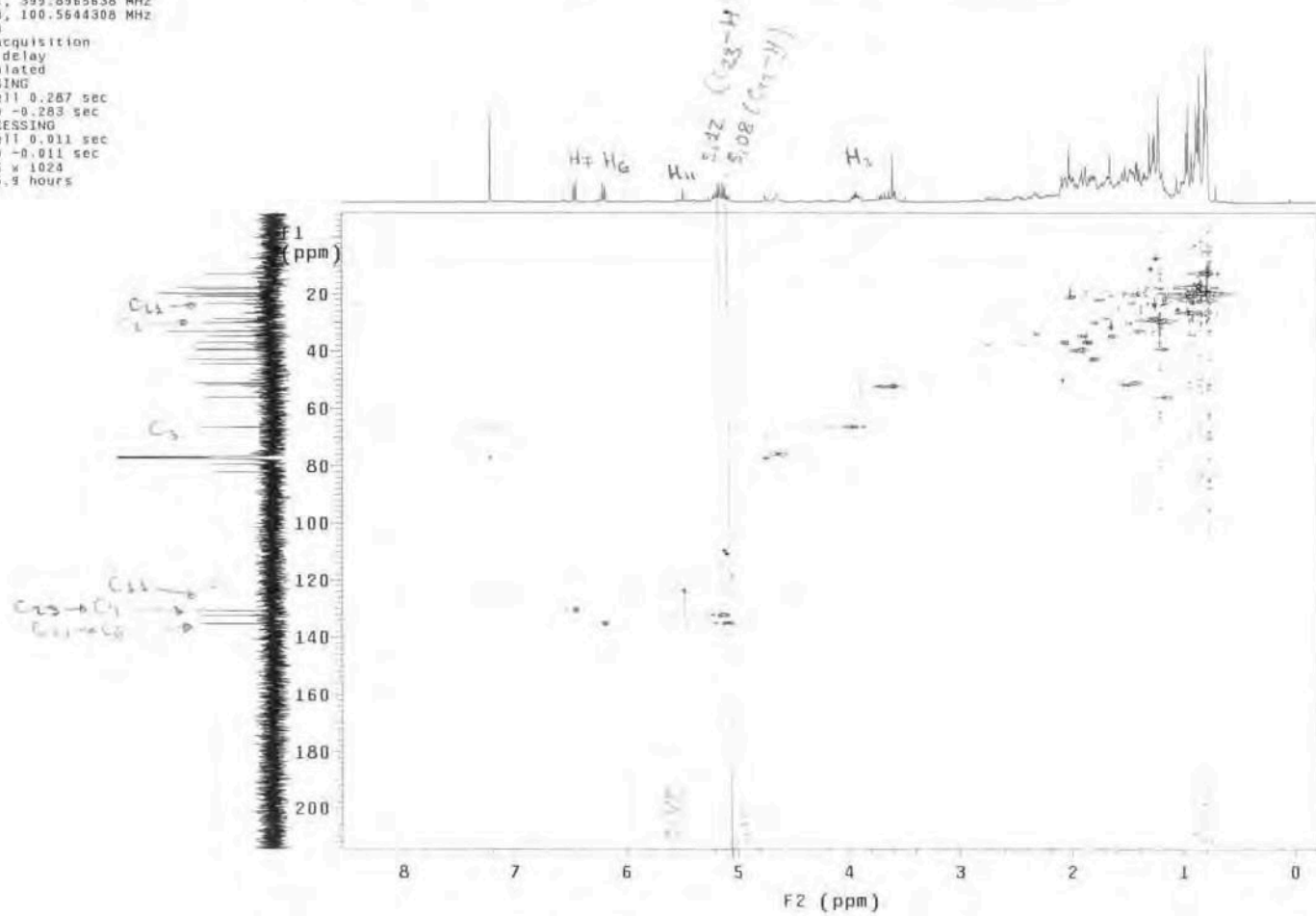


**Espectro de <sup>1</sup>H-NMR del Peróxido del ergosterol (86) y el 9(11)-Dehidroperóxido del ergosterol (87).**

roberto\_mioso\_Prm2007FD\_hsqc  
 Solvent: CDCl3  
 Temp: 26.0 C / 299.1 K  
 INOVA-400 "californium"  
 PULSE SEQUENCE: ghsqc\_da  
 Relax. delay 1.000 sec  
 Acq. time 0.283 sec  
 Width 3509.7 Hz  
 2D Width 22446.7 Hz  
 32 repetitions  
 2 x 256 increments  
 OBSERVE H1, 399.8965638 MHz  
 DECOUPLE C13, 100.5644306 MHz  
 Power 45 dB  
 on during acquisition  
 off during delay  
 GARP-1 modulated  
 DATA PROCESSING  
 Sq. sine bell 0.287 sec  
 Shifted by -0.283 sec  
 F1 DATA PROCESSING  
 Sq. sine bell 0.011 sec  
 Shifted by -0.011 sec  
 FT size 4096 x 1024  
 Total time 5.9 hours

Filename: p31pw\_

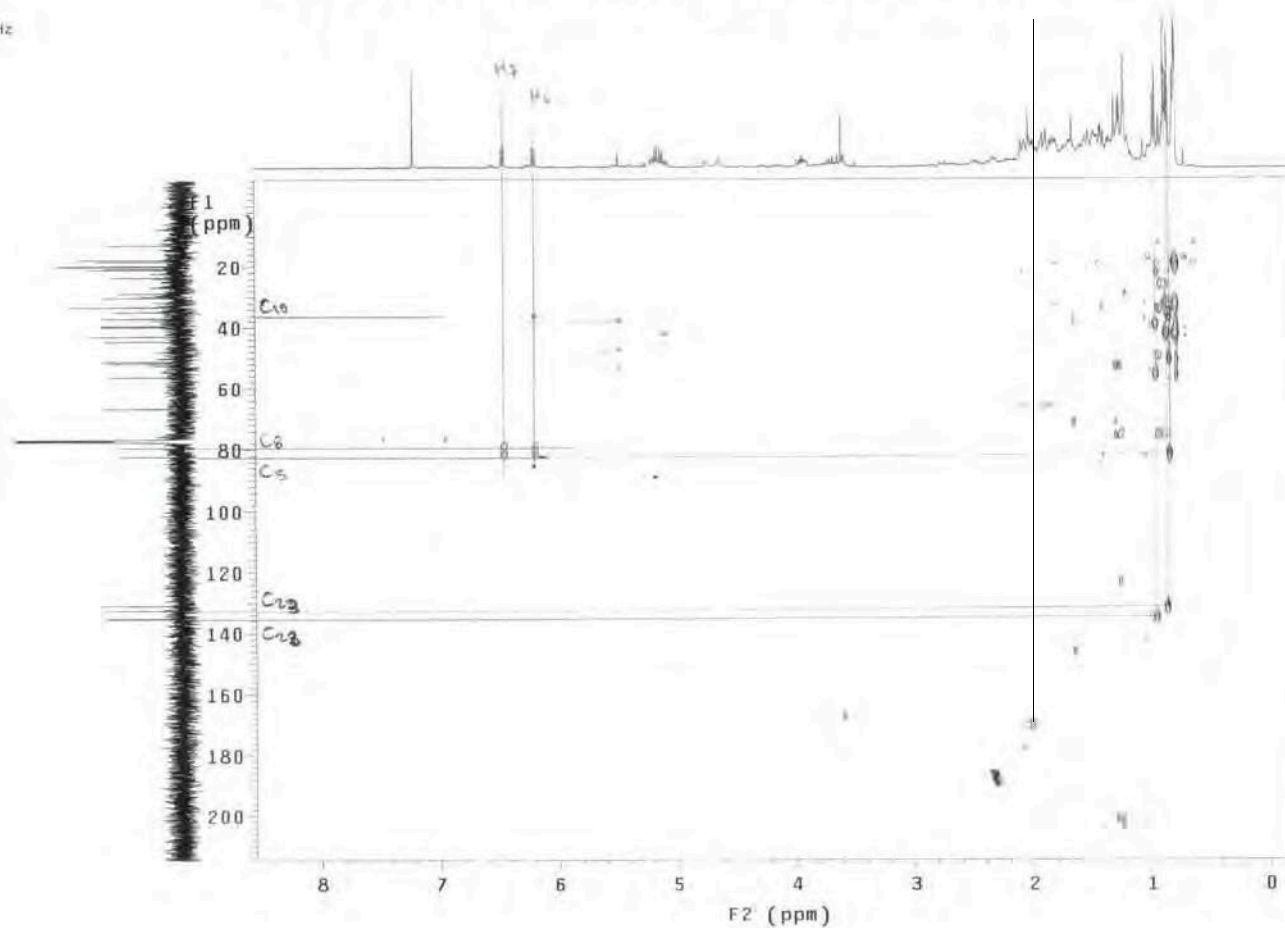
### Espectro HSQC del Peróxido del ergosterol (86) y el 9(11)-Dehidroperóxido del ergosterol (87).



Anexo 11

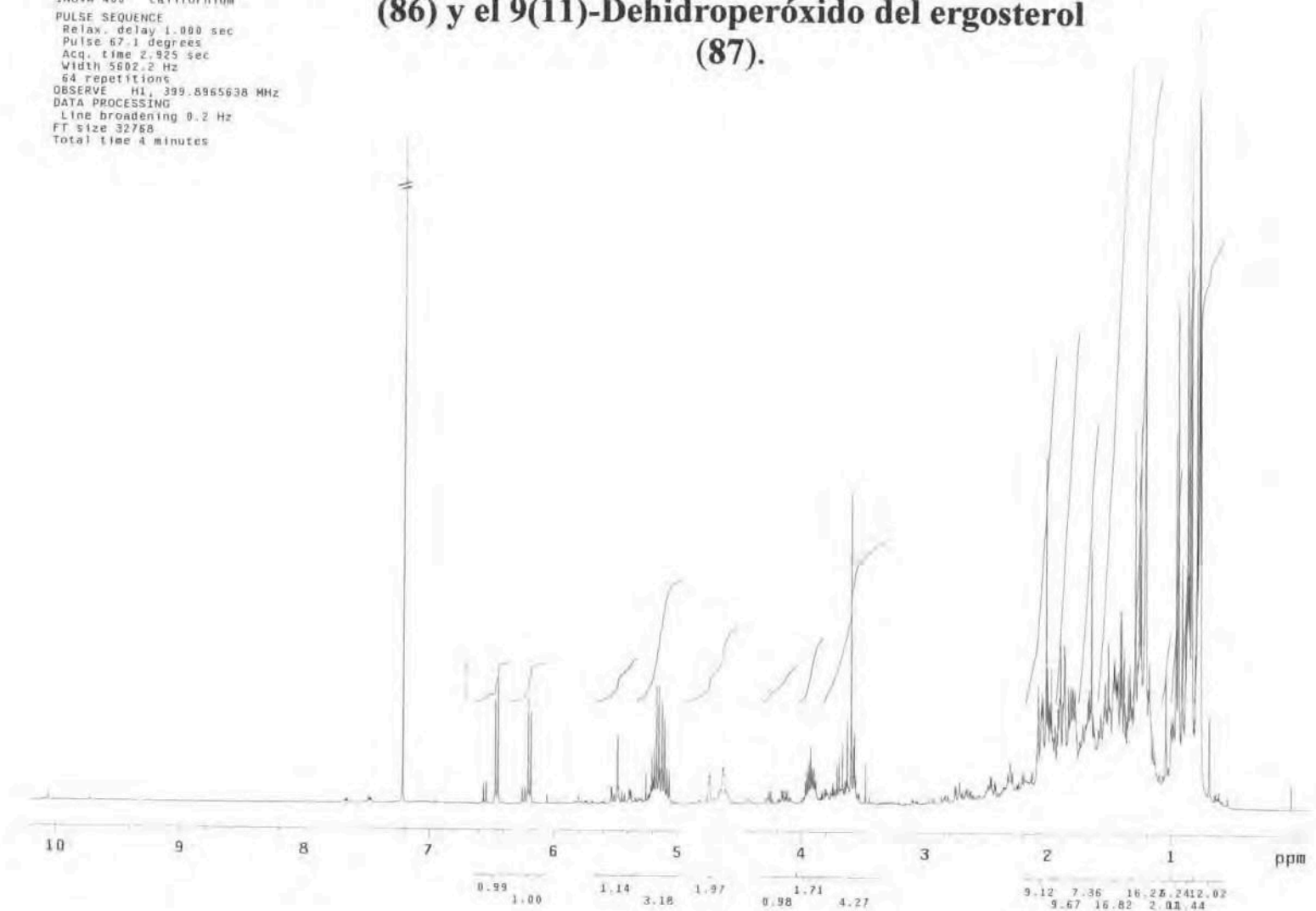
roberto\_mioso\_Prm2007FD\_hmbc  
Solvent: CDCl3  
Temp: 26.0 C / 299.1 K  
INOVA-400 "californium"  
PULSE SEQUENCE: ghmqc\_da  
Relax. delay 1.000 sec  
Acq. time 0.283 sec  
Width 3509.7 Hz  
2D Width 22446.7 Hz  
32 repetitions  
256 increments  
OBSERVE H1, 399.8965638 MHz  
DATA PROCESSING  
Line broadening 4.0 Hz  
Sine bell 0.141 sec  
F1 DATA PROCESSING  
Line broadening 153.3 Hz  
Sine bell 0.006 sec  
FT size 4096 x 512  
Total time 2.9 hours

## Espectro HMBC del Peróxido del ergosterol (86) y el 9(11)-Dehidroperóxido del ergosterol (87).

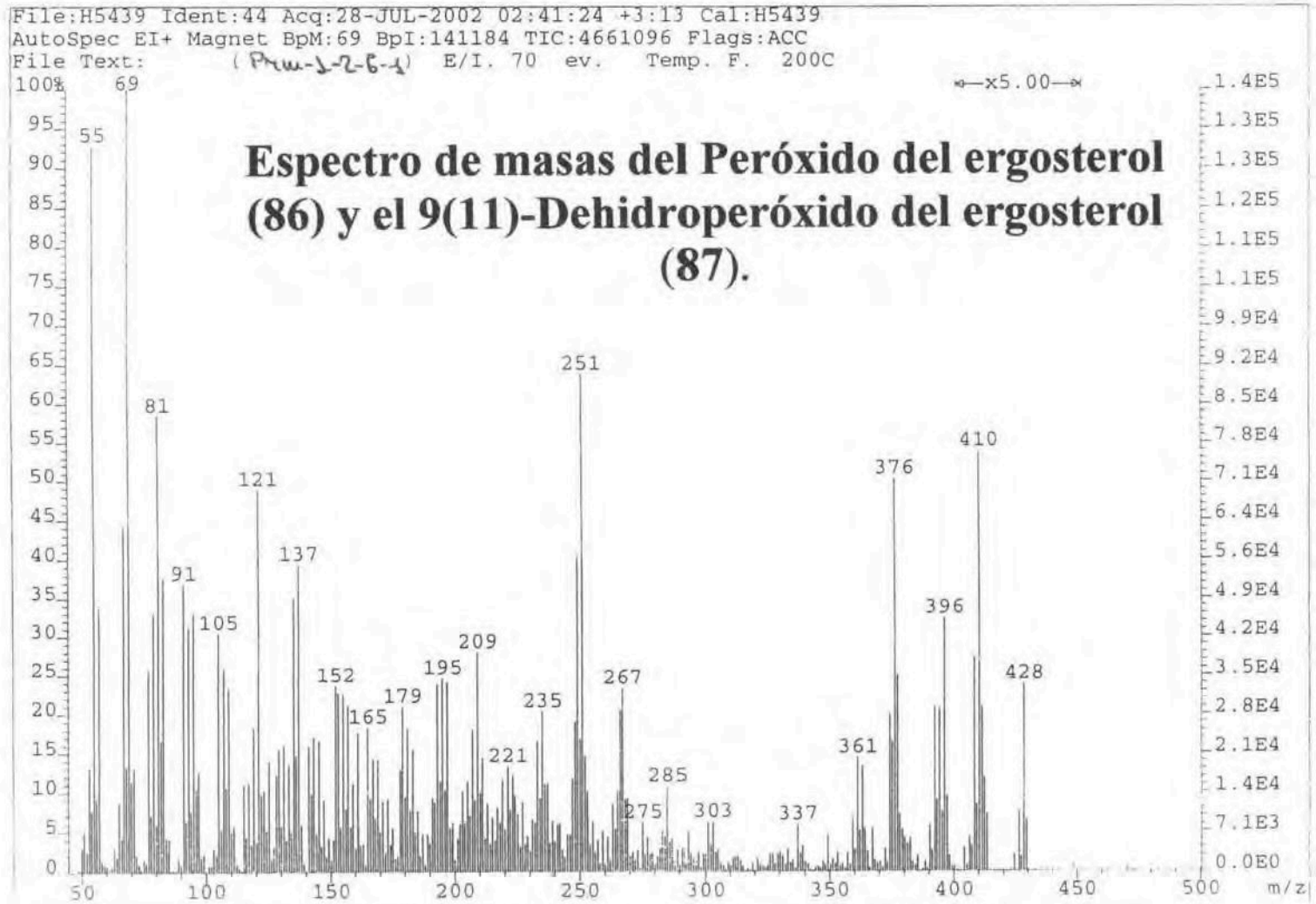


roberto\_mioso\_Prms007FQ\_1H  
Solvent: CDCl3  
Temp: 26.9 C / 299.1 K  
INOVA-400 "californium"  
PULSE SEQUENCE  
Relax. delay 1.000 sec  
Pulse: 67.1 degrees  
Acq. time 2.925 sec  
Width 5602.2 Hz  
64 repetitions  
OBSERVE H1, 399.5965638 MHz  
DATA PROCESSING  
Line broadening 0.2 Hz  
FT size 32768  
Total time 4 minutes

## Espectro de <sup>1</sup>H-NMR del Peróxido del ergosterol (86) y el 9(11)-Dehidroperóxido del ergosterol (87).



Anexo 13



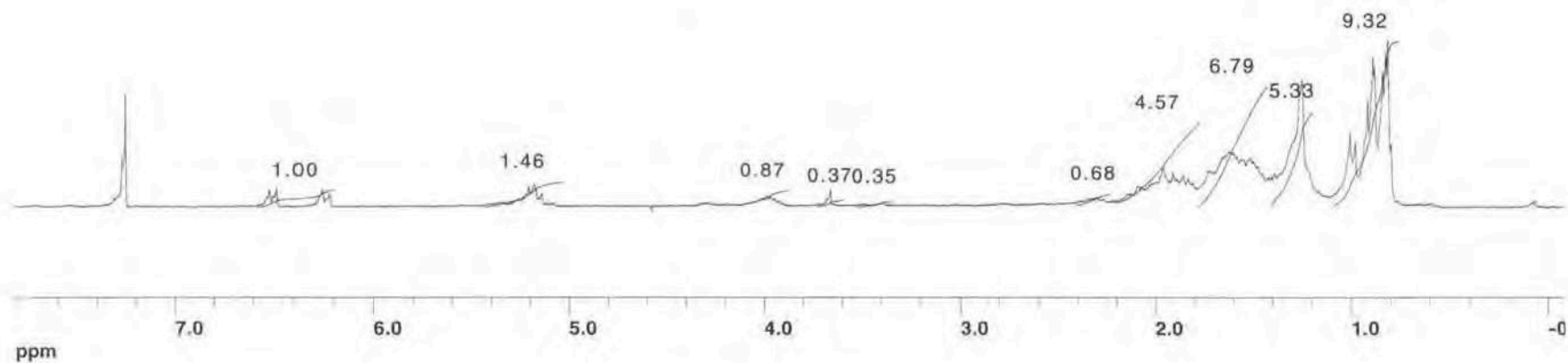
Anexo 14

H1 script run at: Sunday, November 11, 2001 7:04:24 pm  
 Macintosh HD:MacNMR 5.3-AC250:data:marcel:ROBERTO:Prm3001-1H-CDCI3

No. Points	16384				
No. Scans	16				
Dummy Scans	0				
Scan Count	16				
SW +/-	2500.0				
Filter	2400	#	Start ppm	Stop ppm	Integral
Acq. Time	3.277s	1	6.58	6.19	1.00
Dwell	200u	2	5.43	5.03	1.46
Obs Freq	250.1340000	3	4.14	3.87	0.87
Obs base	250.1300000	4	3.72	3.59	0.37
O1 offset	4.0000 KHz	5	3.51	3.34	0.35
dcplfreq	250.1340000	6	2.39	2.23	0.68
O2 offset	4.0000 KHz	7	2.20	1.77	4.57
RCVR gain	80	8	1.77	1.42	6.79
DEC Mode	OFF	9	1.40	1.18	5.33
DEC Attn.	58	10	1.08	0.75	9.32

File created:  
 Sunday, November 11, 2001  
 7:04 pm

**Espectro de  $^1\text{H}$ -NMR del Peróxido del ergosterol (86) y el 9(11)-Dehidroperóxido del ergosterol (87).**



Anexo 15

04 Aug 2003 10:46:39

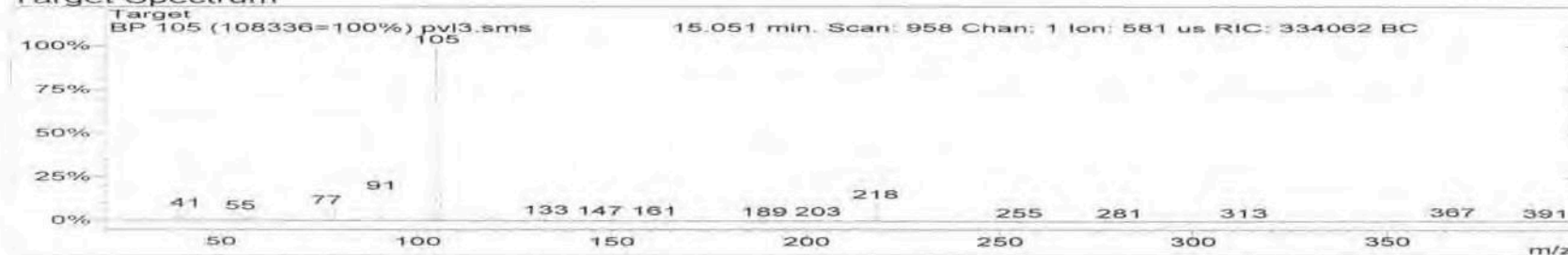
## NIST Target Spectrum Search Hit List

NIST Target Spectrum Search Results  
Hits Found: 100

NIST Target Spectrum Search Parameters  
Search Mode: Normal (Forward)  
Min Ion: 1  
Min Intensity: 1  
Constraints: 1 - 8000  
MW Range: 1 - 8000  
Name Fragment: ---  
Elements in Compound: ---  
Element Counts: ---  
Peaks: ---  
Other Databases: ---  
Requested Pre-Search: 6000  
Requested Final Search: 100  
Search 2 Libraries: A. mainlib  
B. replib

Huella MS del 1-metilnonil-benceno

### Target Spectrum



Spectrum from c:\saturnws\data\fames\muestras\pvl3.sms

Scan No: 958, Time: 15.051 minutes

No averaging. Background corrected.

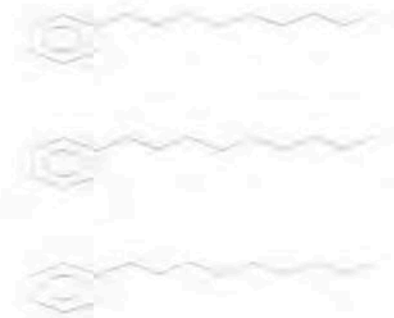
Comment: 15.051 min. Scan: 958 Chan: 1 Ion: 581 us RIC: 334062 BC

Pair Count: 195 MW: 0 Formula: None CAS No: None Acquired Range: 20 - 400

1  
Benzene, (1-methylnonyl)-  
Sim.: 739, RevSim.: 868, Prob.: 62.64 Formula: C<sub>16</sub>H<sub>26</sub>  
MW: 218 CAS No: 4537-13-7  
Entry #: 11365 of REPLIB  
NIST No: 10180 Other Databases: HODOC

2  
Benzene, (1-methylnonyl)-  
Sim.: 714, RevSim.: 837, Prob.: 62.64 Formula: C<sub>16</sub>H<sub>26</sub>  
MW: 218 CAS No: 4537-13-7  
Entry #: 46674 of MAINLIB  
NIST No: 61120 Other Databases: HODOC

3  
Benzene, (1-methylnonyl)-  
Sim.: 713, RevSim.: 832, Prob.: 62.64 Formula: C<sub>16</sub>H<sub>26</sub>  
MW: 218 CAS No: 4537-13-7  
Entry #: 11335 of REPLIB  
NIST No: 27554 Other Databases: HODOC





## NIST Target Spectrum Search Hit List

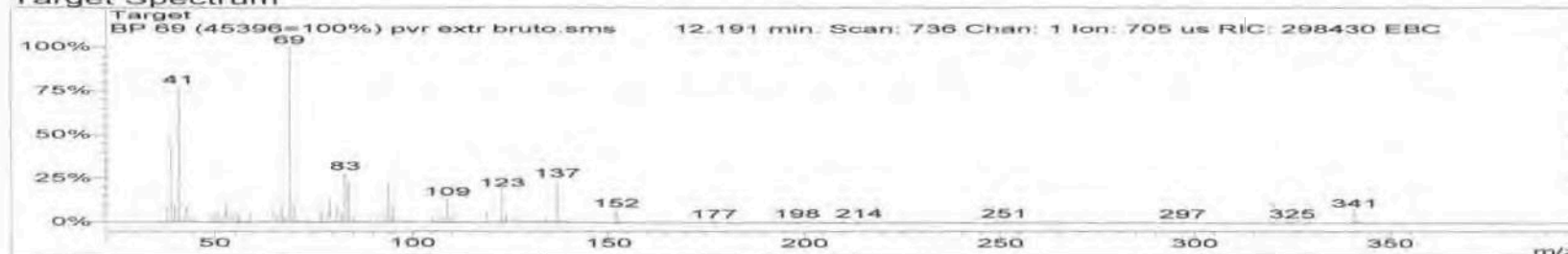
NIST Target Spectrum Search Results  
Hits Found: 100

### NIST Target Spectrum Search Parameters

Search Mode: Normal (Forward)  
Min Ion: 1  
Min Intensity: 1  
Constraints:  
MW Range: 1 - 8000  
Name Fragment: ---  
Elements in Compound: ---  
Element Counts: ---  
Peaks: ---  
Other Databases: ---  
Requested Pre-Search: 6000  
Requested Final Search: 100  
Search 2 Libraries: A. mainlib  
B. replib

Huella MS del (E)-3,7-dimetil-2,6-octadienal  
(monoterpeno)

### Target Spectrum



Spectrum from c:\... \data\fames\muestras\pvr extr bruto.sms

Scan No: 736, Time: 12.191 minutes

No averaging. Background corrected (E).

Comment: 12.191 min. Scan: 736 Chan: 1 Ion: 705 us RIC: 298430 EBC

Pair Count: 172 MW: 0 Formula: None CAS No: None Acquired Range: 20 - 400

1  
2,6-Octadienal, 3,7-dimethyl-, (E)-  
Sim.: 696, RevSim.: 822, Prob.: 36.06 Formula: C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>O  
MW: 152 CAS No: 141-27-5  
Entry #: 2470 of MAINLIB  
NIST No: 159020 Other Databases: TSCA RTECS HODOC EINECS



2  
2,6-Octadienal, 3,7-dimethyl-,  
Sim.: 695, RevSim.: 828, Prob.: 29.06 Formula: C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>O  
MW: 152 CAS No: 5392-40-5  
Entry #: 6257 of REPLIB  
NIST No: 185297 Other Databases: Fine TSCA RTECS NIH EINECS IR



3  
2,6-Octadienal, 3,7-dimethyl-, (Z)-  
Sim.: 687, RevSim.: 809, Prob.: 23.42 Formula: C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>O  
MW: 152 CAS No: 106-26-3  
Entry #: 2436 of MAINLIB  
NIST No: 151979 Other Databases: TSCA HODOC EINECS



Anexo 17

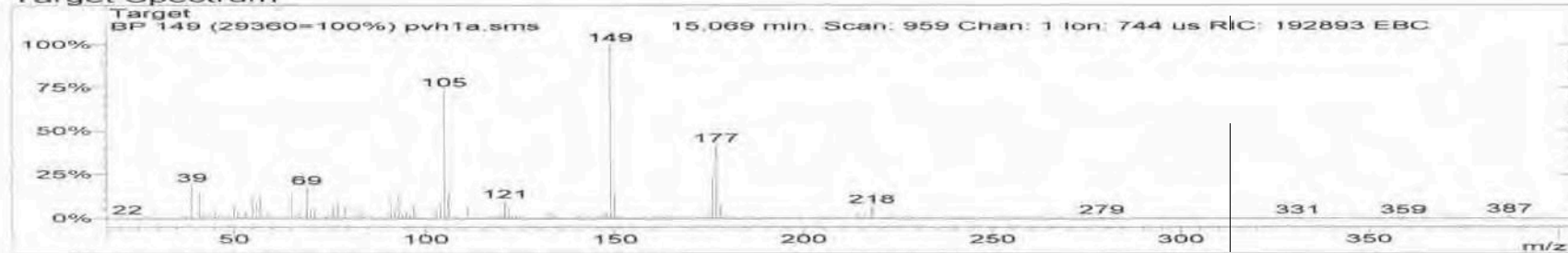
### NIST Target Spectrum Search Hit List

NIST Target Spectrum Search Results  
 Hits Found: 100

NIST Target Spectrum Search Parameters  
 Search Mode: Normal (Forward)  
 Min Ion: 1  
 Min Intensity: 1  
 Constraints:  
 MW Range: 1 - 8000  
 Name Fragment: ---  
 Elements in Compound: ---  
 Element Counts: ---  
 Peaks: ---  
 Other Databases: ---  
 Requested Pre-Search: 6000  
 Requested Final Search: 100  
 Search 2 Libraries: A. mainlib  
 B. replib

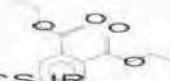
Huella MS del Ftalato de dietilo

#### Target Spectrum



Spectrum from c:\saturnws\data\fames\muestras\pvh1a.sms  
 Scan No: 959, Time: 15.069 minutes  
 No averaging. Background corrected (E).  
 Comment: 15.069 min. Scan: 959 Chan: 1 Ion: 744 us RIC: 192893 EBC  
 Pair Count: 173 MW: 0 Formula: None CAS No: None Acquired Range: 20 - 400

1  
 Diethyl Phthalate  
 Sim.: 628, RevSim.: 842, Prob.: 62.23 Formula: C12H14O4  
 MW: 222 CAS No: 84-66-2  
 Entry #: 15629 of REPLIB  
 NIST No: 114975 Other Databases: Fine TSCA RTECS EPA USP HODOC NIH EINECS IR



2  
 Diethyl Phthalate  
 Sim.: 619, RevSim.: 750, Prob.: 62.23 Formula: C12H14O4  
 MW: 222 CAS No: 84-66-2  
 Entry #: 15631 of REPLIB  
 NIST No: 155450 Other Databases: Fine TSCA RTECS EPA USP HODOC NIH EINECS IR



3  
 Diethyl Phthalate  
 Sim.: 605, RevSim.: 769, Prob.: 62.23 Formula: C12H14O4  
 MW: 222 CAS No: 84-66-2  
 Entry #: 15628 of REPLIB  
 NIST No: 249962 Other Databases: Fine TSCA RTECS EPA USP HODOC NIH EINECS IR



Anexo 19

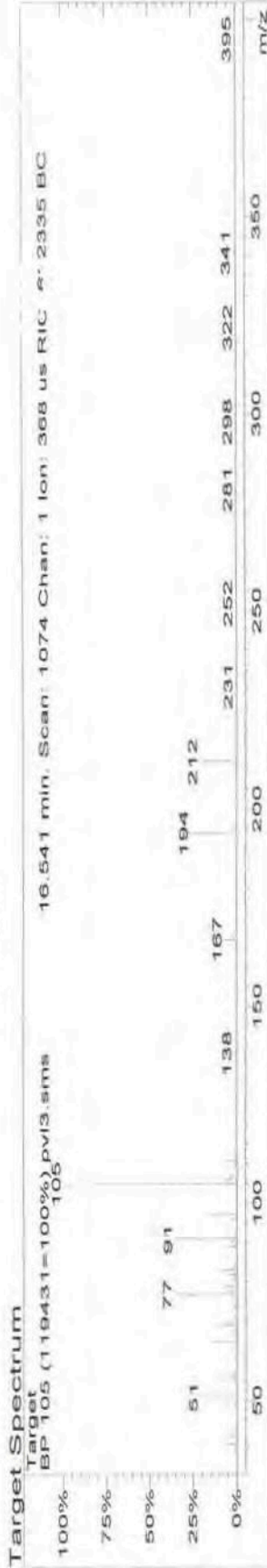
NIST Target Spectrum Search Hit List

NIST Target Spectrum Search Results  
 Hits Found: 100

NIST Target Spectrum Search Parameters  
 Search Mode: Normal (Forward)

Min Ion: 1  
 Min Intensity: 1  
 Constraints: 1 - 8000  
 MW Range: ---  
 Name Fragment: ---  
 Elements in Compound: ---  
 Element Counts: ---  
 Peaks: ---  
 Other Databases: ---  
 Requested Pre-Search: 6000  
 Requested Final Search: 100  
 Search 2 Libraries: A. mainlib  
 B. replib

Huella MS del benzoato de bencilo



Spectrum from c:\saturnms\data\frames\muestras\pvl3.sms

Scan No: 1074, Time: 16.541 minutes  
 No averaging, Background corrected.  
 Comment: 16.541 min. Scan: 1074 Chan: 1 Ion: 368 us RIC: 63233.7 BC  
 Pair Count: 182 MW: 0 Formula: None CAS No: None Acquired Range: 20 - 400

- 1 Benzyl Benzoate  
 Sim.: 713, RevSim.: 899, Prob.: 83.62 Formula: C14H12O2  
 MW: 212 CAS No: 120-51-4  
 Entry #: 46514 of MAINLIB  
 NIST No: 118657 Other Databases: Fine TSCA RTECS USP HODOC N.I.H EINECS IR  
O=C(Oc1ccccc1)Cc2ccccc2
- 2 Benzyl Benzoate  
 Sim.: 709, RevSim.: 878, Prob.: 83.62 Formula: C14H12O2  
 MW: 212 CAS No: 120-51-4  
 Entry #: 11329 of REPLIB  
 NIST No: 160790 Other Databases: Fine TSCA RTECS USP HODOC N.I.H EINECS IR  
O=C(Oc1ccccc1)Cc2ccccc2
- 3 Benzyl Benzoate  
 Sim.: 682, RevSim.: 842, Prob.: 83.62 Formula: C14H12O2  
 MW: 212 CAS No: 120-51-4  
 Entry #: 11330 of REPLIB  
 NIST No: 232779 Other Databases: Fine TSCA RTECS USP HODOC N.I.H EINECS IR  
O=C(Oc1ccccc1)Cc2ccccc2



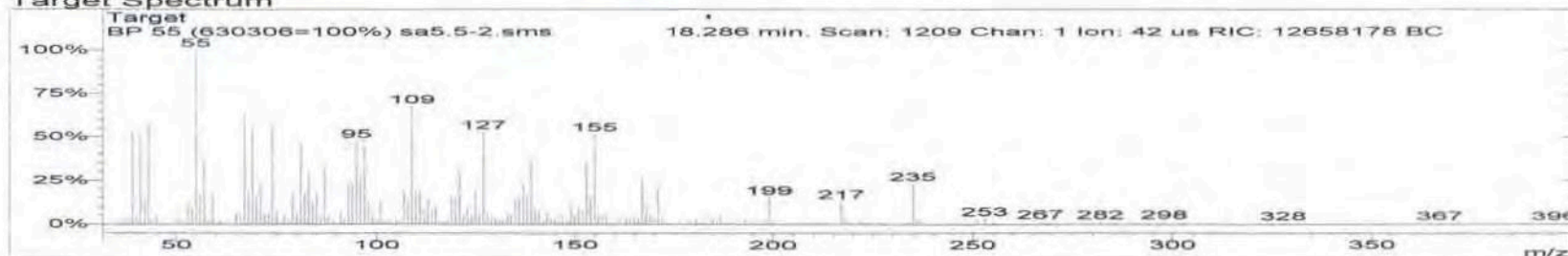
**NIST Target Spectrum Search Hit List**

NIST Target Spectrum Search Results  
 Hits Found: 100

NIST Target Spectrum Search Parameters  
 Search Mode: Normal (Forward)  
 Min Ion: 1  
 Min Intensity: 1  
 Constraints:  
 MW Range: 1 - 8000  
 Name Fragment: ---  
 Elements in Compound: ---  
 Element Counts: ---  
 Peaks: ---  
 Other Databases: ---  
 Requested Pre-Search: 6000  
 Requested Final Search: 100  
 Search 2 Libraries: A. mainlib  
 B. replib

Huella MS del ester metílico del ácido 3-octil-oxiranooctanoico

**Target Spectrum**



Spectrum from c:\saturnws\data\fames\muestras\sa5.5-2.sms  
 Scan No: 1209, Time: 18.286 minutes  
 No averaging. Background corrected.  
 Comment: 18.286 min. Scan: 1209 Chan: 1 Ion: 42 us RIC: 12658178 BC  
 Pair Count: 193 MW: 0 Formula: None CAS No: None Acquired Range: 20 - 400

1  
 Oxiraneoctanoic acid, 3-octyl-, methyl ester, cis-  
 Sim.: 776, RevSim.: 785, Prob.: 35.43 Formula: C<sub>19</sub>H<sub>36</sub>O<sub>3</sub>  
 MW: 312 CAS No: 2566-91-8  
 Entry #: 14066 of MAINLIB  
 NIST No: 36237 Other Databases: None



2  
 Oxiraneoctanoic acid, 3-octyl-, methyl ester  
 Sim.: 758, RevSim.: 764, Prob.: 21.47 Formula: C<sub>19</sub>H<sub>36</sub>O<sub>3</sub>  
 MW: 312 CAS No: 2500-59-6  
 Entry #: 69057 of MAINLIB  
 NIST No: 14768 Other Databases: EINECS



3  
 Oxiraneoctanoic acid, 3-octyl-, methyl ester, trans-  
 Sim.: 744, RevSim.: 769, Prob.: 17.30 Formula: C<sub>19</sub>H<sub>36</sub>O<sub>3</sub>  
 MW: 312 CAS No: 6084-76-0  
 Entry #: 3474 of REPLIB  
 NIST No: 36281 Other Databases: None



## NIST Target Spectrum Search Hit List

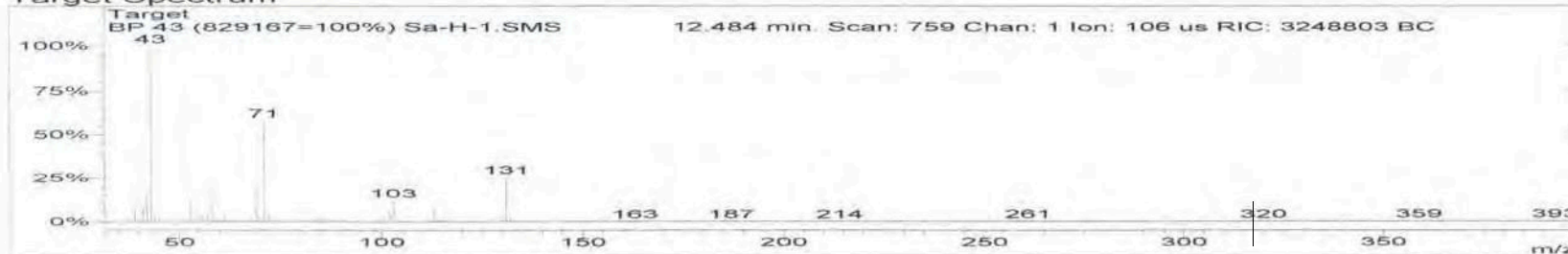
NIST Target Spectrum Search Results  
Hits Found: 100

### NIST Target Spectrum Search Parameters

Search Mode: Normal (Forward)  
Min Ion: 1  
Min Intensity: 1  
Constraints:  
MW Range: 1 - 8000  
Name Fragment: ---  
Elements in Compound: ---  
Element Counts: ---  
Peaks: ---  
Other Databases: ---  
Requested Pre-Search: 6000  
Requested Final Search: 100  
Search 2 Libraries: A. mainlib  
B. replib

Huella MS del tetrahidro-4-hidroxi-4-metil-2H-Piran-2-ona (Mevalonato)

### Target Spectrum



Spectrum from c:\saturnws\data\fames\muestras\Sa-H-1.SMS

Scan No: 759, Time: 12.484 minutes

No averaging. Background corrected.

Comment: 12.484 min. Scan: 759 Chan: 1 Ion: 106 us RIC: 3248803 BC

Pair Count: 129 MW: 0 Formula: None CAS No: None Acquired Range: 20 - 400

1

2H-Pyran-2-one, tetrahydro-4-hydroxy-4-methyl-

Sim.: 744, RevSim.: 768, Prob.: 73.11 Formula: C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub>

MW: 130 CAS No: 503-48-0

Entry #: 2023 of REPLIB

NIST No: 186011 Other Databases: None

2

2H-Pyran-2-one, tetrahydro-4-hydroxy-4-methyl-

Sim.: 693, RevSim.: 804, Prob.: 73.11 Formula: C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub>

MW: 130 CAS No: 503-48-0

Entry #: 2022 of REPLIB

NIST No: 79631 Other Databases: None

3

2H-Pyran-2-one, tetrahydro-4-hydroxy-4-methyl-

Sim.: 690, RevSim.: 709, Prob.: 73.11 Formula: C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub>

MW: 130 CAS No: 503-48-0

Entry #: 2021 of REPLIB

NIST No: 79344 Other Databases: None

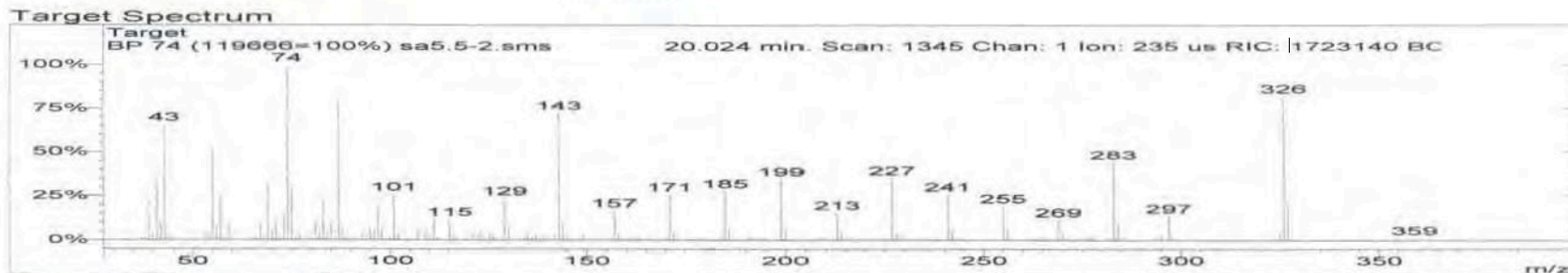


### ST Target Spectrum Search Hit List

NIST Target Spectrum Search Results  
 Hits Found: 100

NIST Target Spectrum Search Parameters  
 Search Mode: Normal (Forward)  
 Min Ion: 1  
 Min Intensity: 1  
 Constraints:  
 MW Range: 1 - 8000  
 Name Fragment: ---  
 Elements in Compound: ---  
 Element Counts: ---  
 Peaks: ---  
 Other Databases: ---  
 Requested Pre-Search: 6000  
 Requested Final Search: 100  
 Search 2 Libraries: A. mainlib  
 B. replib

Huella MS del ester metilico del ácido eicosanoico



Spectrum from c:\saturnws\data\fames\muestras\sa5.5-2.sms  
 Scan No: 1345, Time: 20.024 minutes  
 No averaging. Background corrected.  
 Comment: 20.024 min. Scan: 1345 Chan: 1 Ion: 235 us RIC: 1723140 BC  
 Pair Count: 242 MW: 0 Formula: None CAS No: None Acquired Range: 20 - 400

1  
 Eicosanoic acid, methyl ester  
 Sim.: 784, RevSim.: 846, Prob.: 69.23 Formula: C<sub>21</sub>H<sub>42</sub>O<sub>2</sub>  
 MW: 326 CAS No: 1120-28-1  
 Entry #: 7543 of REPLIB  
 NIST No: 109469 Other Databases: Fine TSCA HODOC EINECS

2  
 Eicosanoic acid, methyl ester  
 Sim.: 756, RevSim.: 819, Prob.: 69.23 Formula: C<sub>21</sub>H<sub>42</sub>O<sub>2</sub>  
 MW: 326 CAS No: 1120-28-1  
 Entry #: 7537 of REPLIB  
 NIST No: 71624 Other Databases: Fine TSCA HODOC EINECS

3  
 Eicosanoic acid, methyl ester  
 Sim.: 741, RevSim.: 778, Prob.: 69.23 Formula: C<sub>21</sub>H<sub>42</sub>O<sub>2</sub>  
 MW: 326 CAS No: 1120-28-1  
 Entry #: 7540 of REPLIB  
 NIST No: 15260 Other Databases: Fine TSCA HODOC EINECS

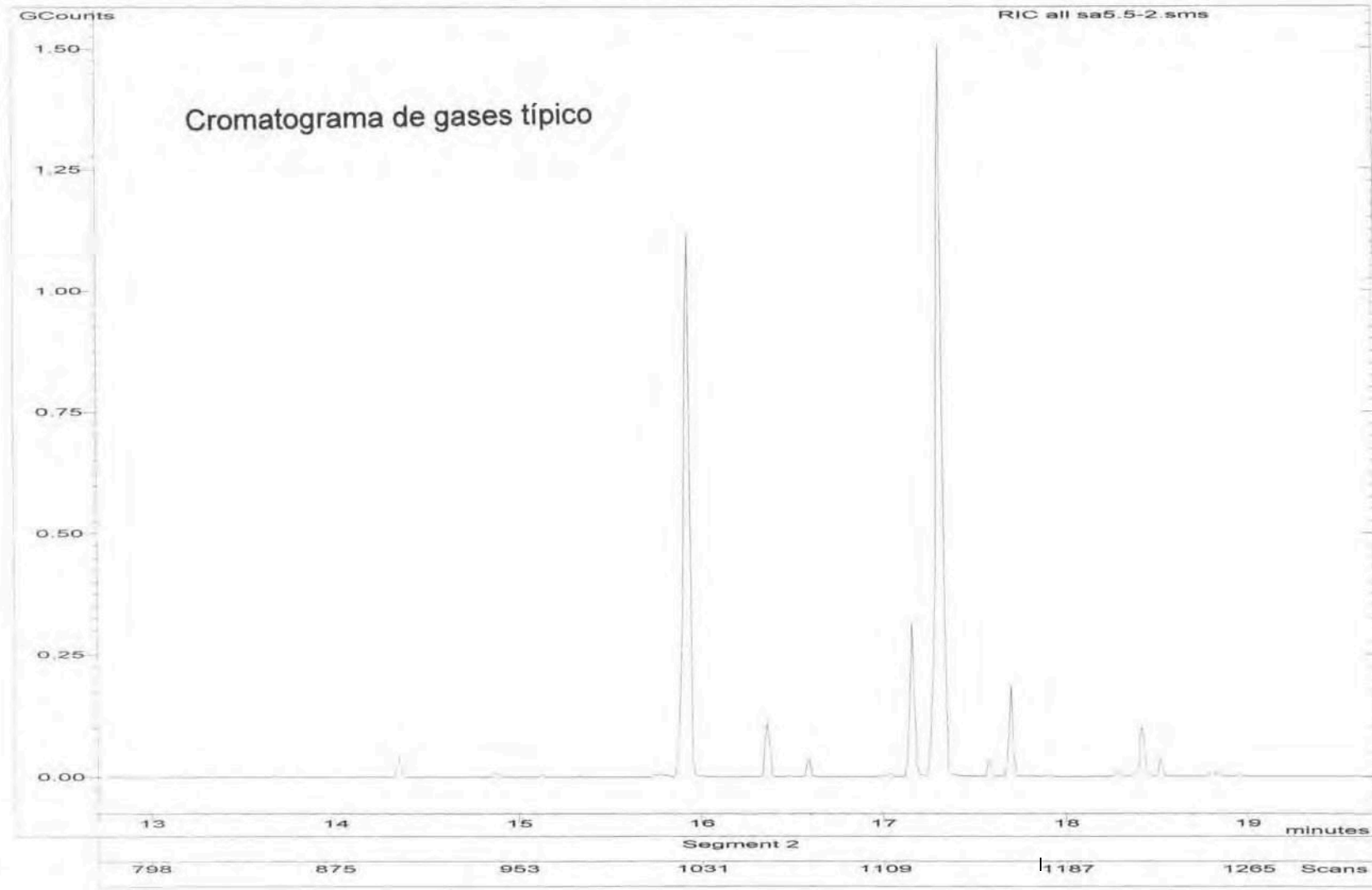
Anexo 22



# Chromatogram Plot

File: c:\saturnws\data\fames\muestras\sa5.5-2.sms  
Sample: sa5.5-2  
Scan Range: 1 - 1969 Time Range: 0.00 - 27.98 min.

Operator: Juanjo  
Date: 22/06/03 15:48



Anexo 23

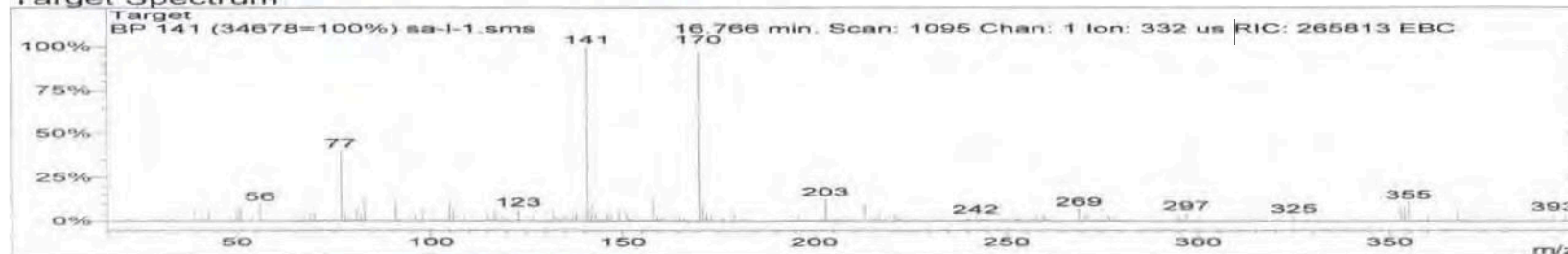
## NIST Target Spectrum Search Hit List

NIST Target Spectrum Search Results  
Hits Found: 100

NIST Target Spectrum Search Parameters  
Search Mode: Normal (Forward)  
Min Ion: 1  
Min Intensity: 1  
Constraints: 1 - 8000  
MW Range: 1 - 8000  
Name Fragment: ---  
Elements in Compound: ---  
Element Counts: ---  
Peaks: ---  
Other Databases: ---  
Requested Pre-Search: 6000  
Requested Final Search: 100  
Search 2 Libraries: A. mainlib  
B. replib

Huella MS de la N-Butil-bencenosulfonamida

### Target Spectrum



Spectrum from c:\saturnws\data\fames\muestras\sa-l-1.sms

Scan No: 1095, Time: 16.766 minutes

No averaging. Background corrected (E).

Comment: 16.766 min. Scan: 1095 Chan: 1 Ion: 332 us RIC: 265813 EBC

Pair Count: 185 MW: 0 Formula: None CAS No: None Acquired Range: 20 - 400

1

Benzenesulfonamide, N-butyl-  
Sim.: 483, RevSim.: 920, Prob.: 54.64 Formula: C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>2</sub>S

MW: 213 CAS No: 3622-84-2

Entry #: 7862 of REPLIB

NIST No: 9916 Other Databases: Fine TSCA RTECS EPA NIH EINECS IR

2

Benzenesulfonamide, N-butyl-  
Sim.: 474, RevSim.: 762, Prob.: 54.64 Formula: C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>2</sub>S

MW: 213 CAS No: 3622-84-2

Entry #: 29878 of MAINLIB

NIST No: 125067 Other Databases: Fine TSCA RTECS EPA NIH EINECS IR

3

Benzenesulfonamide, N-butyl-  
Sim.: 469, RevSim.: 753, Prob.: 54.64 Formula: C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>2</sub>S

MW: 213 CAS No: 3622-84-2

Entry #: 7863 of REPLIB

NIST No: 232333 Other Databases: Fine TSCA RTECS EPA NIH EINECS IR



Anexo 24



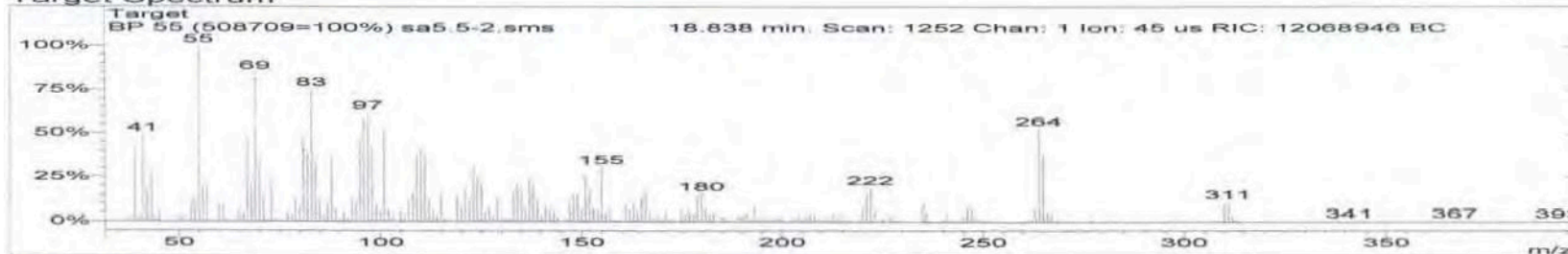
### NIST Target Spectrum Search Hit List

NIST Target Spectrum Search Results  
 Hits Found: 100

NIST Target Spectrum Search Parameters  
 Search Mode: Normal (Forward)  
 Min Ion: 1  
 Min Intensity: 1  
 Constraints:  
   MW Range: 1 - 8000  
   Name Fragment: ---  
   Elements in Compound: ---  
   Element Counts: ---  
   Peaks: ---  
   Other Databases: ---  
 Requested Pre-Search: 6000  
 Requested Final Search: 100  
 Search 2 Libraries: A. mainlib  
                   B. replib

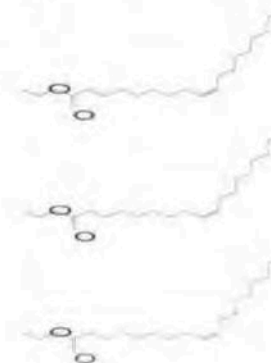
Huella MS del Oleato de etilo

#### Target Spectrum



Spectrum from c:\saturnws\data\ames\muestras\sa5.5-2.sms  
 Scan No: 1252, Time: 18.838 minutes  
 No averaging. Background corrected.  
 Comment: 18.838 min. Scan: 1252 Chan: 1 Ion: 45 us RIC: 12068946 BC  
 Pair Count: 222 MW: 0 Formula: None CAS No: None Acquired Range: 20 - 400

- 1  
 Ethyl Oleate  
 Sim.: 842, RevSim.: 849, Prob.: 43.12 Formula: C<sub>20</sub>H<sub>38</sub>O<sub>2</sub>  
 MW: 310 CAS No: 111-62-6  
 Entry #: 3628 of REPLIB  
 NIST No: 14676 Other Databases: Fine TSCA USP HODOC NIH EINECS IR
- 2  
 Ethyl Oleate  
 Sim.: 832, RevSim.: 843, Prob.: 43.12 Formula: C<sub>20</sub>H<sub>38</sub>O<sub>2</sub>  
 MW: 310 CAS No: 111-62-6  
 Entry #: 3629 of REPLIB  
 NIST No: 150151 Other Databases: Fine TSCA USP HODOC NIH EINECS IR
- 3  
 Ethyl Oleate  
 Sim.: 831, RevSim.: 833, Prob.: 43.12 Formula: C<sub>20</sub>H<sub>38</sub>O<sub>2</sub>  
 MW: 310 CAS No: 111-62-6  
 Entry #: 3802 of REPLIB  
 NIST No: 241813 Other Databases: Fine TSCA USP HODOC NIH EINECS IR



Anexo 25

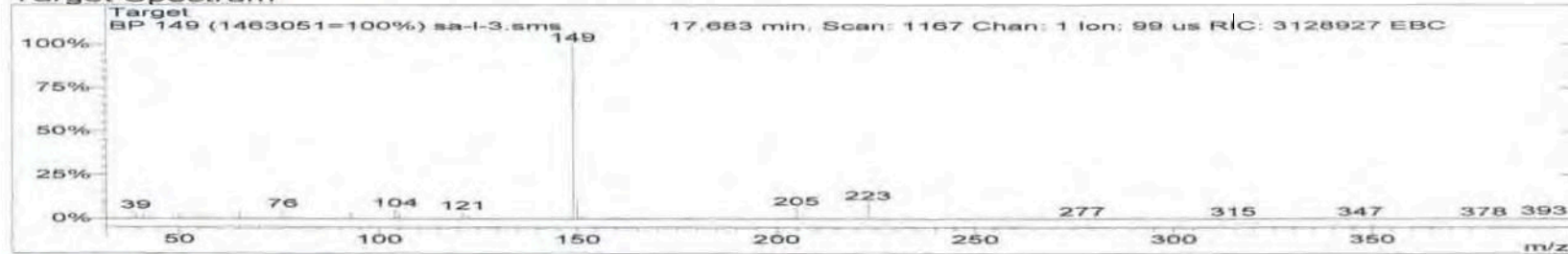
### NIST Target Spectrum Search Hit List

NIST Target Spectrum Search Results  
 Hits Found: 100

NIST Target Spectrum Search Parameters  
 Search Mode: Normal (Forward)  
 Min Ion: 1  
 Min Intensity: 1  
 Constraints  
 MW Range: 1 - 8000  
 Name Fragment: ---  
 Elements in Compound: ---  
 Element Counts: ---  
 Peaks: ---  
 Other Databases: ---  
 Requested Pre-Search: 6000  
 Requested Final Search: 100  
 Search 2 Libraries: A. mainlib  
 B. replib

Huella MS del ftalato de dibutilo

#### Target Spectrum

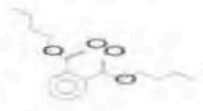


Spectrum from c:\saturnws\data\fames\muestras\sa-l-3.sms  
 Scan No: 1167, Time: 17.683 minutes  
 No averaging. Background corrected (E).  
 Comment: 17.683 min. Scan: 1167 Chan: 1 Ion: 99 us RIC: 3128927 EBC  
 Pair Count: 204 MW: 0 Formula: None CAS No: None Acquired Range: 20 - 400

1  
 Dibutyl phthalate  
 Sim.: 849, RevSim.: 929, Prob.: 43.76 Formula: C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>O<sub>4</sub>  
 MW: 278 CAS No: 84-74-2  
 Entry #: 66999 of MAINLIB  
 NIST No: 114974 Other Databases: Fine TSCA RTECS EPA HODOC NIH EINECS IR



2  
 Dibutyl phthalate  
 Sim.: 820, RevSim.: 909, Prob.: 43.76 Fprmula: C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>O<sub>4</sub>  
 MW: 278 CAS No: 84-74-2  
 Entry #: 15546 of REPLIB  
 NIST No: 23125 Other Databases: Fine TSCA RTECS EPA HODOC NIH EINECS IR



3  
 Dibutyl phthalate  
 Sim.: 820, RevSim.: 886, Prob.: 43.76 Formula: C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>O<sub>4</sub>  
 MW: 278 CAS No: 84-74-2  
 Entry #: 15599 of REPLIB  
 NIST No: 70664 Other Databases: Fine TSCA RTECS EPA HODOC NIH EINECS IR



Anexo 26

## T Target Spectrum Search Hit List

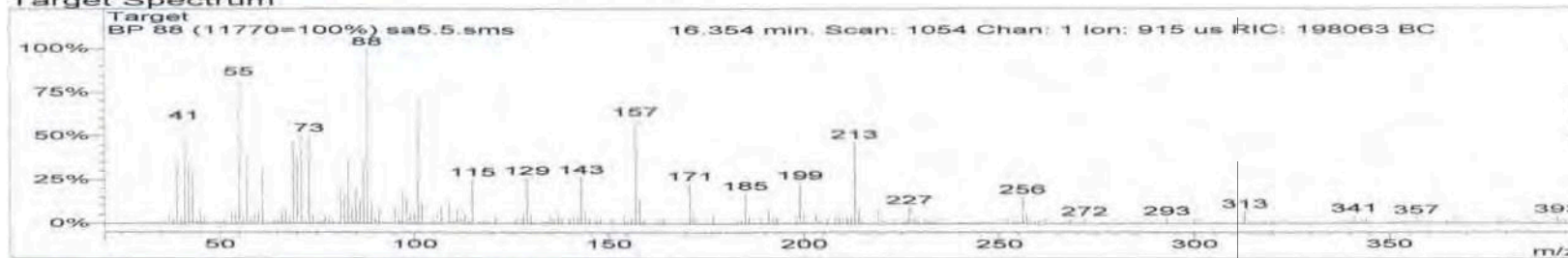
Target Spectrum Search Results  
Hits Found: 100

### NIST Target Spectrum Search Parameters

Search Mode: Normal (Forward)  
Min Ion: 1  
Min Intensity: 1  
Constraints:  
MW Range: 1 - 8000  
Name Fragment: ---  
Elements in Compound: ---  
Element Counts: ---  
Peaks: ---  
Other Databases: ---  
Requested Pre-Search: 6000  
Requested Final Search: 100  
Search 2 Libraries: A. mainlib  
B. replib

Huella MS del éster etílico del ácido tetradecanoico

### Target Spectrum



Spectrum from c:\saturnws\data\fames\muestras\sa5.5.sms

Scan No: 1054, Time: 16.354 minutes

No averaging. Background corrected.

Comment: 16.354 min. Scan: 1054 Chan: 1 Ion: 915 us RIC: 198063 BC

Pair Count: 223 MW: 0 Formula: None CAS No: None Acquired Range: 20 - 400

1

Tetradecanoic acid, ethyl ester

Sim.: 607, RevSim.: 727, Prob.: 19.40 Formula: C<sub>16</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub>

MW: 256 CAS No: 124-06-1

Entry #: 35857 of MAINLIB

NIST No: 229118 Other Databases: Fine TSCA EPA HODOC NIP EINECS IR

2

Tetradecanoic acid, ethyl ester

Sim.: 600, RevSim.: 682, Prob.: 19.40 Formula: C<sub>16</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub>

MW: 256 CAS No: 124-06-1

Entry #: 9179 of REPLIB

NIST No: 12454 Other Databases: Fine TSCA EPA HODOC NIP EINECS IR

3

Tetradecanoic acid, ethyl ester

Sim.: 598, RevSim.: 718, Prob.: 19.40 Formula: C<sub>16</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub>

MW: 256 CAS No: 124-06-1

Entry #: 9180 of REPLIB

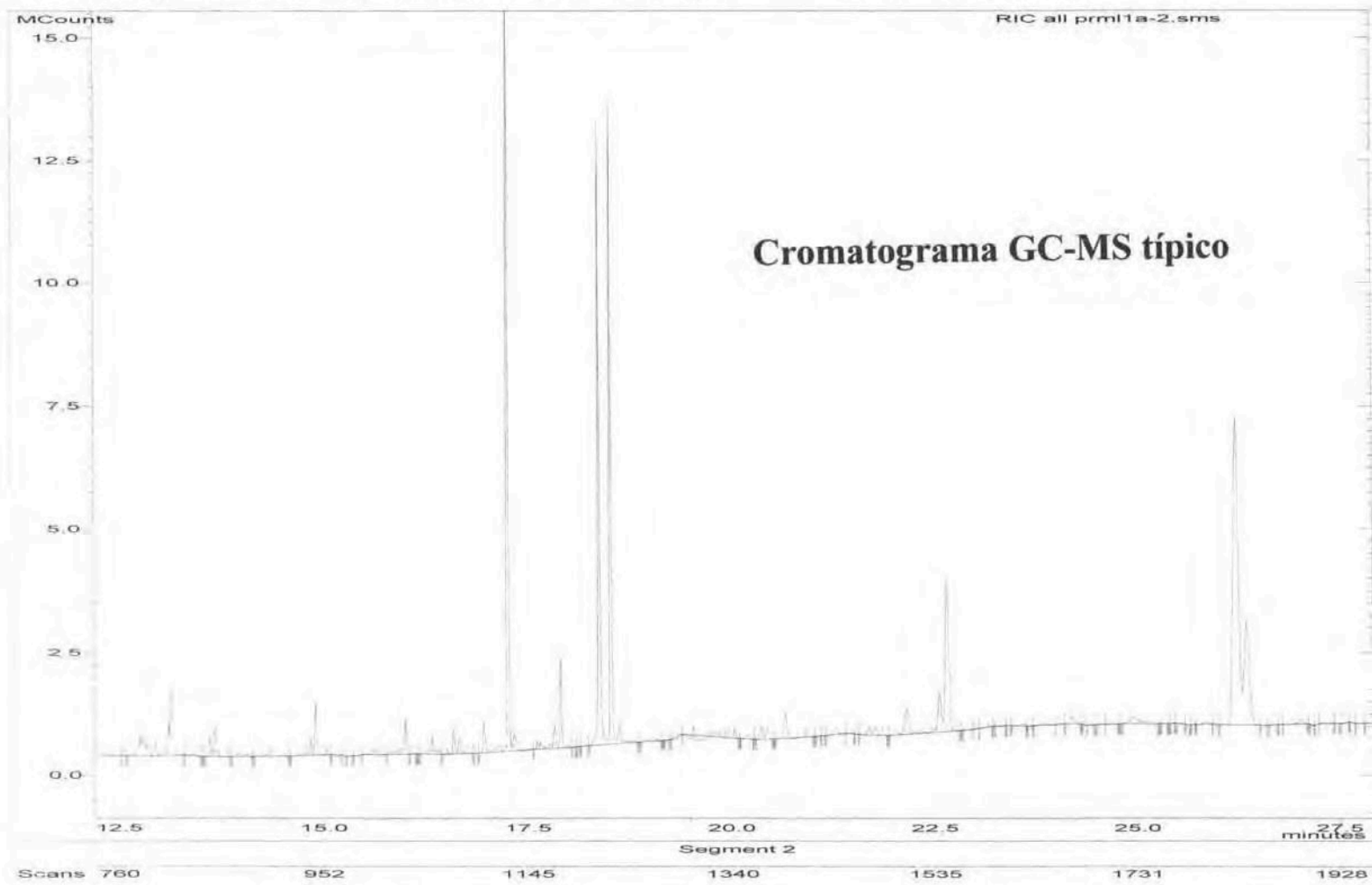
NIST No: 156923 Other Databases: Fine TSCA EPA HODOC NIP EINECS IR

Anexo 27

### Chromatogram Plot

File: c:\saturnws\data\fames\muestras\prml1a-2.sms  
Sample: prml1a-2  
Scan Range: 1 - 1965 Time Range: 0.00 - 27.98 min.

Operator: Juanjo  
Date: 22/06/03 0:26





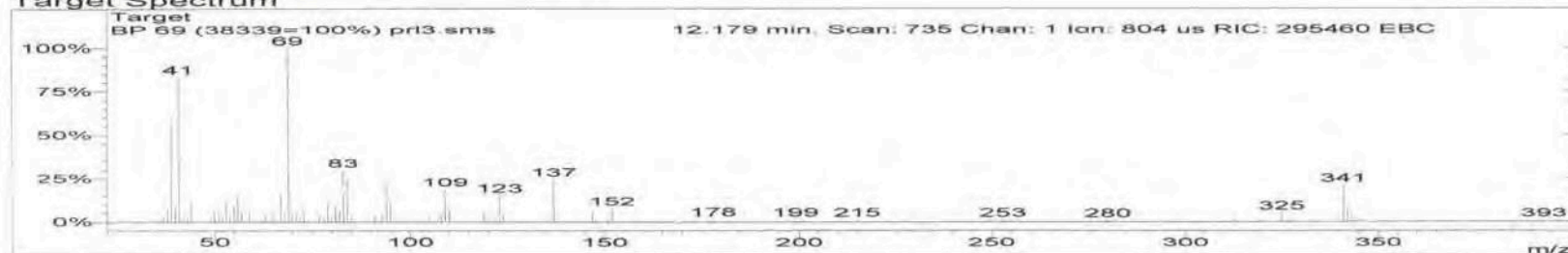
## NIST Target Spectrum Search Hit List

NIST Target Spectrum Search Results  
Hits Found: 100

NIST Target Spectrum Search Parameters  
 Search Mode: Normal (Forward)  
 Min Ion: 1  
 Min Intensity: 1  
 Constraints:  
 MW Range: 1 - 8000  
 Name Fragment: ---  
 Elements in Compound: ---  
 Element Counts: ---  
 Peaks: ---  
 Other Databases: ---  
 Requested Pre-Search: 6000  
 Requested Final Search: 100  
 Search 2 Libraries: A. mainlib B. replib

**Huella del 3,7-Dimetil-2,6-octadienal (74, monoterpeno), identificado por GC-MS**

### Target Spectrum



Spectrum from c:\saturnws\data\fames\muestras\prl3.sms

Scan No: 735, Time: 12.179 minutes

No averaging. Background corrected (E).

Comment: 12.179 min. Scan: 735 Chan: 1 Ion: 804 us RIC: 295460 EBC

Pair Count: 189 MW: 0 Formula: None CAS No: None Acquired Range: 20 - 400

1

2,6-Octadienal, 3,7-dimethyl-

Sim.: 604, RevSim.: 811, Prob.: 29.77 Formula: C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>O

MW: 152 CAS No: 5392-40-5

Entry #: 6257 of REPLIB

NIST No: 185297 Other Databases: Fine TSCA RTECS NIH EINECS IR



2

2,6-Octadienal, 3,7-dimethyl-, (E)-

Sim.: 600, RevSim.: 802, Prob.: 23.99 Formula: C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>O

MW: 152 CAS No: 141-27-5

Entry #: 2470 of MAINLIB

NIST No: 159020 Other Databases: TSCA RTECS HODOC EINECS



3

2,6-Octadienal, 3,7-dimethyl-

Sim.: 597, RevSim.: 821, Prob.: 29.77 Formula: C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>O

MW: 152 CAS No: 5392-40-5

Entry #: 6256 of REPLIB

NIST No: 248401 Other Databases: Fine TSCA RTECS NIH EINECS IR



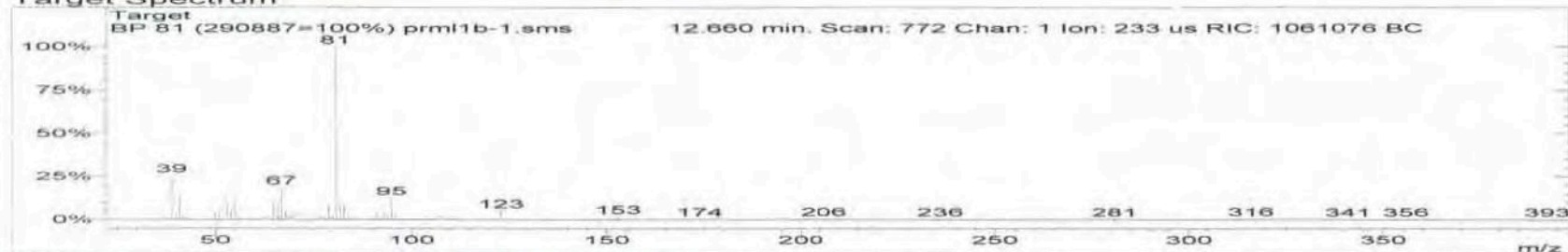
## NIST Target Spectrum Search Hit List

NIST Target Spectrum Search Results  
Hits Found: 100

NIST Target Spectrum Search Parameters  
Search Mode: Normal (Forward)  
Min Ion: 1  
Min Intensity: 1  
Constraints: 1 - 8000  
MW Range: 1 - 8000  
Name Fragment: ---  
Elements in Compound: ---  
Element Counts: ---  
Peaks: ---  
Other Databases: ---  
Requested Pre-Search: 6000  
Requested Final Search: 100  
Search 2 Libraries: A. mainlib  
B. replib

**Huella del 2,4-Decadienal (catabolito de HUFAs),  
identificado por GC-MS**

### Target Spectrum



Spectrum from c:\saturnws\data\fames\muestras\prml1b-1.sms  
Scan No: 772, Time: 12.660 minutes  
No averaging. Background corrected.  
Comment: 12.660 min. Scan: 772 Chan: 1 Ion: 233 us RIC: 1061076 BC  
Pair Count: 116 MW: 0 Formula: None CAS No: None Acquired Range: 20 - 400

1  
2,4-Decadienal  
Sim.: 797, RevSim.: 910, Prob.: 34.85 Formula: C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>O  
MW: 152 CAS No: 2363-88-4  
Entry #: 8157 of REPLIB  
NIST No: 121814 Other Databases: TSCA EINECS



2  
2,4-Decadienal, (E,E)-  
Sim.: 786, RevSim.: 818, Prob.: 28.09 Formula: C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>O  
MW: 152 CAS No: 25152-84-5  
Entry #: 31387 of MAINLIB  
NIST No: 133281 Other Databases: Fine TSCA EINECS



3  
2,4-Decadienal  
Sim.: 778, RevSim.: 849, Prob.: 34.85 Formula: C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>O  
MW: 152 CAS No: 2363-88-4  
Entry #: 31400 of MAINLIB  
NIST No: 249237 Other Databases: TSCA EINECS



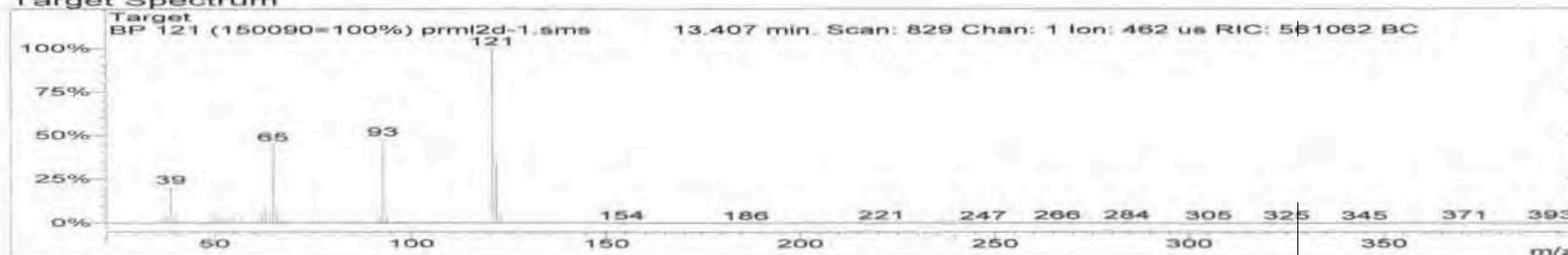
### NIST Target Spectrum Search Hit List

NIST Target Spectrum Search Results  
 Hits Found: 100

NIST Target Spectrum Search Parameters  
 Search Mode: Normal (Forward)  
 Min Ion: 1  
 Min Intensity: 1  
 Constraints:  
 MW Range: 1 - 8000  
 Name Fragment: ---  
 Elements in Compound: ---  
 Element Counts: ---  
 Peaks: ---  
 Other Databases: ---  
 Requested Pre-Search: 6000  
 Requested Final Search: 100  
 Search 2 Libraries: A. mainlib  
 B. replib

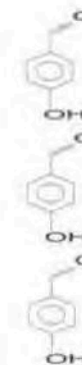
## Huella del 4-Hidroxi-benzaldehído (78, ruta del ácido shikímico), identificado por GC-MS

#### Target Spectrum



Spectrum from c:\saturnws\data\fames\muestras\prml2d-1.sms  
 Scan No: 829, Time: 13.407 minutes  
 No averaging. Background corrected.  
 Comment: 13.407 min. Scan: 829 Chan: 1 Ion: 462 us RIC: 561062 BC  
 Pair Count: 163 MW: 0 Formula: None CAS No: None Acquired Range: 20 - 400

- 1  
 Benzaldehyde, 4-hydroxy-  
 Sim.: 808, RevSim.: 881, Prob.: 29.94 Formula: C7H6O2  
 MW: 122 CAS No: 123-08-0  
 Entry #: 54810 of MAINLIB  
 NIST No: 135511 Other Databases: Fine TSCA RTECS EPA HODOC NIH EINECS IR
- 2  
 Benzaldehyde, 4-hydroxy-  
 Sim.: 800, RevSim.: 853, Prob.: 29.94 Formula: C7H6O2  
 MW: 122 CAS No: 123-08-0  
 Entry #: 13239 of REPLIB  
 NIST No: 194160 Other Databases: Fine TSCA RTECS EPA HODOC NIH EINECS IR
- 3  
 Benzaldehyde, 4-hydroxy-  
 Sim.: 793, RevSim.: 850, Prob.: 29.94 Formula: C7H6O2  
 MW: 122 CAS No: 123-08-0  
 Entry #: 13235 of REPLIB  
 NIST No: 229910 Other Databases: Fine TSCA RTECS EPA HODOC NIH EINECS IR



Anexo 31



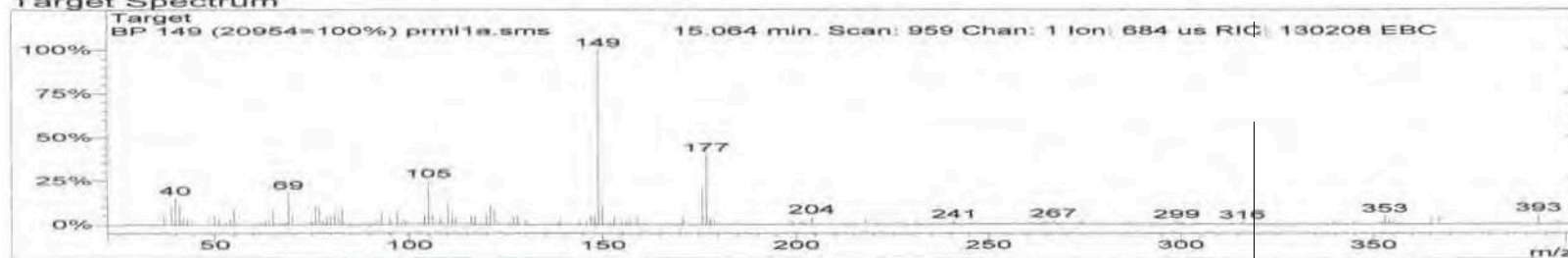
### NIST Target Spectrum Search Hit List

NIST Target Spectrum Search Results  
 Hits Found: 100

NIST Target Spectrum Search Parameters  
 Search Mode: Normal (Forward)  
 Min Ion: 1  
 Min Intensity: 1  
 Constraints:  
   MW Range: 1 - 8000  
   Name Fragment: ---  
   Elements in Compound: ---  
   Element Counts: ---  
   Peaks: ---  
   Other Databases: ---  
 Requested Pre-Search: 6000  
 Requested Final Search: 100  
 Search 2 Libraries: A. mainlib B. replib

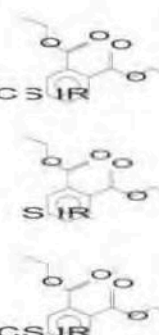
## Huella del Ftalato de dietilo (83, n=1), identificada por GC-MS

#### Target Spectrum



Spectrum from c:\saturnws\data\ames\muestras\prml1a.sms  
 Scan No: 959, Time: 15.064 minutes  
 No averaging. Background corrected (E).  
 Comment: 15.064 min. Scan: 959 Chan: 1 Ion: 684 us RIC: 130208 EBC  
 Pair Count: 157 MW: 0 Formula: None CAS No: None Acquired Range: 20 - 400

- 1  
 Diethyl Phthalate  
 Sim.: 526, RevSim.: 878, Prob.: 58.74 Formula: C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>  
 MW: 222 CAS No: 84-66-2  
 Entry #: 15629 of REPLIB  
 NIST No: 114975 Other Databases: Fine TSCA RTECS EPA USP HODOC NIH EINECS IR
- 2  
 Diethyl Phthalate  
 Sim.: 505, RevSim.: 757, Prob.: 58.74 Formula: C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>  
 MW: 222 CAS No: 84-66-2  
 Entry #: 15631 of REPLIB  
 NIST No: 155450 Other Databases: Fine TSCA RTECS EPA USP
- 3  
 Diethyl Phthalate  
 Sim.: 498, RevSim.: 752, Prob.: 58.74 Formula: C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>  
 MW: 222 CAS No: 84-66-2  
 Entry #: 67077 of MAINLIB  
 NIST No: 227685 Other Databases: Fine TSCA RTECS EPA USP HODOC NIH EINECS IR



Anexo 32



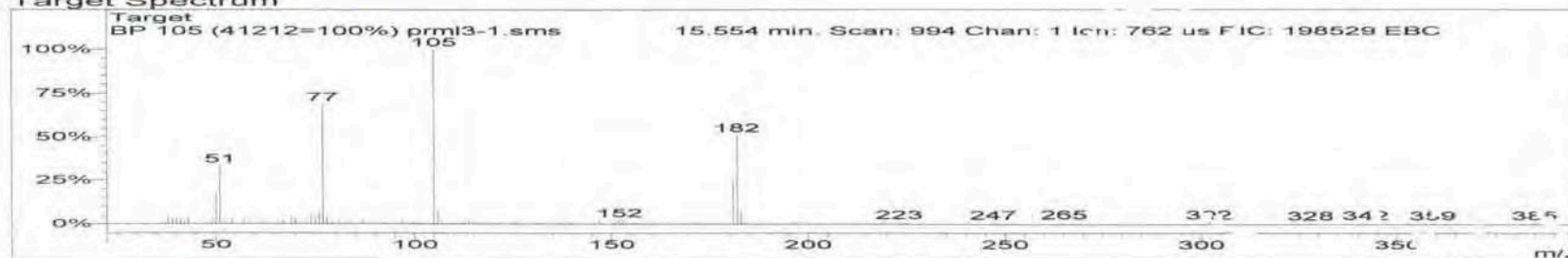
## NIST Target Spectrum Search Hit List

NIST Target Spectrum Search Results  
Hits Found: 100

NIST Target Spectrum Search Parameters  
Search Mode: Normal (Forward)  
Min Ion: 1  
Min Intensity: 1  
Constraints  
MW Range: 1 - 8000  
Name Fragment: ---  
Elements in Compound: ---  
Element Counts: ---  
Peaks: ---  
Other Databases: ---  
Requested Pre-Search: 6000  
Requested Final Search: 100  
Search 2 Libraries: A. mainlib  
B. replib

## Huella de la Benzofenona (79), identificada por GC-MS

### Target Spectrum



Spectrum from c:\saturnws\data\fames\muestras\prml3-1.sms

Scan No: 994, Time: 15.554 minutes

No averaging. Background corrected (E).

Comment: 15.554 min. Scan: 994 Chan: 1 Ion: 762 us RIC: 198529 EBC

Pair Count: 182 MW: 0 Formula: None CAS No: None Acquired Range: 20 - 400

1

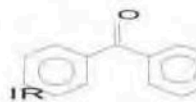
Benzophenone

Sim.: 701, RevSim.: 863, Prob.: 64.06 Formula: C<sub>13</sub>H<sub>10</sub>O

MW: 182 CAS No: 119-61-9

Entry #: 46089 of MAINLIB

NIST No: 118652 Other Databases: Fine TSCA RTECS EPA HODOC NIH EINECS IR



2

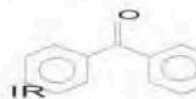
Benzophenone

Sim.: 685, RevSim.: 844, Prob.: 64.06 Formula: C<sub>13</sub>H<sub>10</sub>O

MW: 182 CAS No: 119-61-9

Entry #: 11497 of REPLIB

NIST No: 228289 Other Databases: Fine TSCA RTECS EPA HODOC NIH EINECS IR



3

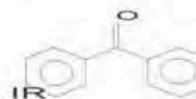
Benzophenone

Sim.: 685, RevSim.: 814, Prob.: 64.06 Formula: C<sub>13</sub>H<sub>10</sub>O

MW: 182 CAS No: 119-61-9

Entry #: 11166 of REPLIB

NIST No: 226272 Other Databases: Fine TSCA RTECS EPA HODOC NIH EINECS IR



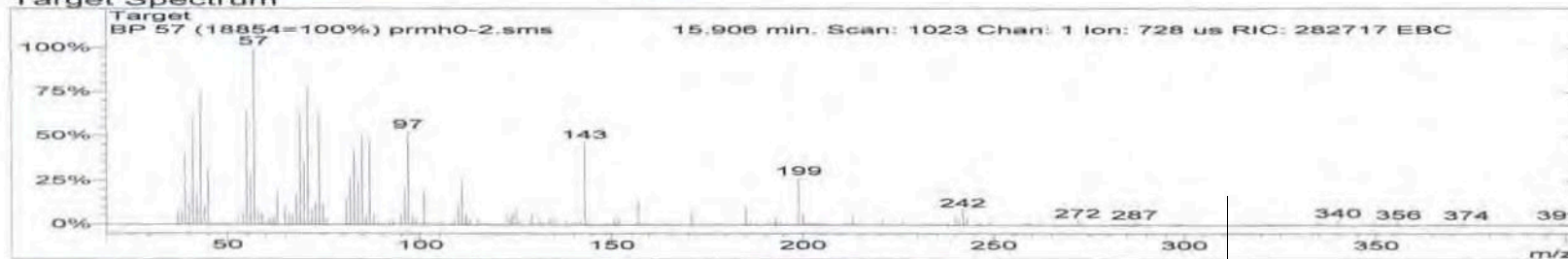
### NIST Target Spectrum Search Hit List

NIST Target Spectrum Search Results  
 Hits Found: 100

NIST Target Spectrum Search Parameters  
 Search Mode: Normal (Forward)  
 Min Ion: 1  
 Min Intensity: 1  
 Constraints:  
 MW Range: 1 - 8000  
 Name Fragment: ---  
 Elements in Compound: ---  
 Element Counts: ---  
 Peaks: ---  
 Other Databases: ---  
 Requested Pre-Search: 6000  
 Requested Final Search: 100  
 Search 2 Libraries: A. mainlib B. replib

**Huella del Ácido pentadecanoico (44, n=13),  
 identificado por GC-MS**

#### Target Spectrum



Spectrum from c:\saturnws\data\fames\muestras\prmh0-2.sms  
 Scan No: 1023, Time: 15.906 minutes  
 No averaging. Background corrected (E).  
 Comment: 15.906 min. Scan: 1023 Chan: 1 Ion: 728 us RIC: 282717 EBC  
 Pair Count: 183 MW: 0 Formula: None CAS No: None Acquired Range: 20 - 400

- 1  
 Pentadecanoic acid  
 Sim.: 649, RevSim.: 717, Prob.: 47.66 Formula: C<sub>15</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub>  
 MW: 242 CAS No: 1002-84-2  
 Entry #: 1406 of REPLIB  
 NIST No: 130842 Other Databases: Fine TSCA RTECS HOPOC NIH EINECS IR
- 2  
 Pentadecanoic acid  
 Sim.: 640, RevSim.: 711, Prob.: 47.66 Formula: C<sub>15</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub>  
 MW: 242 CAS No: 1002-84-2  
 Entry #: 7010 of REPLIB  
 NIST No: 221146 Other Databases: Fine TSCA RTECS HOPOC NIH EINECS IR
- 3  
 Pentadecanoic acid  
 Sim.: 606, RevSim.: 668, Prob.: 47.66 Formula: C<sub>15</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub>  
 MW: 242 CAS No: 1002-84-2  
 Entry #: 6591 of MAINLIB  
 NIST No: 63741 Other Databases: Fine TSCA RTECS HOPOC NIH EINECS IR

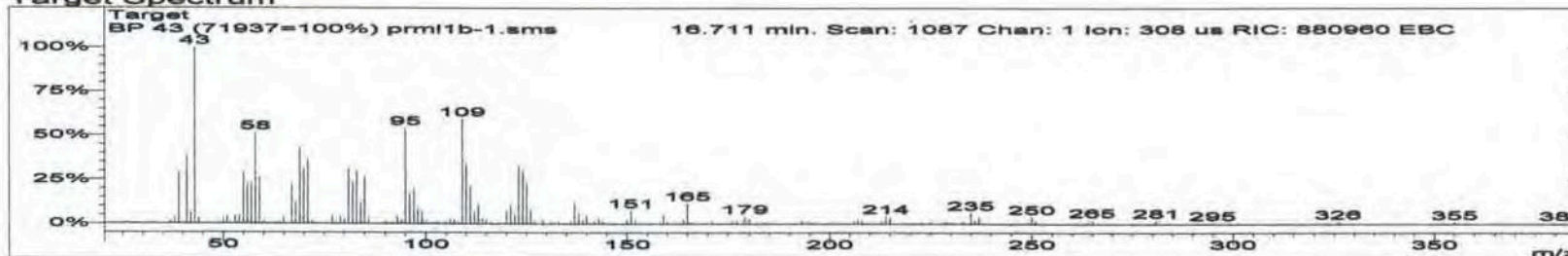
### NIST Target Spectrum Search Hit List

NIST Target Spectrum Search Results  
 Hits Found: 100

NIST Target Spectrum Search Parameters  
 Search Mode: Normal (Forward)  
 Min Ion: 1  
 Min Intensity: 1  
 Constraints:  
 MW Range: 1 - 8000  
 Name Fragment: ---  
 Elements in Compound: ---  
 Element Counts: ---  
 Peaks: ---  
 Other Databases: ---  
 Requested Pre-Search: 6000  
 Requested Final Search: 100  
 Search 2 Libraries: A. mainlib  
 B. replib

Huella del 6,10,14-Trimetil-2-pentadecanona (77,  
 sesterterpeno degradado), identificado por GC-  
 MS

#### Target Spectrum



Spectrum from c:\saturnws\data\fames\muestras\prml1b-1.sms  
 Scan No: 1087, Time: 16.711 minutes  
 No averaging. Background corrected (E).  
 Comment: 16.711 min. Scan: 1087 Chan: 1 Ion: 308 us RIC: 880960 EBC  
 Pair Count: 198 MW: 0 Formula: None CAS No: None Acquired Range: 20 - 400

- 1  
 2-Pentadecanone, 6,10,14-trimethyl-  
 Sim.: 725, RevSim.: 775, Prob.: 47.66 Formula: C<sub>18</sub>H<sub>36</sub>O  
 MW: 268 CAS No: 502-69-2  
 Entry #: 4966 of REPLIB  
 NIST No: 161346 Other Databases: TSCA EINECS
- 2  
 2-Pentadecanone, 6,10,14-trimethyl-  
 Sim.: 710, RevSim.: 810, Prob.: 47.66 Formula: C<sub>18</sub>H<sub>36</sub>O  
 MW: 268 CAS No: 502-69-2  
 Entry #: 5795 of MAINLIB  
 NIST No: 12976 Other Databases: TSCA EINECS
- 3  
 2-Pentadecanone, 6,10,14-trimethyl-  
 Sim.: 685, RevSim.: 840, Prob.: 47.66 Formula: C<sub>18</sub>H<sub>36</sub>O  
 MW: 268 CAS No: 502-69-2  
 Entry #: 1858 of REPLIB  
 NIST No: 34110 Other Databases: TSCA EINECS



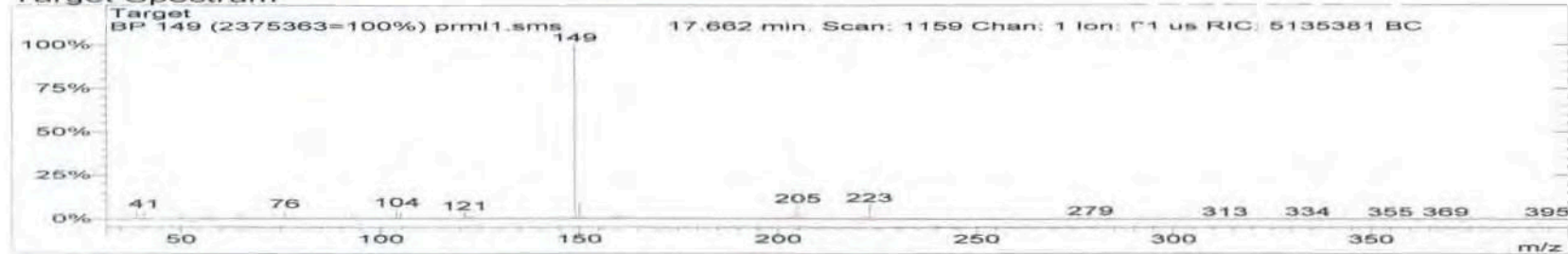
## NIST Target Spectrum Search Hit List

NIST Target Spectrum Search Results  
Hits Found: 100

NIST Target Spectrum Search Parameters  
Search Mode: Normal (Forward)  
Min Ion: 1  
Min Intensity: 1  
Constraints:  
MW Range: 1 - 8000  
Name Fragment: ---  
Elements in Compound: ---  
Element Counts: ---  
Peaks: ---  
Other Databases: ---  
Requested Pre-Search: 6000  
Requested Final Search: 100  
Search 2 Libraries:  
A: mainlib  
B: replib

**Huella del Ftalato de dibutilo (83, n=3),  
identificada por GC-MS**

### Target Spectrum



Spectrum from c:\saturnws\data\fames\muestras\prml1.sms

Scan No: 1159, Time: 17.662 minutes

No averaging. Background corrected.

Comment: 17.662 min. Scan: 1159 Chan: 1 Ion: 91 us RIC: 5135381 BC

Pair Count: 184 MW: 0 Formula: None CAS No: None Acquired Range: 20 - 400

1

Dibutyl phthalate

Sim.: 871, RevSim.: 945, Prob.: 51.83 Formula: C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>O<sub>4</sub>

MW: 278 CAS No: 84-74-2

Entry #: 66999 of MAINLIB

NIST No: 114974 Other Databases: Fine TSCA RTECS EPA HODOC NIH EINECS IR

2

Dibutyl phthalate

Sim.: 851, RevSim.: 937, Prob.: 51.83 Formula: C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>O<sub>4</sub>

MW: 278 CAS No: 84-74-2

Entry #: 15546 of REPLIB

NIST No: 23125 Other Databases: Fine TSCA RTECS EPA HODOC NIH EINECS IR

3

Dibutyl phthalate

Sim.: 850, RevSim.: 906, Prob.: 51.83 Formula: C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>O<sub>4</sub>

MW: 278 CAS No: 84-74-2

Entry #: 15599 of REPLIB

NIST No: 70664 Other Databases: Fine TSCA RTECS EPA HODOC NIH EINECS IR



Anexo 36

### NIST Target Spectrum Search Hit List

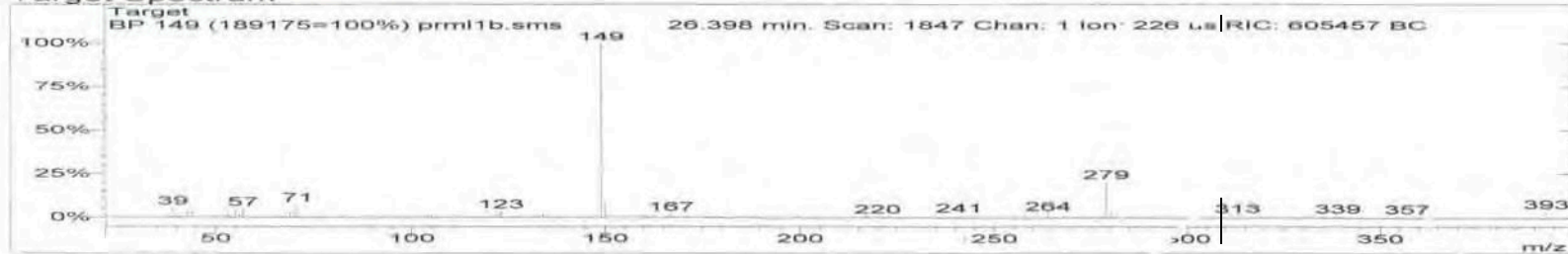
NIST Target Spectrum Search Results  
Hits Found: 100

NIST Target Spectrum Search Parameters




Search Mode	Normal (Forward)
Min Ion:	1
Min Intensity:	1
Constraints	
MW Range:	1 - 8000
Name Fragment:	---
Elements in Compound:	---
Element Counts:	---
Peaks:	---
Other Databases:	---
Requested Pre-Search:	6000
Requested Final Search:	100
Search 2 Libraries:	A. mainlib B. replib

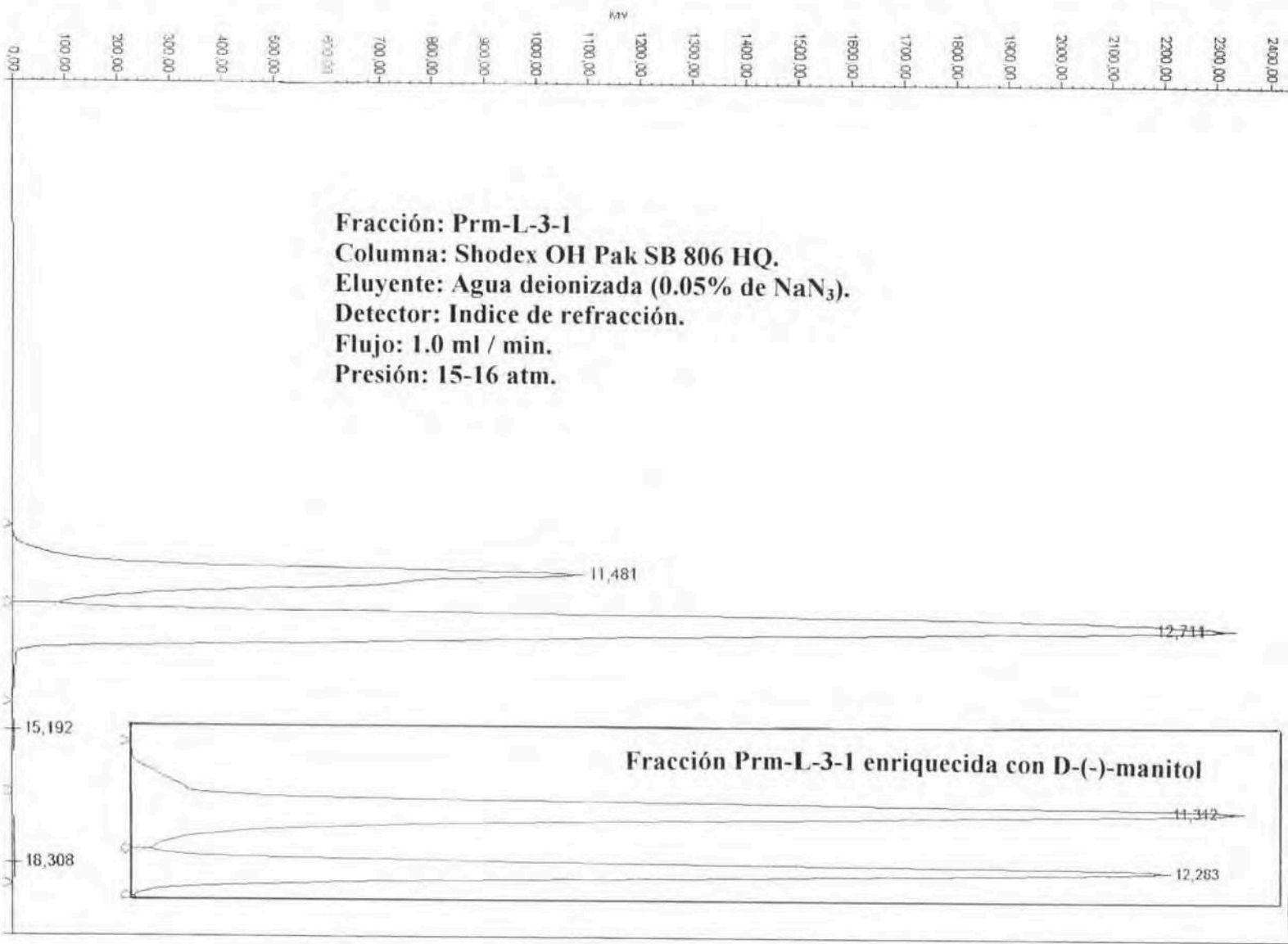
## Huella del Ftalato de dioctilo (83, n=7), identificada por GC-MS

#### Target Spectrum



Spectrum from c:\saturnws\data\fames\muestras\prml1b.sms  
 Scan No: 1847, Time: 26.398 minutes  
 No averaging. Background corrected.  
 Comment: 26.398 min. Scan: 1847 Chan: 1 Ion: 226 us RIC: 605457 BC  
 Pair Count: 215 MW: 0 Formula: None CAS No: None Acquired Range: 20 - 400

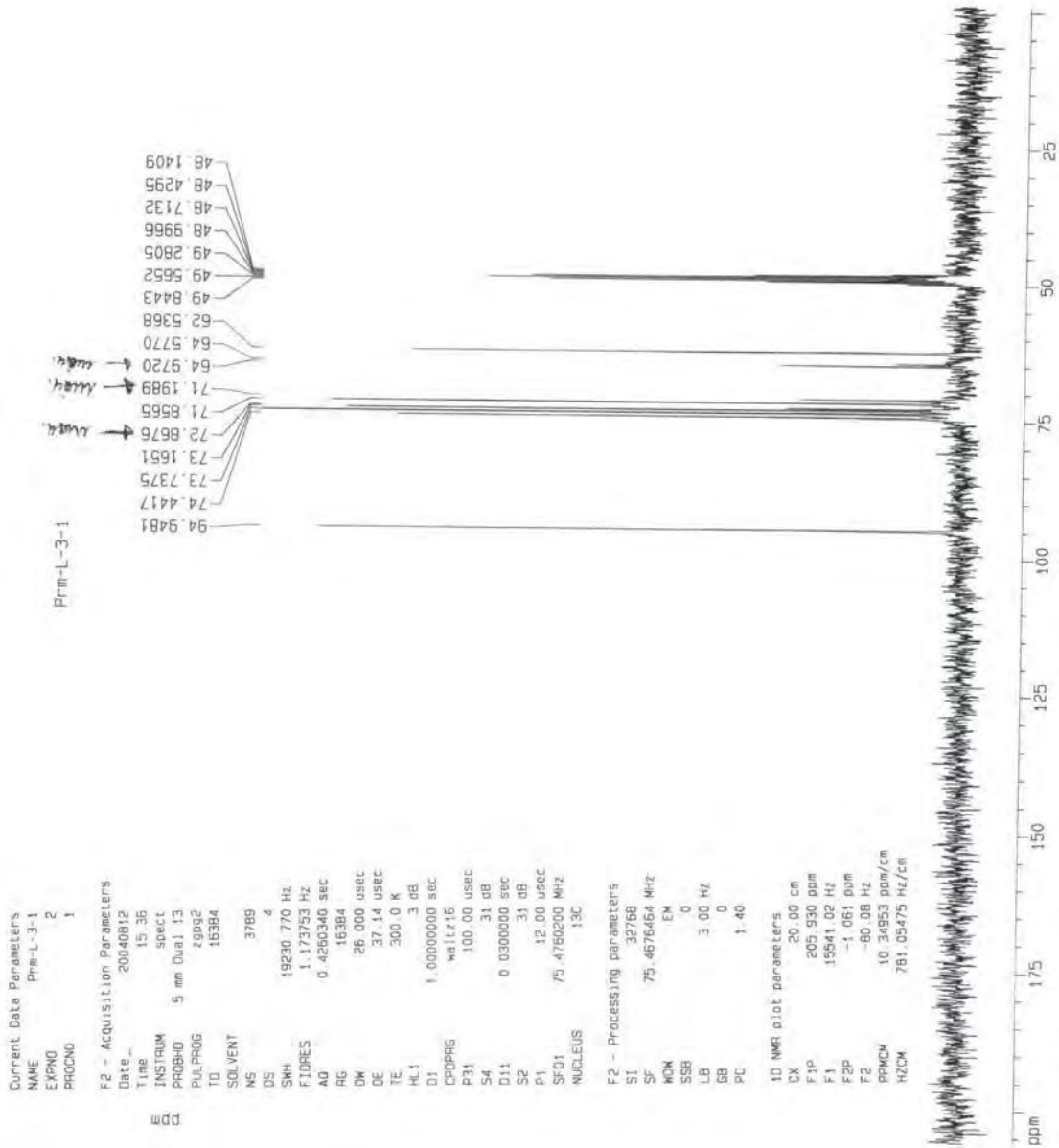
- 1  
Di-n-octyl phthalate  
Sim.: 611, RevSim.: 858, Prob.: 55.20 Formula: C<sub>24</sub>H<sub>38</sub>O<sub>4</sub>  
MW: 390 CAS No: 117-84-0  
Entry #: 66743 of MAINLIB  
NIST No: 114979 Other Databases: Fine TSCA RTECS EPA HODOC NIH EIN. S IR 
- 2  
Di-n-octyl phthalate  
Sim.: 597, RevSim.: 837, Prob.: 55.20 Formula: C<sub>24</sub>H<sub>38</sub>O<sub>4</sub>  
MW: 390 CAS No: 117-84-0  
Entry #: 15639 of REPLIB  
NIST No: 132985 Other Databases: Fine TSCA RTECS EPA HODOC NIH EINECS IR 
- 3  
Di-n-octyl phthalate  
Sim.: 590, RevSim.: 822, Prob.: 55.20 Formula: C<sub>24</sub>H<sub>38</sub>O<sub>4</sub>  
MW: 390 CAS No: 117-84-0  
Entry #: 15640 of REPLIB  
NIST No: 160686 Other Databases: Fine TSCA RTECS EPA HODOC NIH EINECS IR 



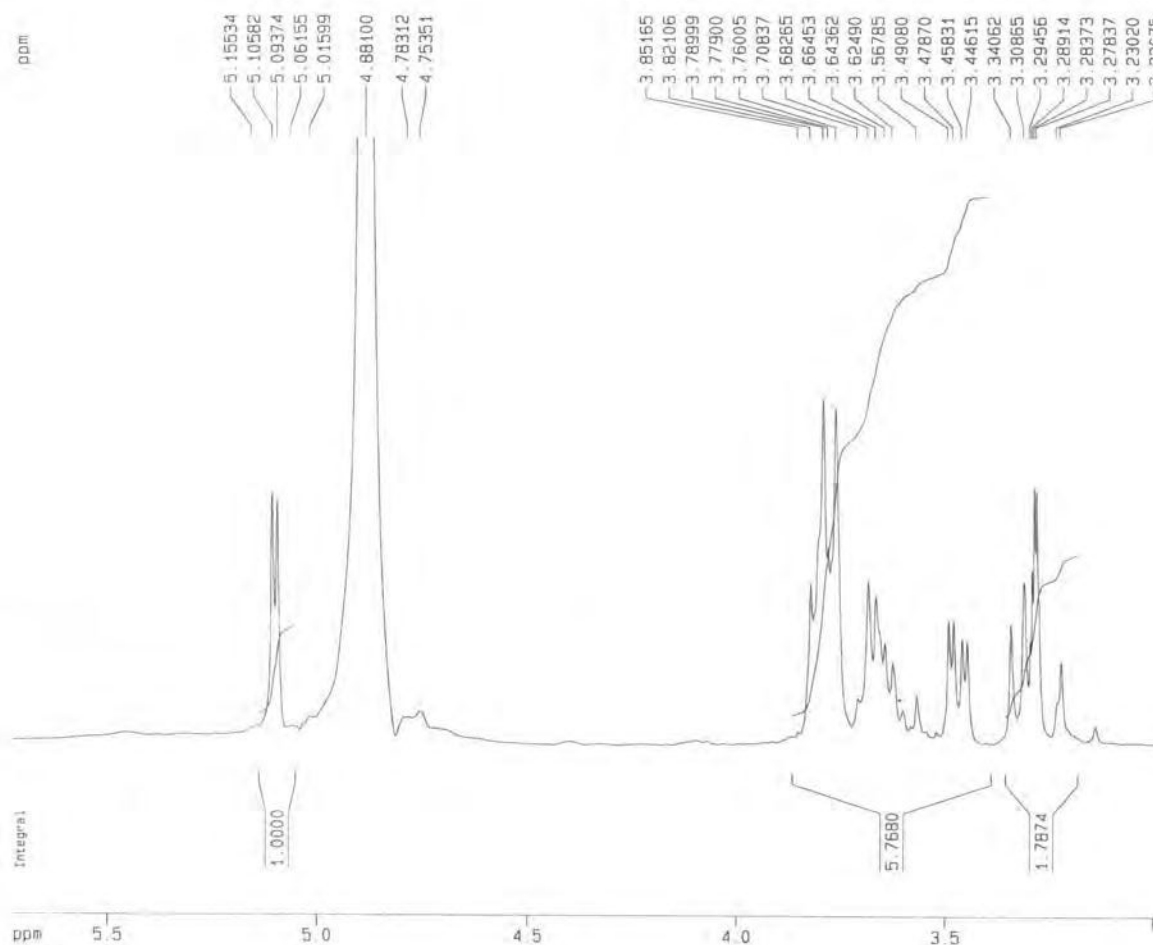
Anexo 38

Anexo 39

Espectro de  $^{13}\text{C}$ -NMR de la 2-Deoxi-2-fosfami-  
 $\alpha$ -D-glucopiranososa (92) impurificada por manitol  
 (89).



## Espectro de <sup>1</sup>H-NMR de la 2-Deoxi-2-fosfamina- α-D-glucopiranososa (92) impurificada por manitol (89).



Current Data Parameters  
 NAME Pfm-L-3-1  
 EXPNO 1  
 PRUNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
 Date\_ 20040812  
 Time 15.31  
 INSTAUM spect  
 PROBHD 5 mm Dual 13  
 PULPROG zg30  
 TO 65536  
 SOLVENT MeOH  
 NS 16  
 DS 2  
 SWH 6250.000 Hz  
 FIDRES 0.095367 Hz  
 AQ 5.2429299 sec  
 RG 128  
 DW 80.000 usec  
 DE 114.29 usec  
 E 300.0 K  
 HL 7 dB  
 DI 0.0000000 sec  
 P1 10.00 usec  
 SF01 300.1318534 MHz  
 NUCLEUS 1H

F2 - Processing parameters  
 SI 32768  
 SF 300.1300128 MHz  
 WDW EM  
 SSJ 0  
 LB 0.30 Hz  
 GB 0  
 PC 1.00

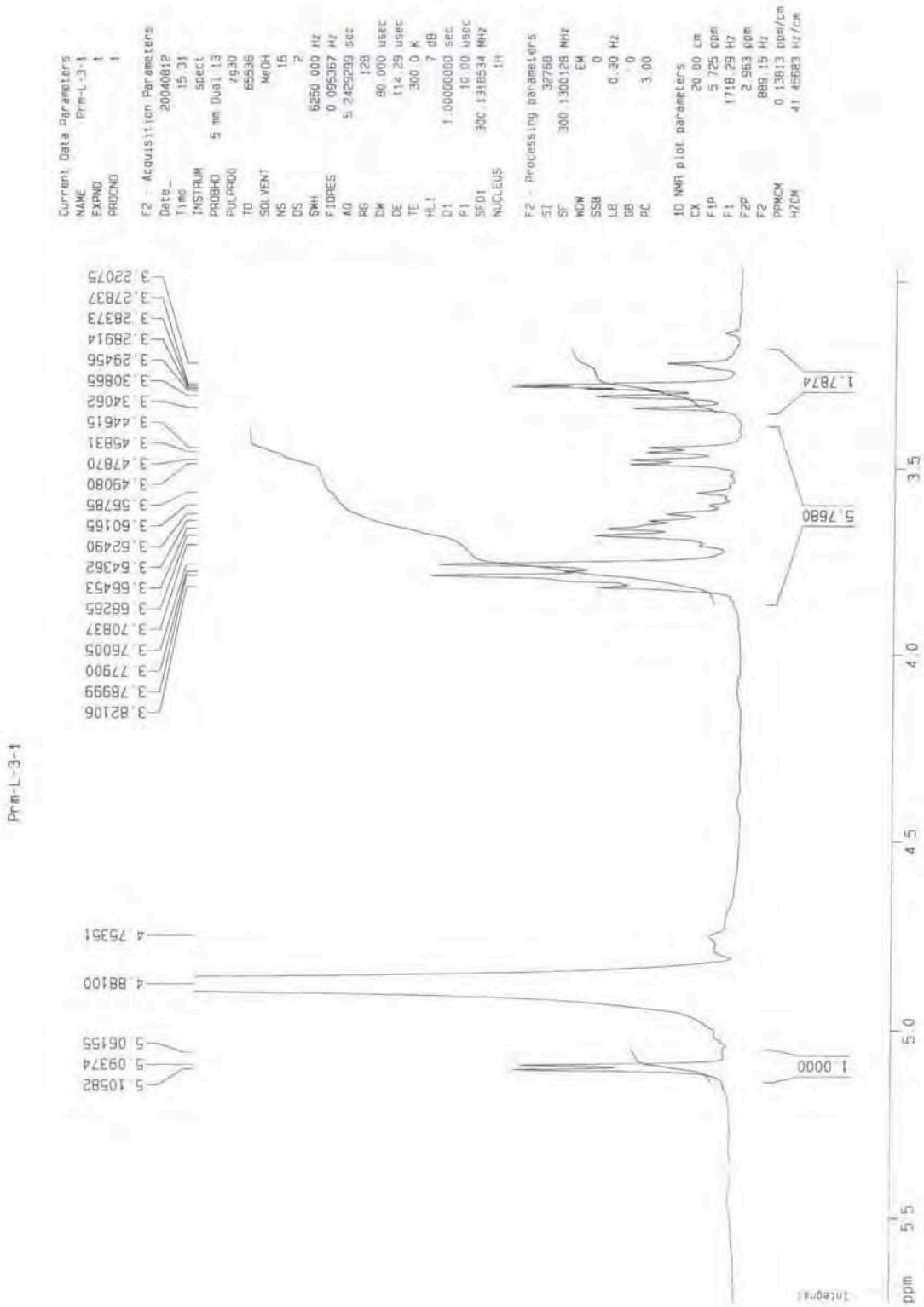
1D NMR plot parameters  
 CX 20.00 cm  
 F1P 5.725 ppm  
 F1 1716.29 Hz  
 F2P 2.963 ppm  
 F2 889.15 Hz  
 PPMCM 0.13813 ppm/cm  
 HZCM 41.45683 Hz/cm

Anexo 40



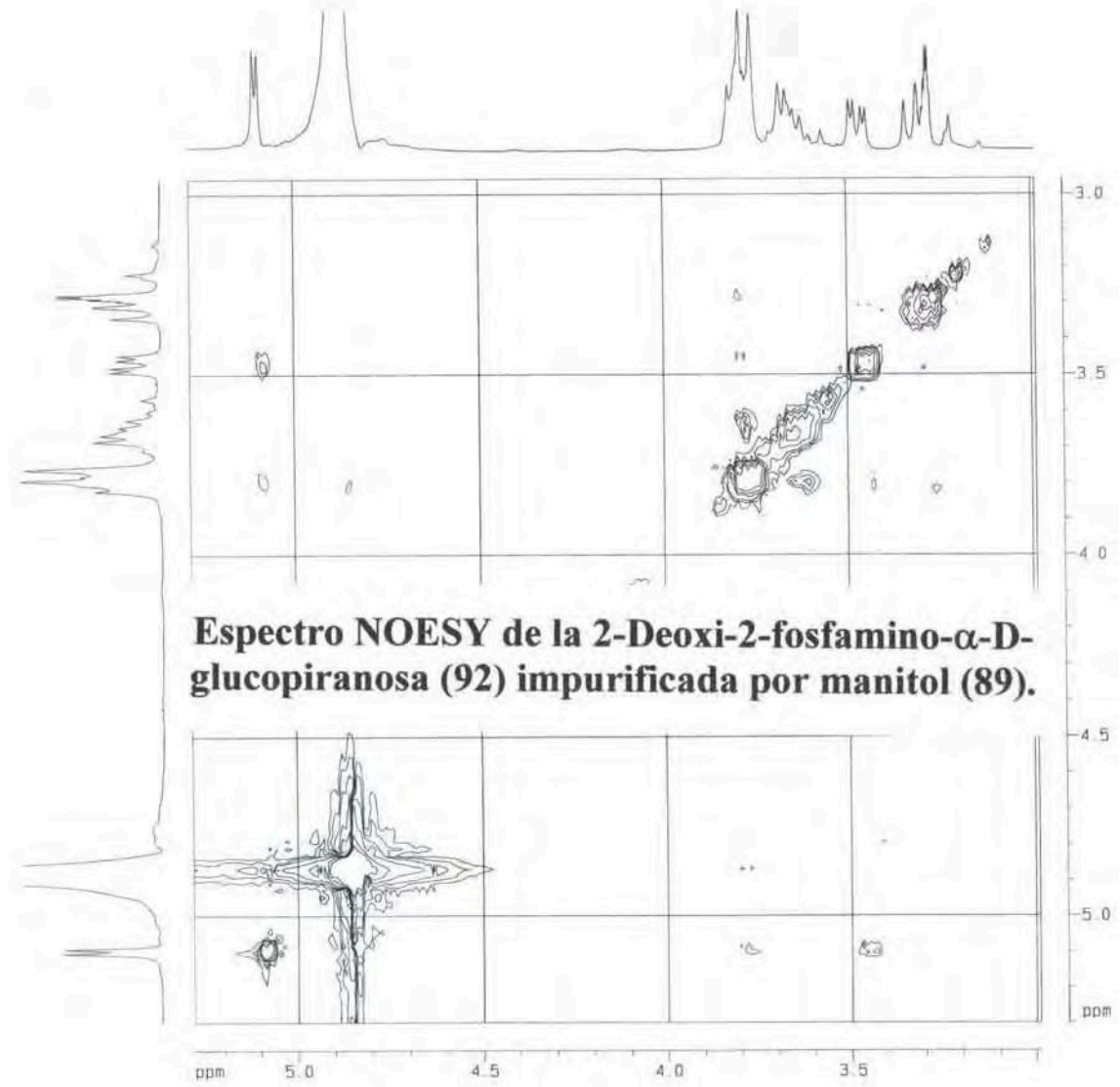
Anexo 41

**Espectro de <sup>1</sup>H-NMR de la 2-Deoxi-2-fosfamina- $\alpha$ -D-glucopiranososa (92) impurificada por manitol (89).**









**Espectro NOESY de la 2-Deoxi-2-fosfamina- $\alpha$ -D-glucopiranososa (92) impurificada por manitol (89).**

Prm-L-3-1

Current Gate Parameters  
Prm-L-3-1

NAME	Prm-L-3-1
EXPNO	5
PROCNO	1

F2 Acquisition Parameters

Date_	20040812
Time	22:31
INSTRUM	spect
PROBHD	5 mm Dual 1H
PULPROG	noesytp
TD	1024
SF	300.131577 MHz
WDW	SINE
SSB	2
LB	0.00 Hz
GB	0
PC	1.40

F1 Acquisition Parameters

NUC1	13C
NUC2	1H
INSTRUM	spect
PROBHD	5 mm Dual 1H
PULPROG	zgpg30
TD	1024
SF	125.761180 MHz
WDW	SINE
SSB	2
LB	0.00 Hz
GB	0
PC	1.40

F2 Processing parameters

SI	1024
SF	300.130177 MHz
WDW	SINE
SSB	2
LB	0.00 Hz
GB	0
PC	1.40

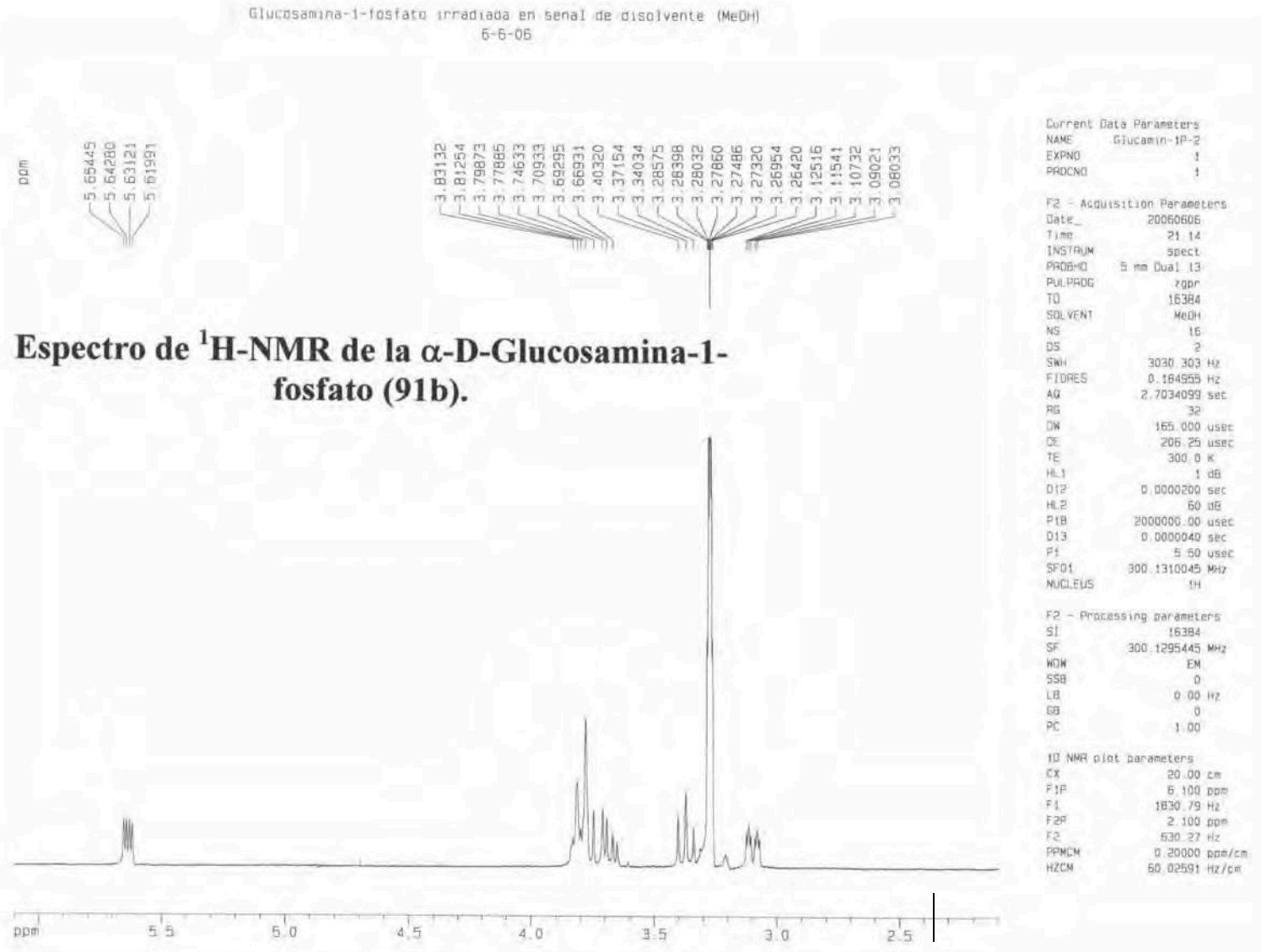
F1 Processing parameters

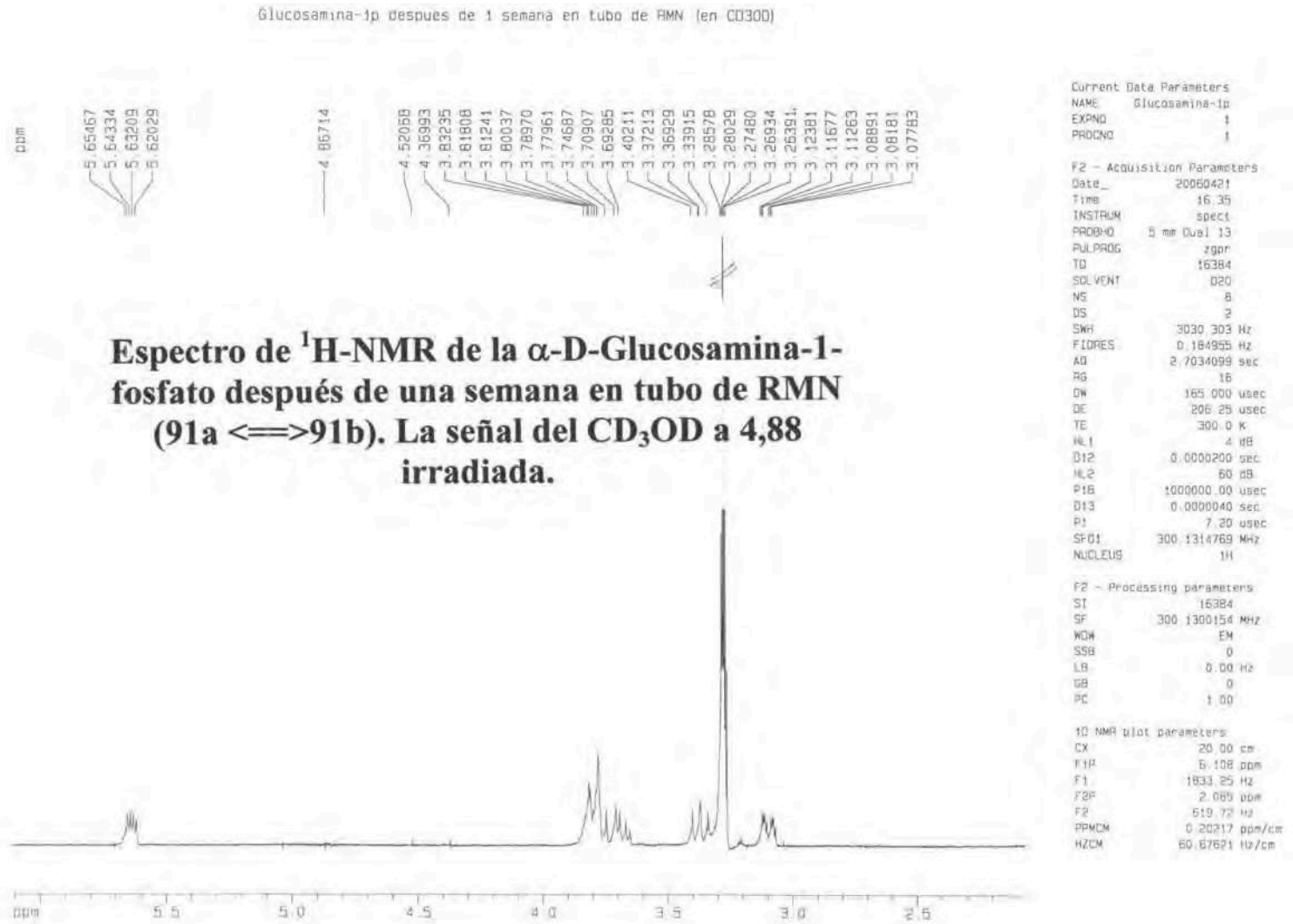
SI	512
MC2	1PP1
SF	300.130177 MHz
WDW	SINE
SSB	2
LB	0.00 Hz
GB	0

90 MHz 13C parameters

CK1	15.00 cm
CK2	15.00 cm
F2PUL	5.262 ppm
F2PC	1000.00 Hz
F2PUL	2.500 ppm
F2PC	1000.00 Hz
F1PUL	5.300 ppm
F1PC	1500.00 Hz
F1PUL	2.950 ppm
F1PC	1000.00 Hz
F2PUL	0.15260 ppm/cm
F2PC	45.00000 Hz/cm
F1PUL	0.15260 ppm/cm
F1PC	45.00000 Hz/cm

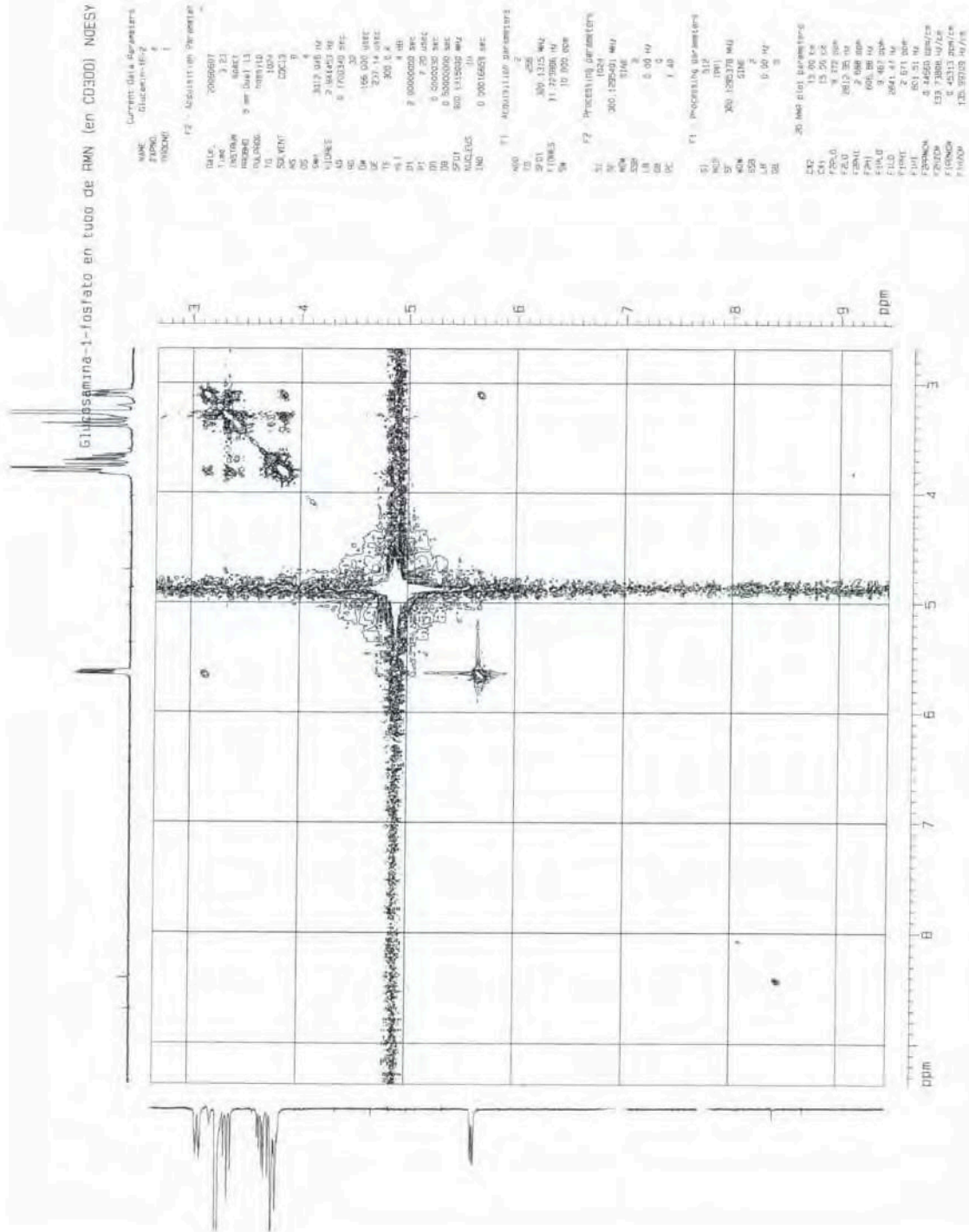
Anexo 44





Anexo 47

**Espectro NOESY de la  $\alpha$ -D-Glucosamina-1-fosfato (91b).**



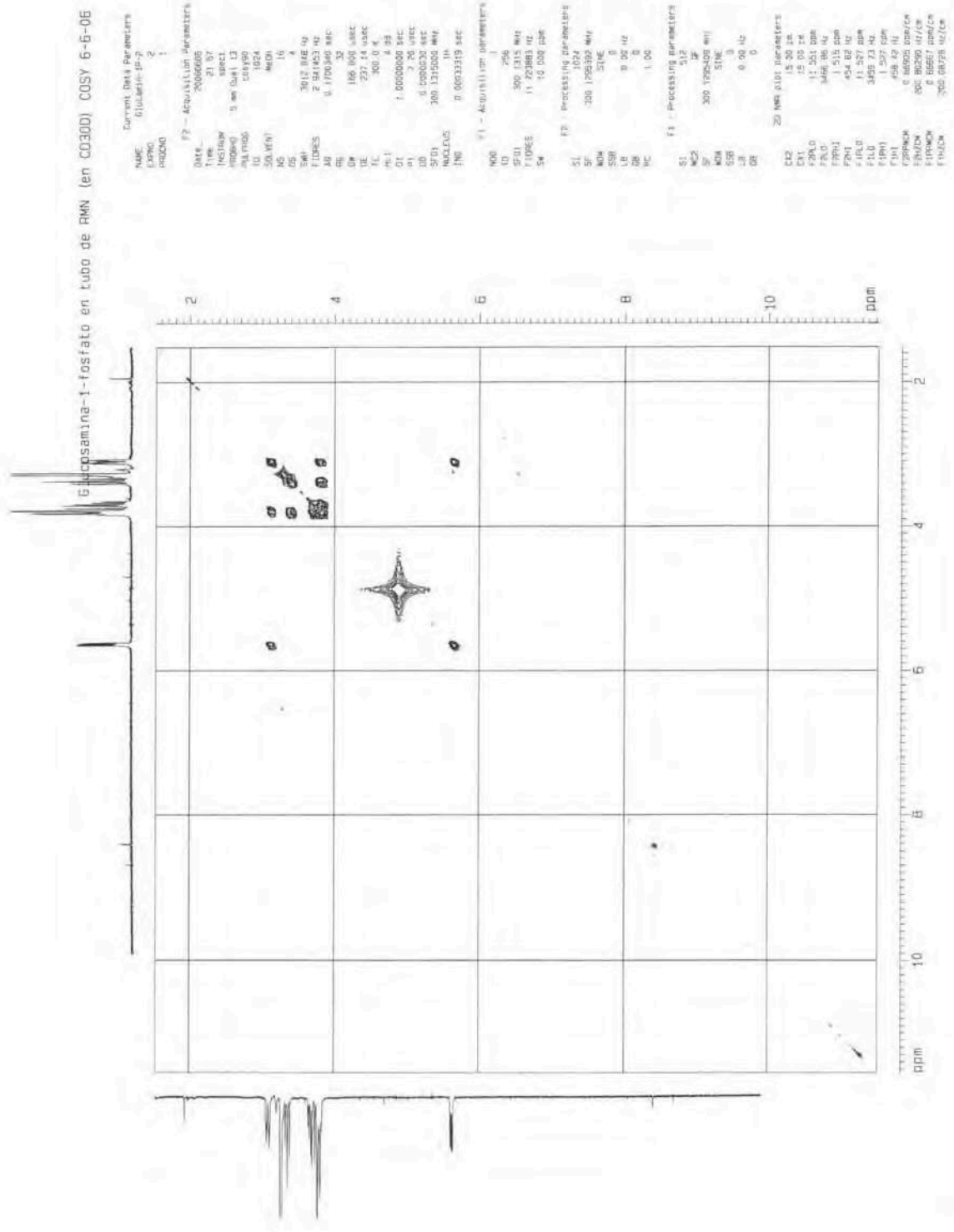






Anexo 49

Espectro COSY de la  $\alpha$ -D-Glucosamina-1-fosfato (91b).



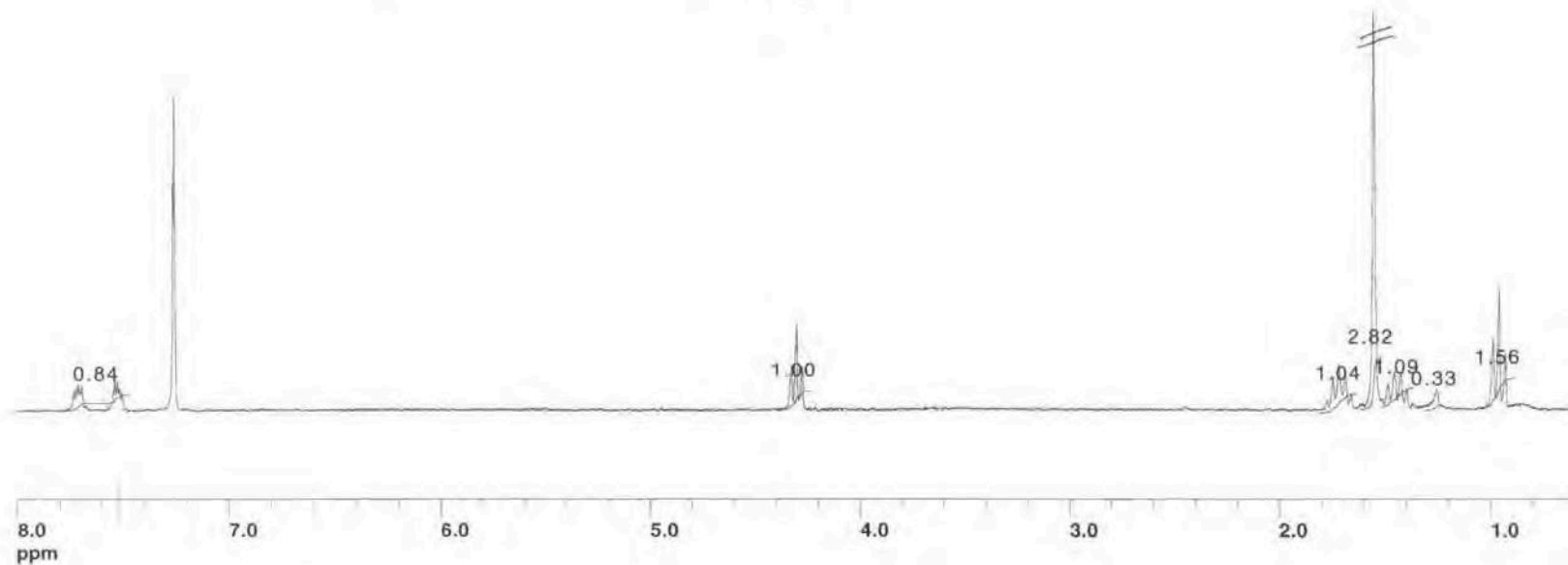
No. Points 16384  
No. Scans 16  
Dummy Scans 0  
Scan Count 16  
SW +/- 2500.0  
Filter 2400  
Acq. Time 3.277s  
Dwell 200u  
Obs Freq 250.1340000  
Obs base 250.1300000  
O1 offset 4.0000 KHz  
dcplfreq 250.1340000  
O2 offset 4.0000 KHz  
RCVR gain 640  
DEC Mode OFF  
DEC Attn. 58

H1 script run at: Monday, October 29, 2001 4:54:44 pm  
Macintosh HD:MacNMR 5.3-AC250:data:marcel:ROBERTO:Prb2003FD-1H-CDCI3

File created:  
Monday, October 29, 2001  
4:54 pm

#	Start ppm	Stop ppm	Integral
1	7.78	7.47	0.84
2	4.39	4.23	1.00
3	1.81	1.63	1.04
4	1.61	1.51	2.82
5	1.52	1.36	1.09
6	1.31	1.21	0.33
7	1.04	0.88	1.56

### Espectro de <sup>1</sup>H-NMR del Ftalato de dibutilo (83, n=3)



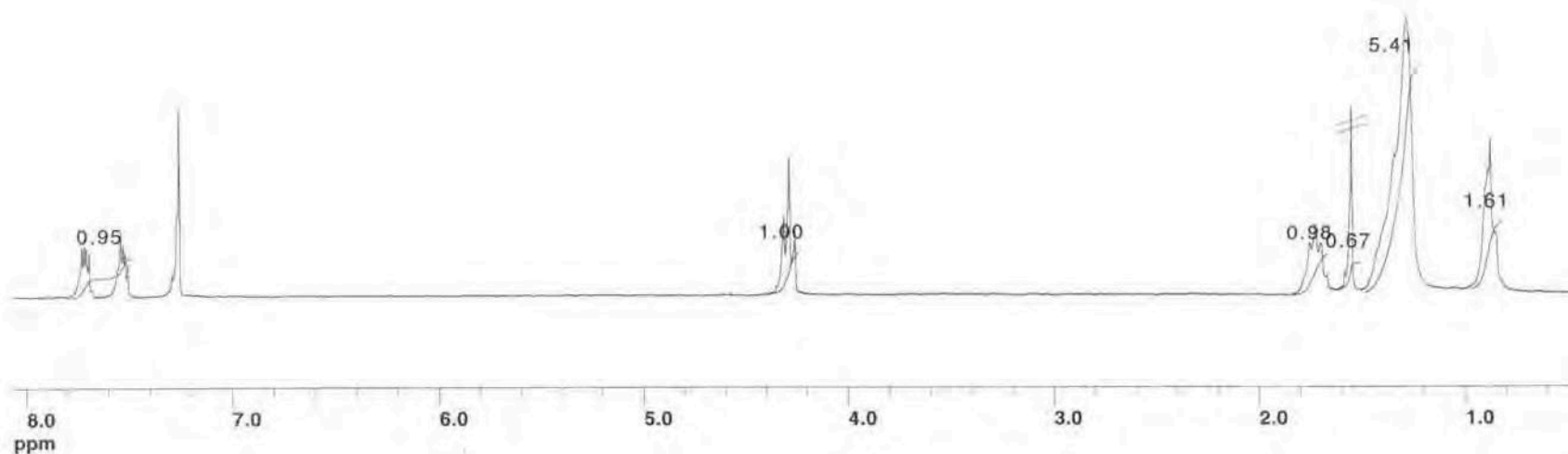
No. Points 16384  
No. Scans 16  
Dummy Scans 0  
Scan Count 16  
SW +/- 2500.0  
Filter 2400  
Acq. Time 3.277s  
Dwell 200u  
Obs Freq 250.1340000  
Obs base 250.1300000  
O1 offset 4.0000 KHz  
dcplfreq 250.1340000  
O2 offset 4.0000 KHz  
RCVR gain 100  
DEC Mode OFF  
DEC Attn. 58

H1 script run at: Thursday, November 1, 2001 8:23:43 pm  
Macintosh HD:MacNMR 5.3-AC250:data:marcel:ROBERTO:Prb2002FH-1H-CDCI3

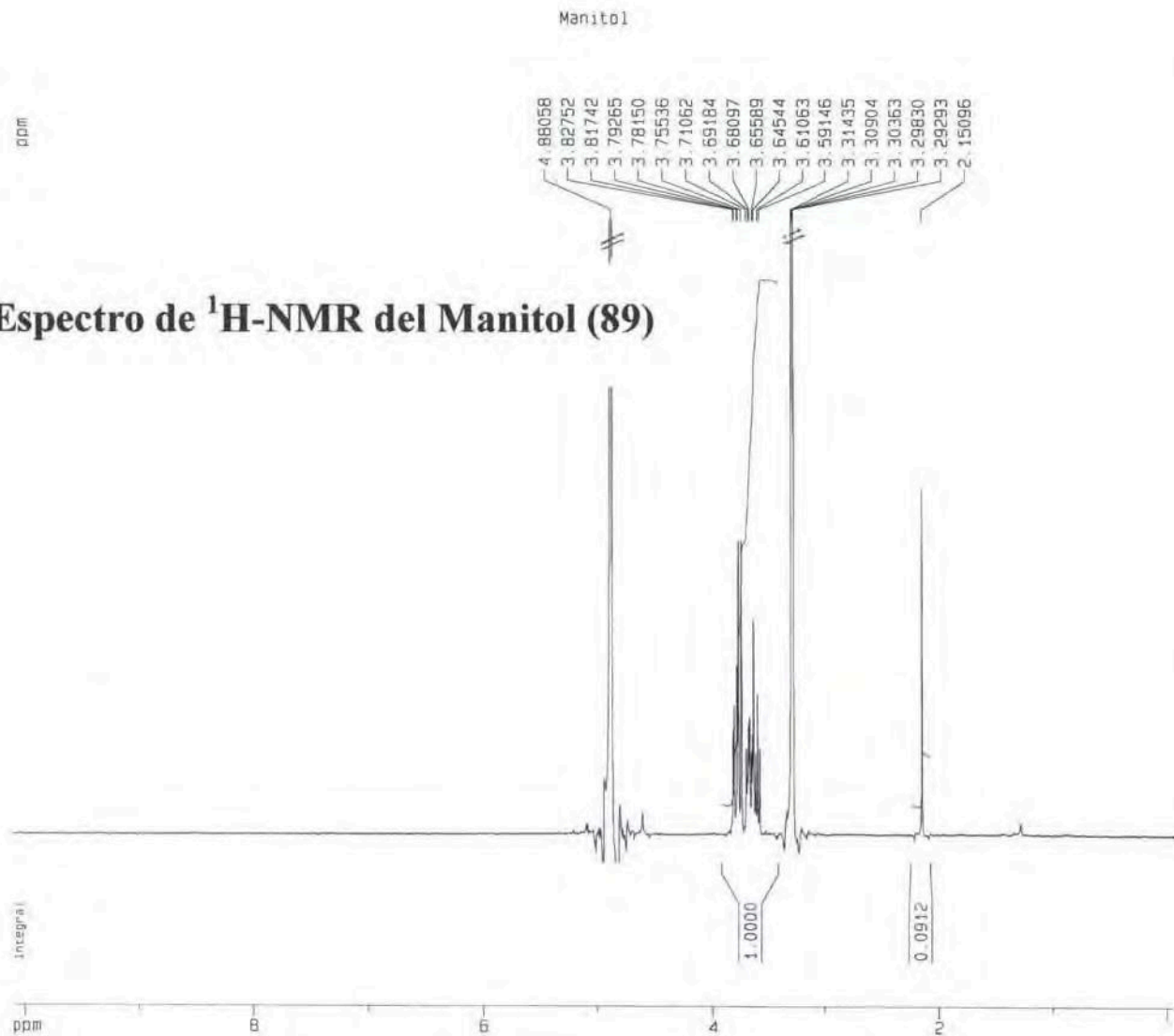
#	Start ppm	Stop ppm	Integral
1	7.80	7.47	0.95
2	4.41	4.23	1.00
3	1.83	1.66	0.98
4	1.61	1.49	0.67
5	1.48	1.20	5.41
6	0.96	0.81	1.61

File created:  
Thursday, November 1, 2001  
8:24 pm

### Espectro de <sup>1</sup>H-NMR del Ftalato de dinonilo (83, n=8)



# Espectro de <sup>1</sup>H-NMR del Manitol (89)

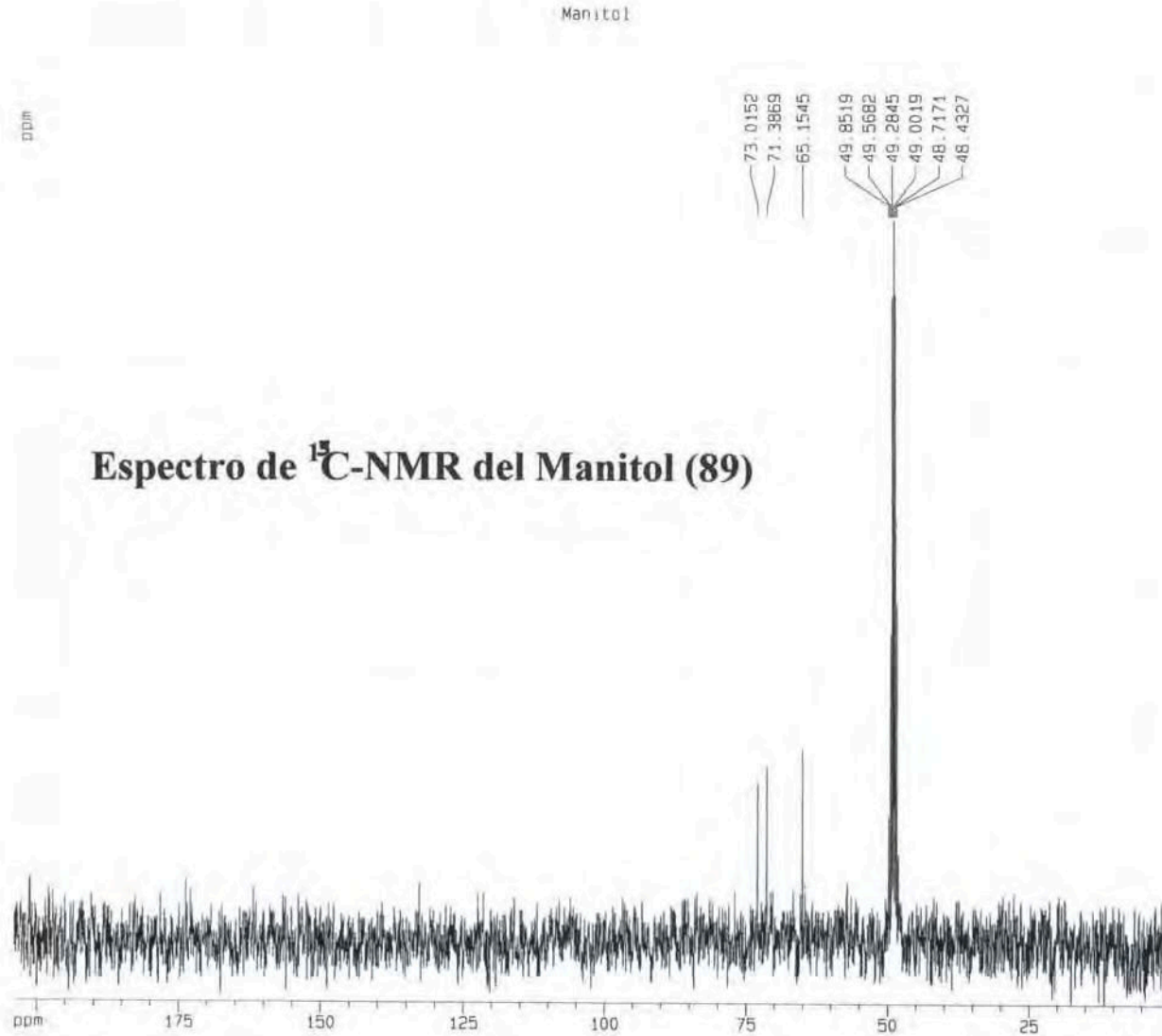


Current Data Parameters  
 NAME Manitol  
 EXPNO 1  
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
 Date\_ 20040810  
 Time 13.22  
 INSTRUM spect  
 PROBHD 5 mm Dual 13  
 PULPROG zg30  
 TD 65536  
 SOLVENT MeOH  
 NS 16  
 DS 2  
 SWH 6250.000 Hz  
 FIDRES 0.095367 Hz  
 AQ 5.2429299 sec  
 RG 1024  
 DW 80.000 usec  
 DE 114.29 usec  
 TE 300.0 K  
 HL1 7 dB  
 D1 1.00000000 sec  
 P1 10.00 usec  
 SFO1 300.1318534 MHz  
 NUCLEUS 1H

F2 - Processing parameters  
 SI 32768  
 SF 300.1300069 MHz  
 WDW EM  
 SSB 0  
 LB 0.30 Hz  
 GB 0  
 PC 1.00

1D NMR plot parameters  
 CX 20.00 cm  
 F1P 10.117 ppm  
 F1 3036.56 Hz  
 F2P -0.081 ppm  
 F2 -24.39 Hz  
 PPMCM 0.50994 ppm/cm  
 HZCM 153.04747 Hz/cm

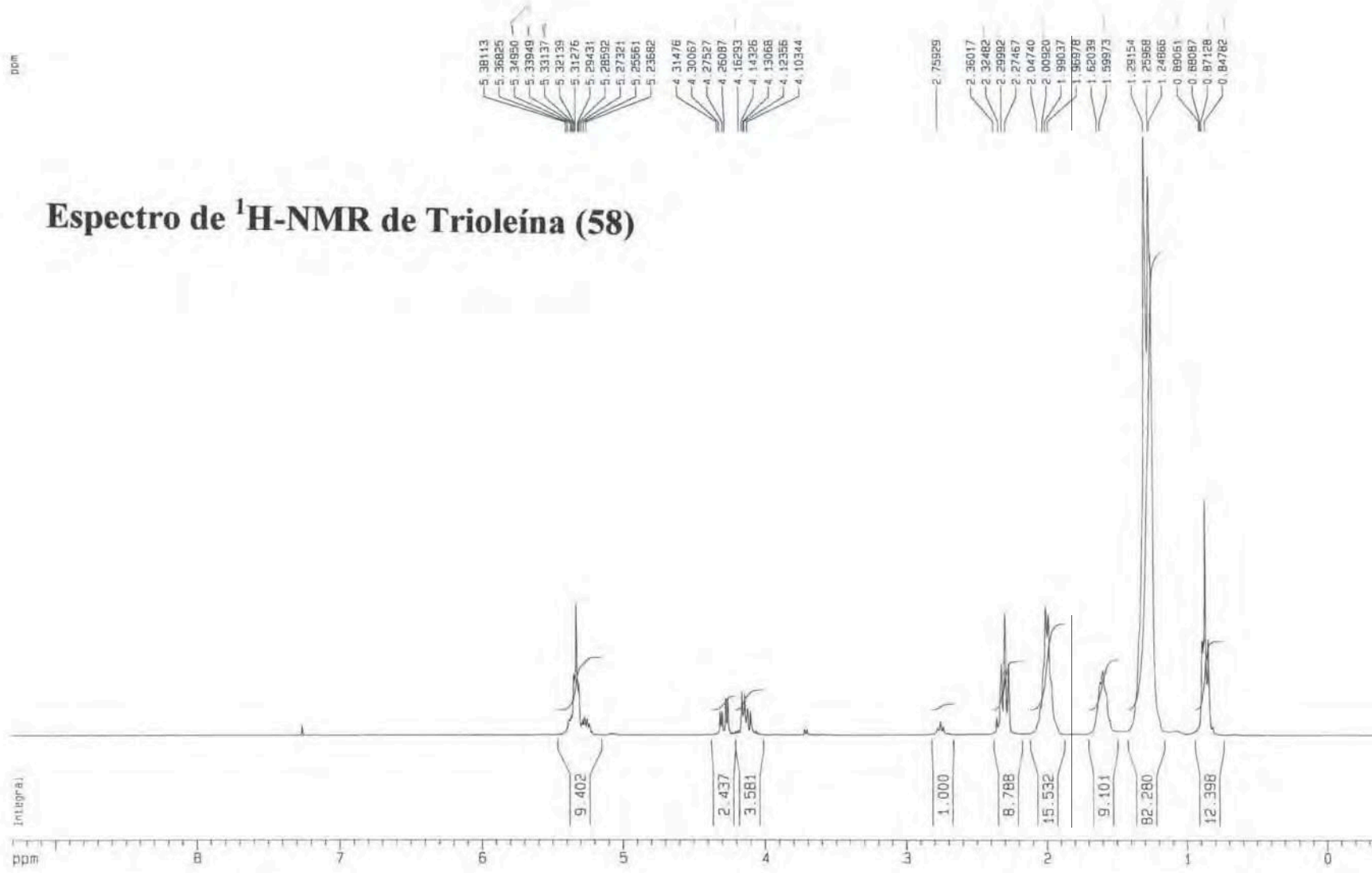


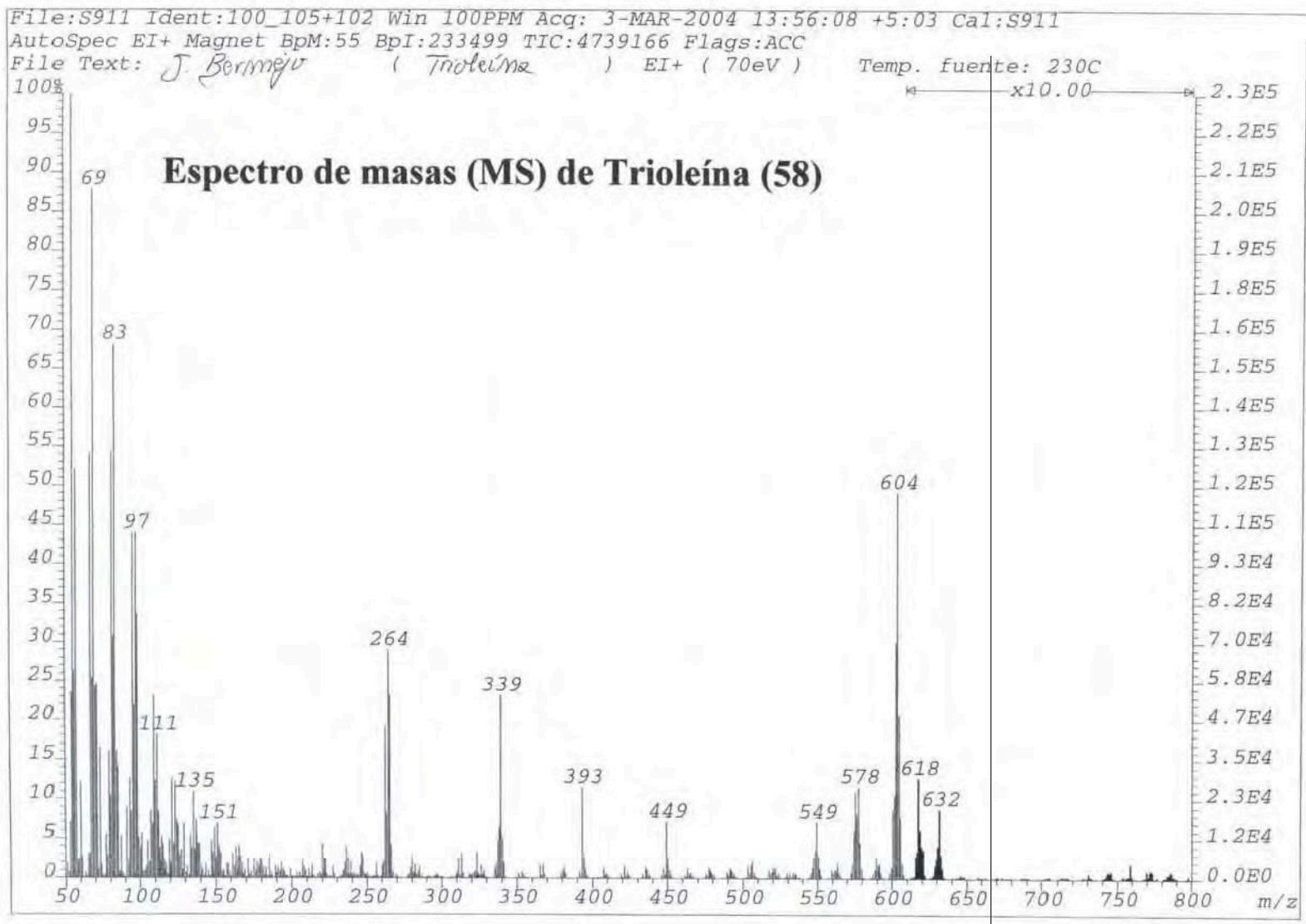
Current Data Parameters  
 NAME Manitol  
 EXPNO 2  
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
 Date\_ 20040810  
 Time 13.27  
 INSTRUM spect  
 PROBHD 5 mm Dual 13  
 PULPROG zgpg2  
 TD 16384  
 SOLVENT ~~60619-6~~ CD<sub>3</sub>OD  
 NS 7949  
 DS 4  
 SWH 19230.770 Hz  
 FIDRES 1.173753 Hz  
 AQ 0.4260340 sec  
 RG 16384  
 DW 26.000 usec  
 DE 37.14 usec  
 TE 300.0 K  
 HL1 3.00  
 D1 1.0000000 sec  
 CPDPRG waltz16  
 P31 100.00 usec  
 S4 31.00 dB  
 D11 0.0300000 sec  
 S2 31.00 dB  
 P1 12.00 usec  
 SF01 75.4760200 MHz  
 NUCLEUS 13C

F2 - Processing parameters  
 SI 32768  
 SF 75.4676423 MHz  
 WDM EM  
 SSB 0  
 LB 3.00 Hz  
 GB 0  
 PC 1.40

1D NMR plot parameters  
 CX 20.00 cm  
 F1F 204.060 ppm  
 F1 15399.91 Hz  
 F2F -0.732 ppm  
 F2 -95.22 Hz  
 PPMCM 10.23958 ppm/cm  
 HZCM 772.75665 Hz/cm

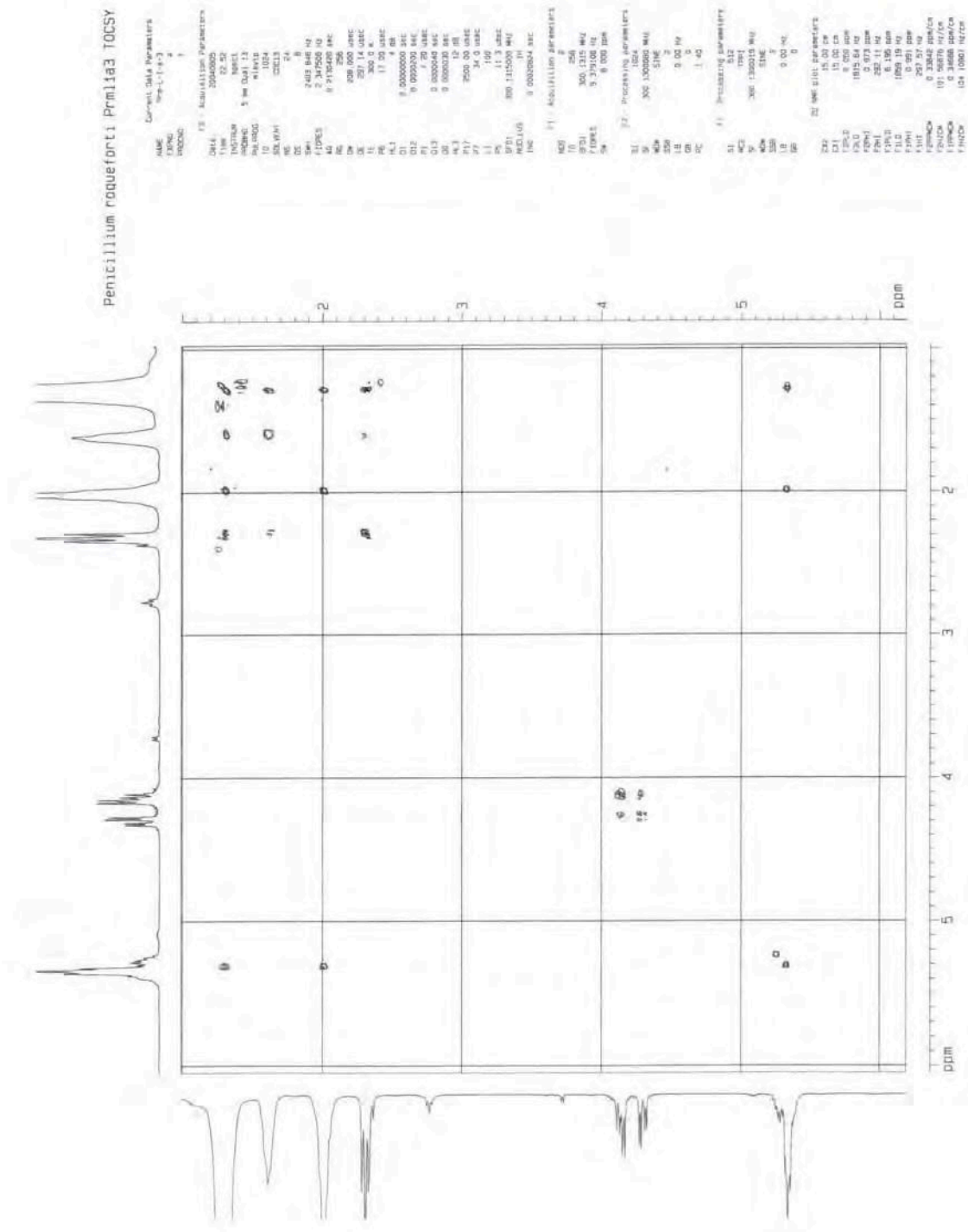




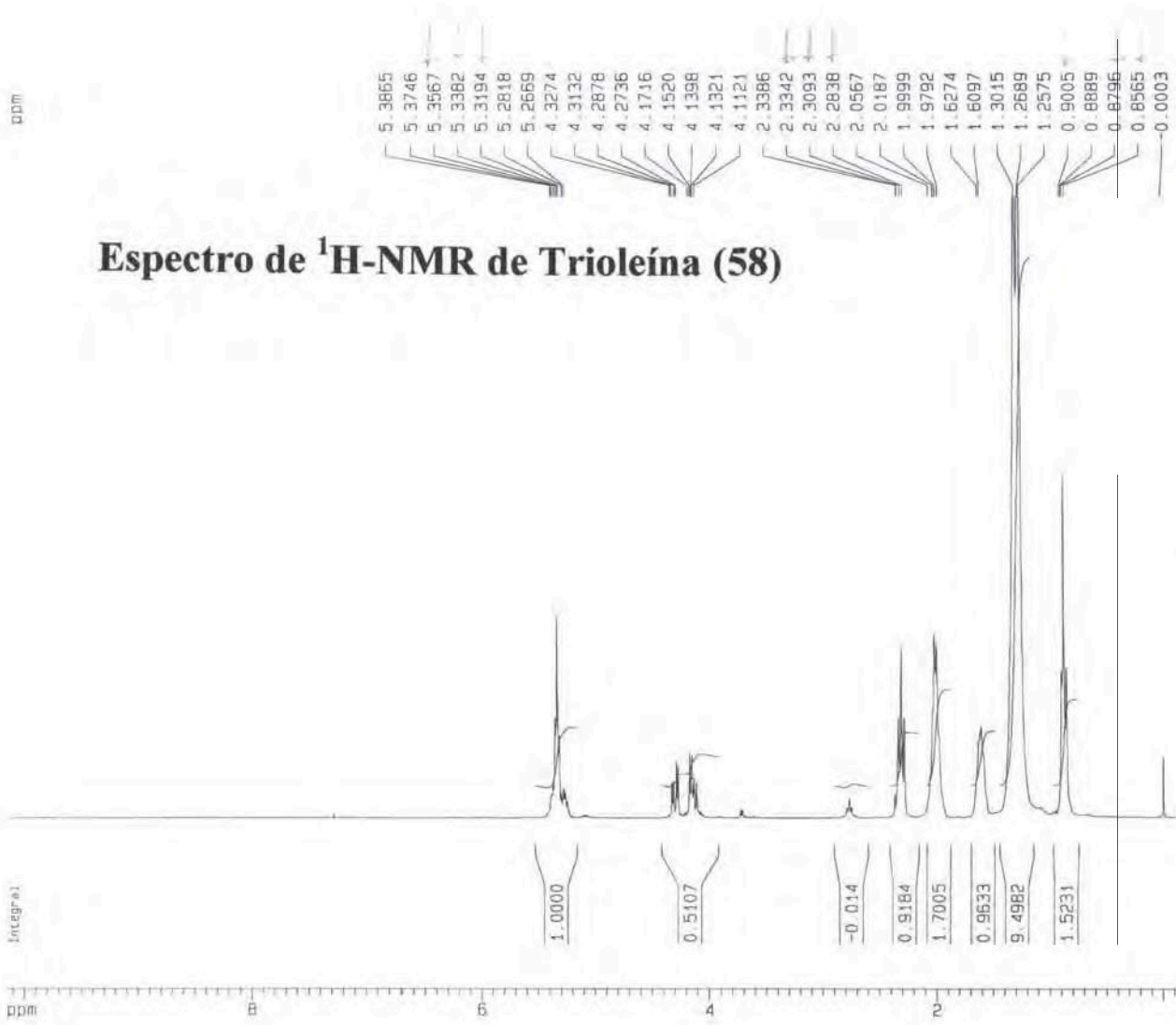


Anexo 56

Espectro TOCSY de Trioleína (58)







### Espectro de <sup>1</sup>H-NMR de Trioleína (58)

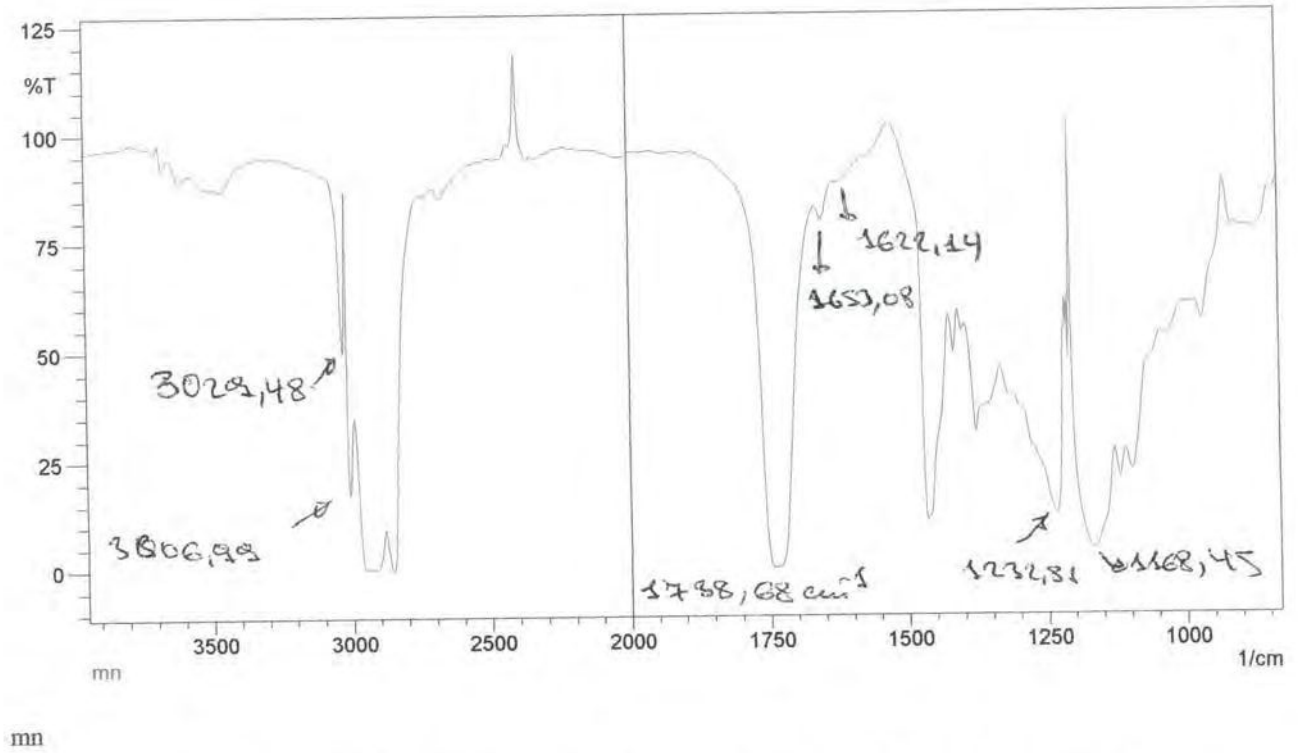
Current Data Parameters  
 NAME Prm-L-1-a-3  
 EXPNO 1  
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
 Date\_ 20040806  
 Time 11.08  
 INSTRUM spect  
 PROBHD 5 mm Dual 13  
 PULPROG zg30  
 TD 65536  
 SOLVENT CDCl3  
 NS 16  
 DS 2  
 SWH 6250.000 Hz  
 FIDRES 0.095367 Hz  
 AQ 5.2429299 sec  
 RG 16  
 DW 80.000 usec  
 DE 114.29 usec  
 TE 300.0 K  
 HL1 4 dB  
 O1 1.00000000 sec  
 P1 7.20 usec  
 SF01 300.1318534 MHz  
 NUCLEUS 1H

F2 - Processing parameters  
 SI 32768  
 SF 300.1299993 MHz  
 WDW EM  
 SSB 0  
 LB 0.30 Hz  
 GB 0  
 PC 1.00

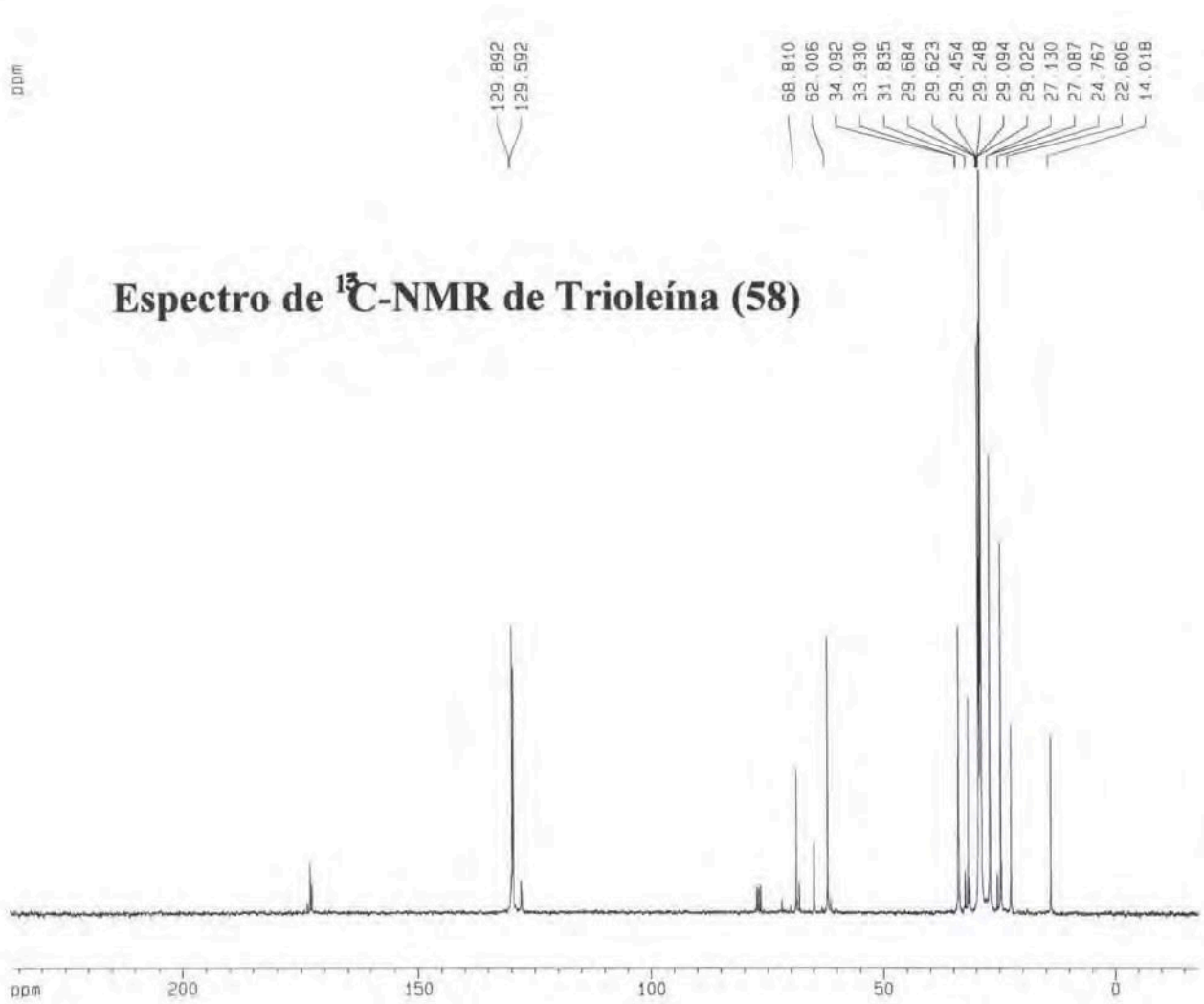
10 NMR plot parameters  
 CX 20.00 cm  
 F1P 10.154 ppm  
 F1 3047.57 Hz  
 F2P -0.120 ppm  
 F2 -36.04 Hz  
 PPMCM 0.51371 ppm/cm  
 HZCM 154.18047 Hz/cm.

Anexo 58



**Espectro de infrarrojos (IR) de Trioleína (58)**

Penicillium roqueforti Prm-L-1-a-3



### Espectro de <sup>13</sup>C-NMR de Trioleína (58)

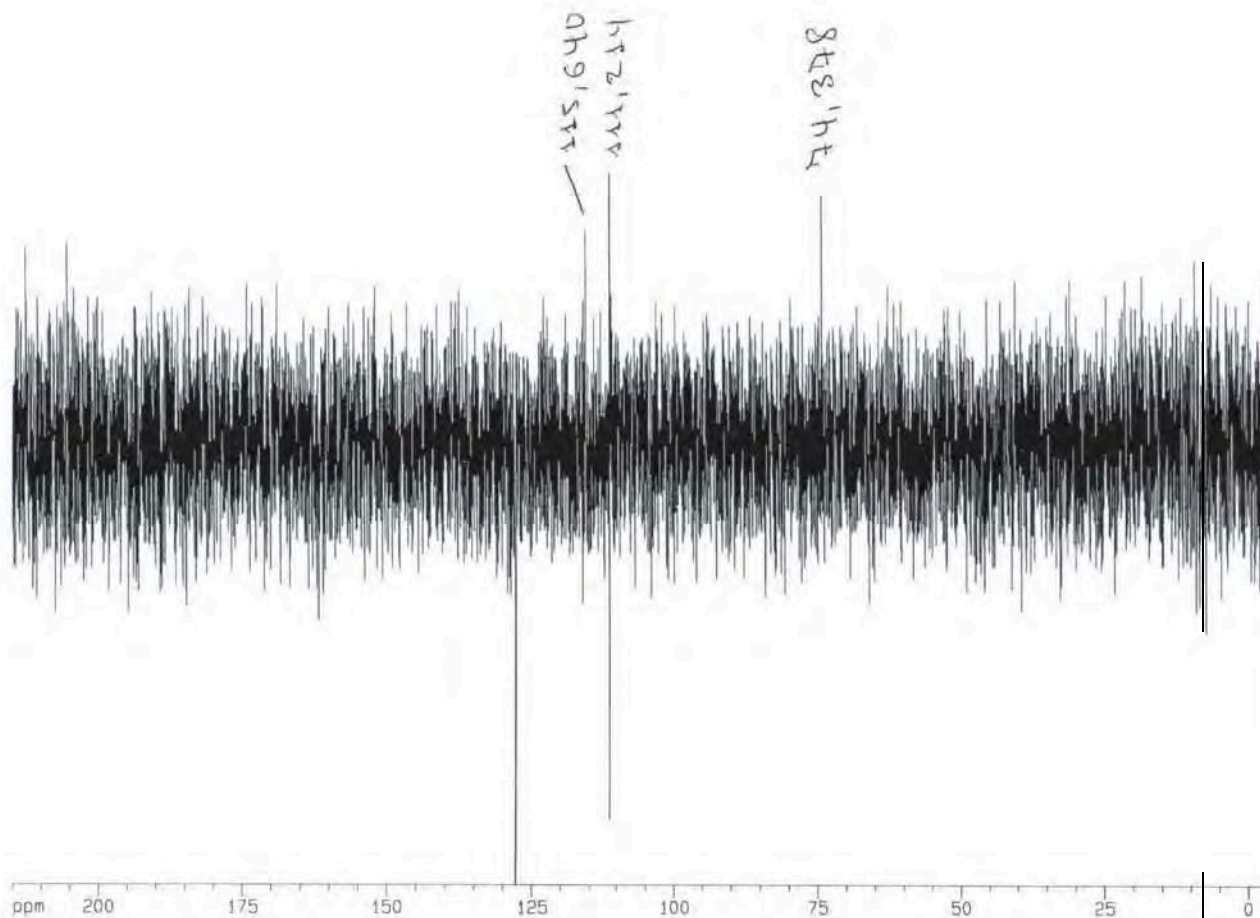
Current Data Parameters  
 NAME Prm-L-1-a-3  
 EXPNO 2  
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
 Date 20040806  
 Time 11.22  
 INSTRUM spect  
 PROBHD 5 mm Dual 13  
 PULPROG zgpg2  
 TD 16384  
 SOLVENT CDCl3  
 NS 3937  
 DS 4  
 SWH 19230.770 Hz  
 FIDRES 1.173753 Hz  
 AQ 0.4260340 sec  
 RG 16384  
 DM 26.000 usec  
 DE 37.14 usec  
 TE 300.0 K  
 HL1 3 dB  
 D1 1.00000000 sec  
 CPDPRG waltz16  
 P31 100.00 usec  
 S4 31 dB  
 D11 0.03000000 sec  
 S2 31 dB  
 P1 12.00 usec  
 SFO1 75.4760200 MHz  
 NUCLEUS 13C

F2 - Processing parameters  
 SI 32768  
 SF 75.4677540 MHz  
 WDW EM  
 SSB 0  
 LB 3.00 Hz  
 GB 0  
 PC 2.00

1D NMR plot parameters  
 CX 20.00 cm  
 F1P 236.940 ppm  
 F1 17881.31 Hz  
 F2P -17.881 ppm  
 F2 -1349.46 Hz  
 PPMCM 12.74105 ppm/cm  
 HZCM 961.53835 Hz/cm

# Espectro DEPT-135 del 4-Hidroxibenzaldehído (78)



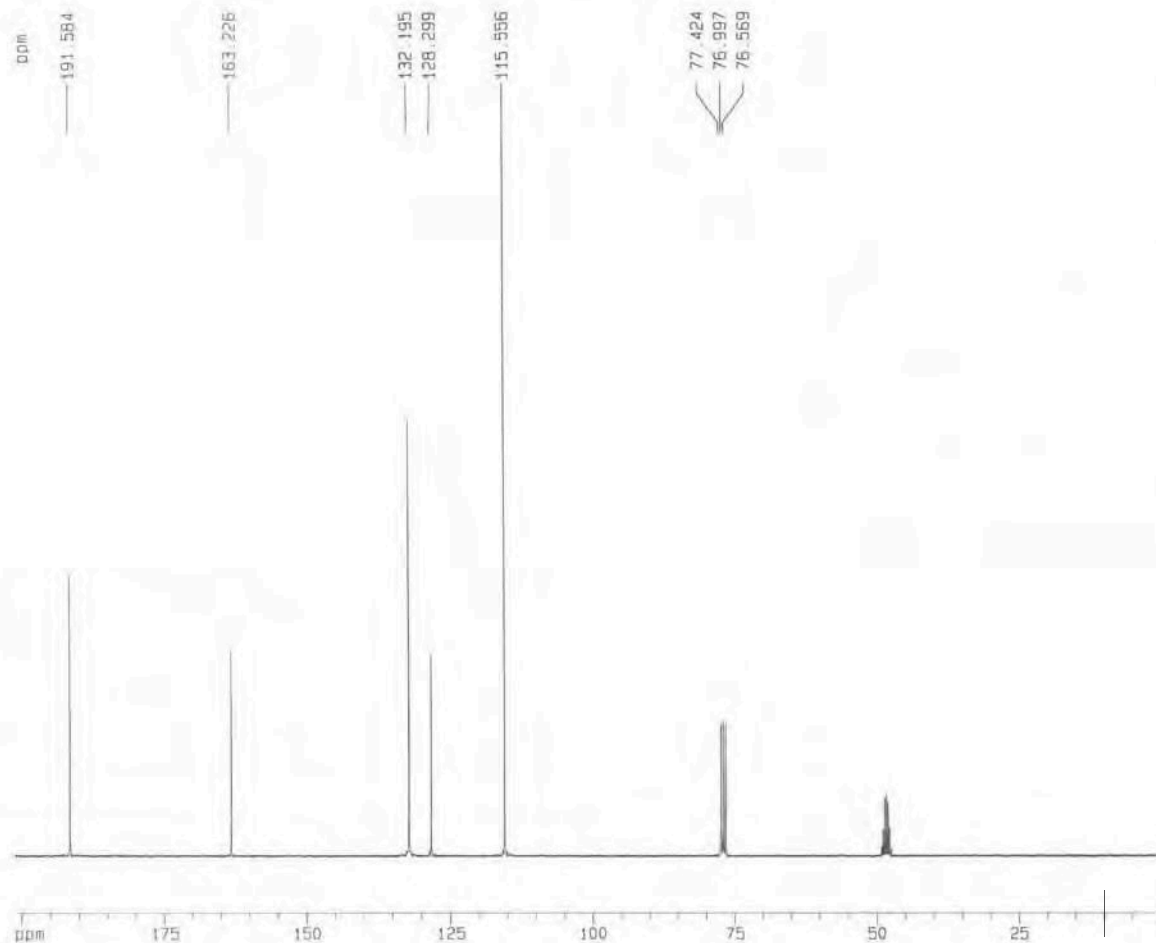
Current Data Parameters  
 NAME 4-OH-Benz  
 EXPNO 30  
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
 Date\_ 20040608  
 Time 12 59  
 INSTRUM spect  
 PROBHD 5 mm Dual 13  
 PULPRDG dept135  
 TD 65536  
 SOLVENT Acetic  
 NS 256  
 DS 4  
 SWH 18518.518 Hz  
 FIDRES 0.282570 Hz  
 AQ 1.7695220 sec  
 RG 16384  
 DW 27.000 usec  
 DE 38.57 usec  
 TE 300.0 K  
 P1 12.00 usec  
 P3 11.00 usec  
 CNST2 145.000000  
 HL1 7 dB  
 D1 2.00000000 sec  
 S1 7 dB  
 SF02 300.1312005 MHz  
 DECNUC 1H  
 D2 0.0034483 sec  
 P4 22.0 usec  
 P2 24.0 usec  
 D13 0.0000040 sec  
 S2 30 dB  
 SF01 75.4752653 MHz  
 NUCLEUS 13C  
 CPOPRG waltz16  
 P31 88.00 usec

F2 - Processing parameters  
 S1 32768  
 SF 75.4677190 MHz  
 KDM EM  
 SSB 0  
 LB 1.00 Hz  
 GB 0  
 PC 1.40

1D NMR plot parameters  
 CX 20.00 cm  
 F1P 215.000 ppm  
 F1 16225.56 Hz  
 F2P -5.000 ppm  
 F2 -377.34 Hz  
 PPMCM 11.00000 ppm/cm  
 HZCM 830.14490 Hz/cm

## Espectro de $^{13}\text{C}$ -NMR del 4-Hidroxibenzaldehído (78)



Current Data Parameters  
 NAME 4-OH-Benz  
 EXPNO 10  
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
 Date\_ 20040701  
 Time 22.22  
 INSTRUM spect  
 PROBHD 5 mm Dual 13  
 PULPROG zgpg30  
 TD 65536  
 SOLVENT CDCl3  
 NS 10457  
 DS 4  
 SWH 19230.770 Hz  
 FIDRES 0.293438 Hz  
 AQ 1.7039860 sec  
 RG 16384  
 DW 25.000 usec  
 DE 37.14 usec  
 TE 300.0 K  
 D11 0.0300000 sec  
 CPOPRG waltz16  
 P31 100.00 usec  
 S2 31 dB  
 HL1 4 dB  
 D1 2.0000000 sec  
 P1 12.00 usec  
 SFO1 75.4760200 MHz  
 NUCLEUS 13C

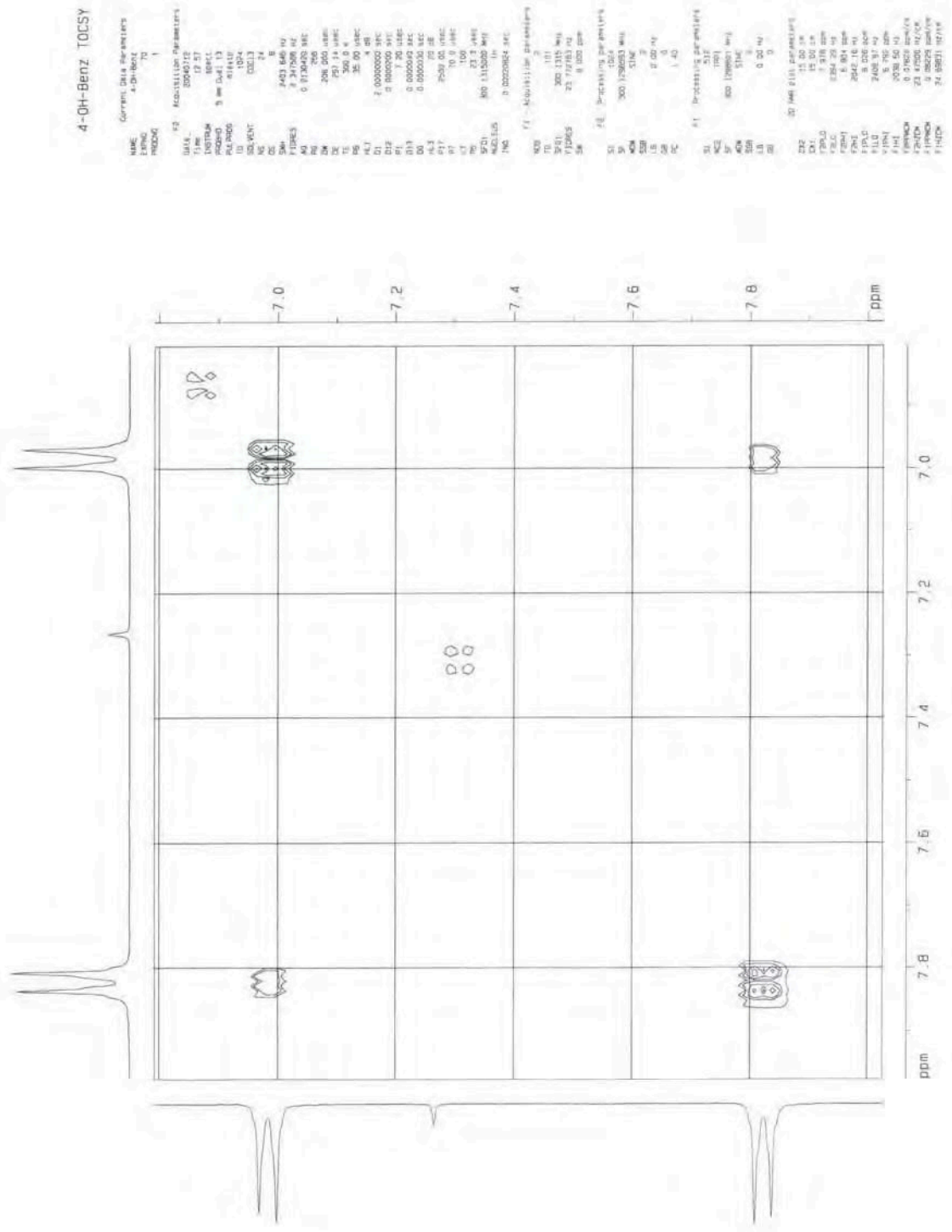
F2 - Processing parameters  
 S1 32768  
 SF 75.4680699 MHz  
 WDW EM  
 SSB 0  
 LB 1.00 Hz  
 GB 0  
 PC 1.40

1D NMR plot parameters  
 CX 20.00 cm  
 F1P 201.239 ppm  
 F1 15187.10 Hz  
 F2P -2.111 ppm  
 F2 -159.30 Hz  
 PPMCM 10.16745 ppm/cm  
 HZCM 757.32043 Hz/cm

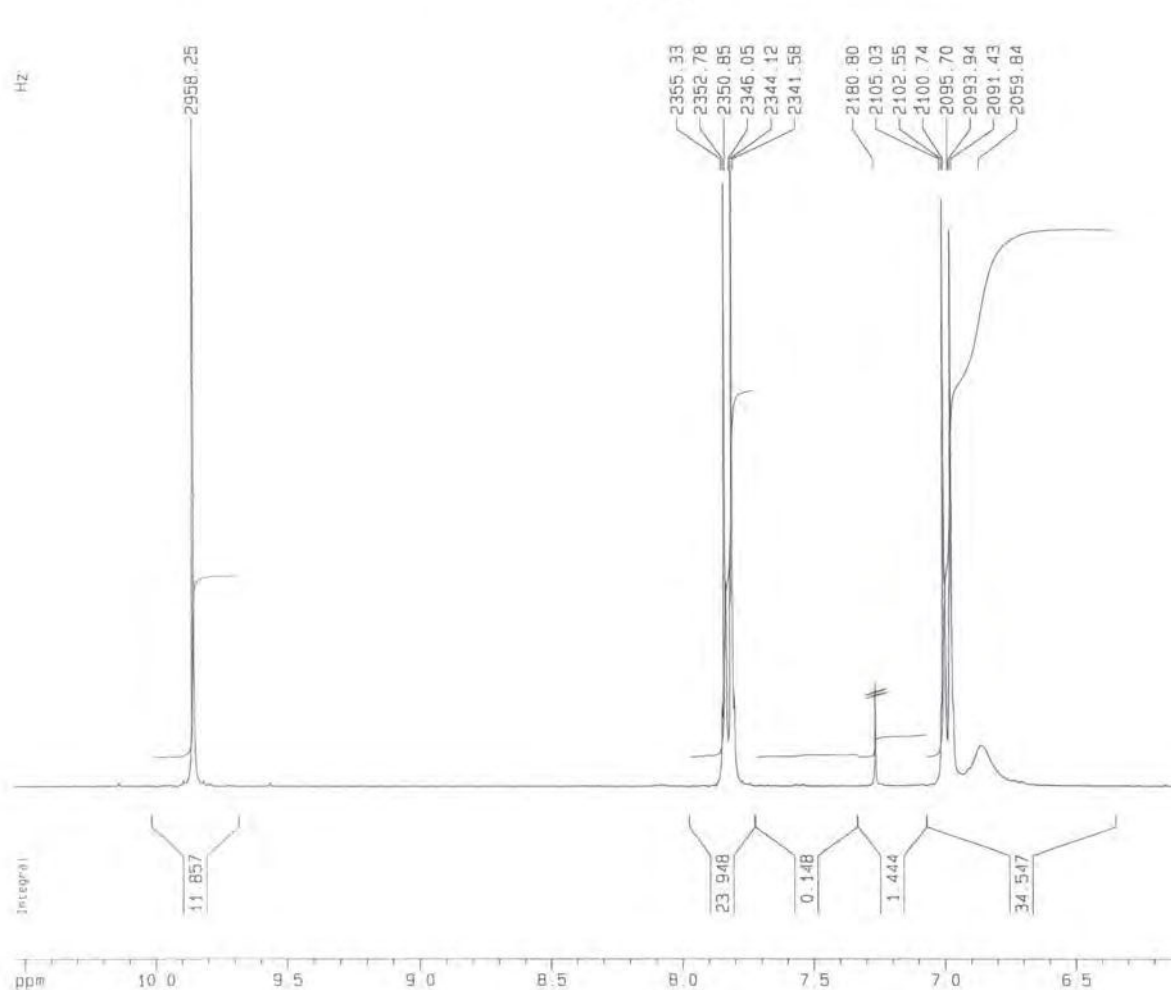
Anexo 61

Anexo 62

Espectro TOCSY del 4-Hidroxibenzaldehído (78)



## Espectro de <sup>1</sup>H-NMR del 4-Hidroxibenzaldehído (78)



```

Current Data Parameters
NAME      4-OH-BENZ
EXPNO     1
PROCNO    1

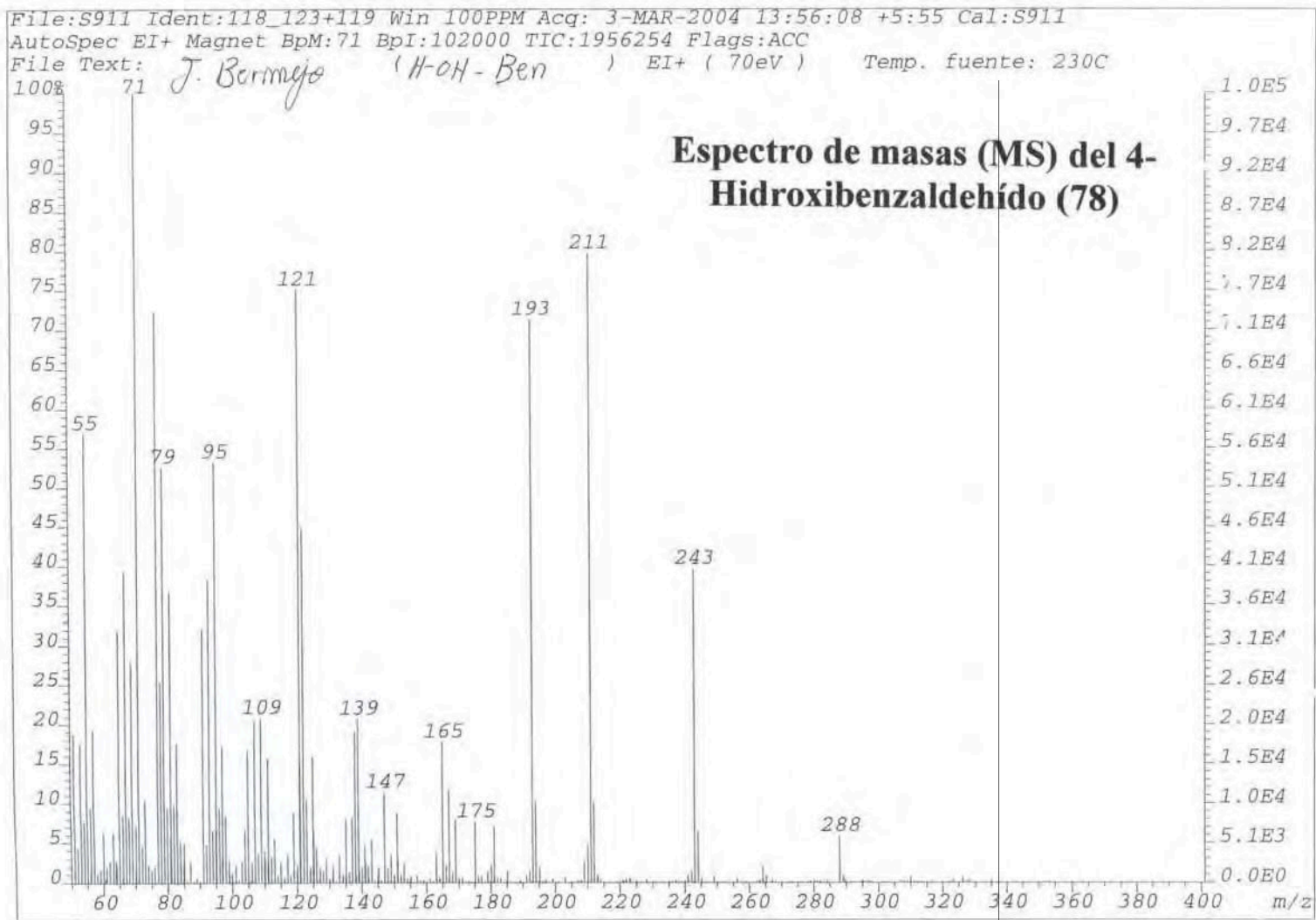
F2 - Acquisition Parameters
Date_     20040607
Time      8.18
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm Dual 13
PULPROG   zg30
TD         65536
SOLVENT   COCl3
NS         16
DS         2
SWH        6250.000 Hz
FIDRES     0.095367 Hz
AQ         5.2429299 sec
RG         1024
DM         80.000 usec
DE         114.29 usec
TE         300.0 K
HL1        4 dB
D1         1.00000000 sec
P1         7.20 usec
SF01       300.1318534 MHz
NUCLEUS    1H

F2 - Processing parameters
SI         32768
SF         300.1300047 MHz
WDW        EM
SSB        0
LB         0.30 Hz
GB         0
PC         1.00

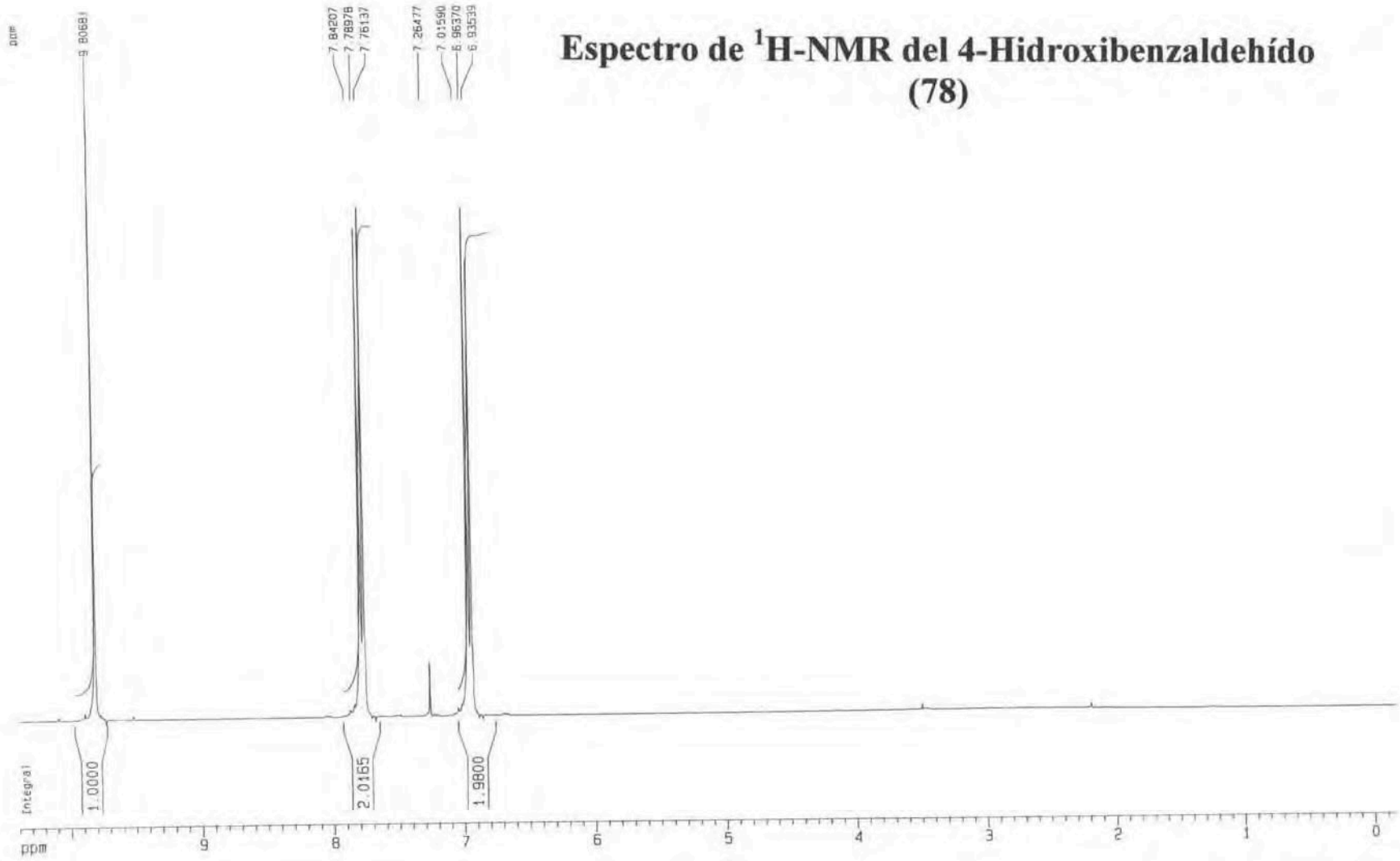
10 NMR plot parameters
CX         20.00 cm
F1P        10.540 ppm
F1         3153.50 Hz
F2P        6.075 ppm
F2         1823.30 Hz
PPMCM      0.22327 ppm/cm
HZCM       67.00966 Hz/cm
    
```

Anexo 63









Espectro de <sup>1</sup>H-NMR del 4-Hidroxibenzaldehído (78)



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS  
DE GRAN CANARIA