

COMPUESTOS TIPO CEMBRANO NATURALES Y ALGUNOS
ANÁLOGOS SINTÉTICOS COMO POTENCIALES AGENTES
ANTIFOULING

EDISSON TELLO CAMACHO

COD. 198030

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Química,
Bogotá D.C., Colombia

2013

COMPUESTOS TIPO CEMBRANO NATURALES Y ALGUNOS
ANÁLOGOS SINTÉTICOS COMO POTENCIALES AGENTES
ANTIFOULING

EDISSON TELLO CAMACHO

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Doctor en Ciencias-Química

Directora:

PhD Carmenza Duque Beltrán

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Química,
Bogotá D.C., Colombia

2013

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis agradecimientos:

A la UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA por permitirme realizar mis estudios a nivel de Doctorado.

A COLCIENCIAS por la beca del programa de formación doctoral “Francisco José de Caldas”- 2009 para el desarrollo de mi Doctorado y por la financiación parcial de esta investigación.

A la División de Investigación de Bogotá (DIB) de la Universidad Nacional de Colombia por la financiación parcial de este proyecto.

A la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia por la beca auxiliar docente.

Al Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial por los permisos de colecta y de investigación en los organismos marinos recolectados en la bahía de Santa Marta y estudiados en este trabajo.

A la escuela de Química de la Universidad de Nottingham en el Reino Unido por permitirme desarrollar mi pasantía Doctoral.

Al Departamento de Química Fundamental de la Universidad de A Coruña en España, especialmente a los profesores Jaime Rodríguez y Carlos Jiménez por el registro de diferentes experimentos de RMN y Rayos-X.

Al Departamento de Biología de la Universidad Nacional de Colombia, principalmente a la Profesora Catalina Arévalo-Ferro por toda su colaboración y ayuda en la elaboración de los ensayos *antifouling* desarrollados en su grupo de investigación en comunicación y comunidades bacterianas.

Al grupo de investigación en Bioprospección de la Universidad Jorge Tadeo Lozano, especialmente a la Dra. Profesora MÓNICA PUYANA y su estudiante Felipe Nieto por toda la colaboración brindada para el desarrollo del ensayo de campo.

Al Oceanario localizado en la Isla San Martín de Pajarales y a su equipo de trabajo por permitirnos realizar el ensayo de campo en sus instalaciones.

Al laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear de la Universidad Nacional de Colombia por la toma de los diversos experimentos.

A la profesora CARMENZA DUQUE por haberme dado la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación, por su orientación, colaboración y apoyo total en este proceso de formación. Muchas Gracias.

A GERRY PATTENDEN por recibirme en su grupo de investigación y en su hogar, por guiar mi trabajo de síntesis total en cembranos y abrirme un espacio en su vida.

Al profesor SVEN ZEA por la recolección de los organismos marinos objeto de este estudio.

Al grupo de investigación “Estudio y Aprovechamiento de Productos Naturales Marinos y Frutas de Colombia” de la Universidad Nacional de Colombia por permitir apropiarme de los valiosos conocimientos que poseen sus profesores.

Al profesor OSCAR OSORNO por su apoyo en muchos momentos de la vida en donde se convirtió en gran amigo y soporte para continuar.

A LEONARDO CASTELLANOS por brindarme sus conocimientos, apoyo y amistad en mi formación como profesional.

A FREDDY RAMOS por su amistad y apoyo durante mi doctorado.

A varios de los profesores del pregrado porque aunque tal vez sin saberlo dejaron una huella importante en mi vida y me hicieron una mejor persona.

A los Biólogos Sebastián, Annie, Jennie y Pamela, por su colaboración e interés en el desarrollo de los bioensayos antifouling *in vitro* desarrollados en este trabajo.

A mis amigos de la escuela de Química de la Universidad de Nottingham en el Reino Unido George Procopio, Dominika Regentová, José Souto, Emma McGowan, Toni Moragas, Camille Gignoux, Elise Rochette, Cristina Perez, Simona Pili y Ana Avilés.

A los profesores y amigos del grupo de Productos Naturales Marinos Edgar Daza, Coralia Osorio, Humberto Mayorga, Ángela, José, Silvana, Tatiana, Fabio, Gicel, Sandra, Lina, Oscar, Carolina's, Clara, Adriana, Luz Adriana, Alonso, Billy, Diana's, Gina, Hebelin, Eduardo, Fabián, Jairo, Angélica, Luis, Katherine's, Geison y Cesar por las experiencias compartidas durante tanto tiempo y por hacer más agradable y placentero el trabajo en el laboratorio.

De manera muy especial a mis padres, Luz Marina y Humberto, a mis hermanos, Sandra y Wilber por todo su amor, apoyo y enseñanzas durante mi vida. A Sofía por toda su colaboración y cariño.

A mi esposa **PAO** por su amor, paciencia, apoyo y entrega incondicional durante todos estos años en los cuales compartió mis alegrías, mis batallas y mis triunfos. Eres lo mejor que me ha pasado en toda mi vida!!!

Y finalmente a ti que llenaste mi vida de colores, a ti que me robaste miles de sonrisas aún en los momentos de tristeza, a ti que llegaste a mi vida para hacerme entender lo que realmente importa en la vida, a ti que con una pequeña caricia cambiaste mi mundo, a ti te dedico este trabajo y te prometo que nunca más habrá algo más importante en mi vida más que tu sonrisa, eres mi vida entera **VIOLETA!!**

RESUMEN

Los estudios de bioprospección en los octocorales del Caribe colombiano *Pseudoplexaura flagellosa* y *Eunicea knighti* permitieron aislar e identificar dieciséis compuestos tipo cembrano, encontrando que los ocho compuestos aislados de la fracción orgánica de *P. flagellosa* son epímeros en C-8 (**1-8**). Los compuestos **2, 4 y 6** son reportados por primera vez y aunque los compuestos **1, 3, 5, 7 y 8** han sido reportados previamente, sus estructuras y asignaciones de RMN fueron revisadas, completadas o corregidas en estos cembranos según cada caso. Las estructuras de estos compuestos fueron establecidas con base en los análisis detallados de sus datos espectroscópicos. Adicionalmente, la configuración relativa de los compuestos **1-3** y **7** fue confirmada mediante el análisis de difracción de Rayos-X de los cristales y la configuración absoluta de los compuestos **1-8** fue determinada usando una combinación del método modificado de Mosher e interconversiones químicas inequívocas. De la fracción orgánica del octocoral *E. knighti* fueron aislados como constituyentes menores tres nuevos diterpenos **9-11**, junto con los cembranos conocidos **12-16**. Las estereoestructuras de los compuestos nuevos fueron determinadas mediante un análisis detallado de los datos espectroscópicos, y una combinación de transformaciones químicas y el método modificado de Mosher.

Todos los cembranos aislados (**1-16**) fueron evaluados para establecer sus propiedades *antifouling* usando los bioensayos de inhibición de quorum sensing (QS) e inhibición del biofilm bacteriano, estableciendo que los compuestos **3, 6, 7, 10, 11 y 14** tienen excelente actividad inhibitoria de QS contra la cepa biosensora *Chromobacterium violaceum*, la cual fue establecida mediante inhibición de la producción del pigmento violeta sin interferir en su crecimiento. Adicionalmente, los compuestos **3, 5, 6, 8, 9, 11 y 16** exhibieron inhibición de la maduración del biofilm bacteriano en las cepas *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio harveyi* y *Staphylococcus aureus*. Por lo anterior se puede concluir que **3, 6, 7, 10, 11 y 14** fueron los compuestos más activos en los dos bioensayos, lo que los hace excelentes agentes *antifouling* y a su vez pueden ser considerados como potenciales aditivos ambientalmente amigables en las pinturas comerciales *antifouling*. Algunos compuestos tipo cembrano reportados en este trabajo presentan mejores valores de inhibición de QS y de biofilm bacteriano que los reportados para la mayoría de los compuestos aislados previamente de organismos marinos. También es importante mencionar que en esta investigación se hizo el primer reporte de compuestos tipo cembrano como inhibidores del biofilm bacteriano y como inhibidores de QS en *C. violaceum*.

Sobre la base de lo anterior se pudo establecer que los cembranos naturales presentan propiedades *antifouling*, pero la interacción estructura-función no ha sido esclarecida, por lo cual treinta y cuatro análogos de cembranos fueron sintetizados a partir de seis cembranos naturales (**1, 3, 4, 13, 15 y 16**) los

cuales fueron usados como cabezas de serie. Los análogos sintéticos (**17-50**) obtenidos a través de transformaciones químicas selectas fueron evaluados *in vitro* contra los sistemas de QS y como inhibidores de la formación y maduración del biofilm bacteriano en las cepas anteriormente mencionadas, encontrando que la mitad de los análogos ensayados presentaron una superior actividad inhibitoria de QS y del biofilm bacteriano que los compuestos precursores; principalmente los cembranos **17, 18, 20, 21, 23, 27, 28, 35-37** presentaron los mejores valores de inhibición y algunos compuestos (**18, 23 y 28**) mostraron una alta efectividad, hasta tres veces superior que los precursores naturales. Este selecto grupo de cembranos estructuralmente relacionados pueden ser usados como inhibidores de QS y del biofilm bacteriano, lo que los hace excelentes candidatos para ser usados como agentes activos en pinturas *antifouling* comerciales, ya que los compuestos inhibidores del biofilm e inhibidores de QS son a menudo considerados como potentes agentes *antifouling*.

Teniendo en cuenta lo anterior se planeó un ensayo de campo diseñado por nosotros, el cual consistió en preparar diferentes formulaciones de pinturas *antifouling* utilizando el compuesto que presentó la mejor actividad inhibitoria de los sistemas de QS y de la formación del biofilm bacteriano en los ensayos *in vitro*, y que a su vez pudiera ser obtenido en cantidades del orden de gramos. De este modo se escogió el cembrano **28** para hacer una mejor aproximación a la realidad de sus propiedades *antifouling* al ser usado como aditivo en un recubrimiento industrial en condiciones naturales y de mayor interacción con diversos organismos del *fouling* en el océano. Los resultados permitieron establecer que los sustratos tratados con el compuesto **28** previnieron completamente el asentamiento del *macrofouling* durante el periodo de prueba y es importante notar que algunos cirripedios y bivalvos fueron observados en el lugar donde se realizó el experimento, pero no en los sustratos utilizados. La formulación con el compuesto **28** previno el asentamiento de microorganismos en un 50% durante los seis meses que duró la prueba, mientras que los controles fueron completamente cubiertos por organismos del *fouling* como algas filamentosas, esponjas, tunicados, gusanos, poliquetos, tubícolas y cianobacterias.

Se estableció una aproximación sintética para la obtención del cembrano **19** el cual presentó la mejor actividad *antifouling* en los ensayos *in vitro* y en campo, a partir de la macrociclización del C₉-alcohol propargílico **16** y el cloruro C₁₀-alílico **6**. Se logró desarrollar una ruta sintética que permitió obtener los precursores **15** y **6** con altos rendimientos y en cantidades del orden de gramos a partir de materiales de partida comercialmente disponibles, económicos y sencillos. Sin embargo, el paso final de macrociclización no fue desarrollado debido al bajo rendimiento en la obtención del compuesto **16**, aunque es de resaltar que se desarrolló una ruta sintética exitosa en la obtención de los compuestos **15** y **6**. Nuevos intentos para lograr la conversión de **15** en **16** con mejores rendimientos están siendo realizados en este momento en

nuestro grupo de investigación, para lograr concluir la síntesis total de este compuesto, ya que la estrategia sintética ha sido desarrollada en más de un 90%.

Finalmente, el trabajo desarrollado durante esta tesis tuvo unos alcances excelentes y sorprendentes que permitieron ir mas allá de los objetivos planteados inicialmente, logrando hacer un aporte significativo a la comunidad científica, principalmente en las áreas de productos naturales, síntesis, RMN y estereoquímica.

Palabras claves: Cembranos, *Eunicea knighti*, *Pseudoplexaura flagellosa*, Antifouling, Quorum Sensing, Biofilm Bacteriano, Síntesis de Cembranos

ABSTRACT

Bioprospecting studies in the Colombian Caribbean octocorals *Pseudoplexaura flagellosa* and *Eunicea knighti*, allowed to isolate and identify sixteen cembranoid compounds. Eight compounds isolated from the *P. flagellosa* organic fraction are epimers in C-8 (**1-8**). Compounds **2**, **4** and **6** are reported for the first time. Although compounds **1**, **3**, **5**, **7** and **8** have been reported previously, the cembranoid structures and NMR assignments were revised, completed or corrected. The structures of these compounds were established on the basis of detailed analysis of their spectroscopic data. Furthermore, the relative configurations of compounds **1-3** and **7** were confirmed by single-crystal X-ray diffraction. The absolute configurations of compounds **1-8** were determined using a combination of the modified Mosher method and unambiguous chemical interconversions. From the organic fraction of the octocoral *E. knighti* were isolated three new diterpenes **9-11** as minor constituents, along with the known cembranoids **12-16**. The stereostructures of the new compounds were determined by detailed spectroscopic analysis and a combination of chemical transformations and modified Mosher's methods.

An evaluation of the antifouling properties for all the cembranoids isolated was made, using quorum sensing inhibition (QSI) assay and biofilm inhibition test. Compounds **3**, **6**, **7**, **10**, **11** and **14** showed excellent QSI activity against the biosensor *Chromobacterium violaceum*, as measured by inhibition of the production of violacein pigment, without interfering with its growth. Additionally, compounds **3**, **5**, **6**, **8**, **9**, **11** and **16** exhibited inhibition of biofilm maturation without interfering in the growth of *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio harveyi*, and *Staphylococcus aureus*. Therefore, the most active compounds were **3**, **6**, **7**, **10**, **11** and **14** for both assays, so, they are excellent antifouling agents that can be considered potential additives environmentally friendly to be used in commercial antifouling paints.

Some compounds reported in this work showed higher values of antifouling activity established as inhibitors of QS and bacterial biofilm, in comparison with those reported for most of the compounds isolated previously from marine organisms. It is important to mention, that in this research was made the first report of cembranoid as inhibitors of bacterial biofilm and as compounds that interfere with QS in *C. violaceum*.

In this way, was established that the natural cembranoids show antifouling properties, but their structure-function interactions are not well understood. For that reason, thirty four cembranoid analogues were synthesized using six natural cembranoids (**1**, **3**, **4**, **13**, **15** y **16**) as lead compounds. The analogues (**17-50**) obtained through the selected chemical transformations were tested in vitro against the QS systems and as inhibitors of the biofilm formation and maturation in the bacteria mentioned above. Half of the cembranoid analogues assayed showed superior QSI activity to the lead compounds, principally the cembranoids **17**, **18**, **20**, **21**, **23**, **27**, **28**, **35-37** presented the highest inhibition values, and some compounds (**18**, **23** y **28**) displayed remarkable potency up to three times higher than the natural compounds. Thereby, we have synthesized a pool of cembranoid with QSI activity and also as biofilm inhibitors that can be used in commercial antifouling paints due to their potential as antifouling agents.

Taking into account the above, a field assay was designed in order to evaluate different formulations of antifouling paints, using the compound with the highest activity value against QS and the bacterial biofilm, and that could be obtained in a gram scale. Thereby, the cembranoid **28** was chosen and evaluated in more

real conditions using it as an additive in an industrial coating in natural conditions and high interaction with the different fouling organisms in the sea. The results obtained showed that the substrates painted with the compound **28** avoid completely the macrofouling settlement during the six months of test. It is important to mention, that some barnacles were observed where the experiment took place, however, those organisms were not found in the substrates used. The formulation with the compound **28** avoid the microorganisms settlement in a 50% during the six months of the experiment, whereas the controls were completely covered by different fouling organisms as algae, sponges, tunicates, polychaetes, worms and cyanobacteria.

A synthetic approximation was made in order to obtain the cembranoid **19**, which showed the highest antifouling activity in vitro and in field assays, from the macrocyclization of C₉-propargyl alcohol **16** with the C₁₀-allylic chloride **6**. A synthetic route was developed to obtain the precursors **15** and **6** in a high yield from commercial, cheap and simple. Although the final macrocyclization step could not be achieved due to the poor yield of the compound **16**, a successful synthetic route was made to obtain the compounds **15** and **6**. Different strategies are being undertaken in our research group to obtain the total synthesis of this compound, taking into account that at least 90% of this synthesis has been made.

Finally, the research done during this thesis showed excellent achievements and surprising results, allowing the research to go beyond the objectives initially proposed. In this way, a significant contribution was made for the scientific community, principally in natural products, synthesis, NMR and stereochemistry fields.

Key words: Cembranoids, *Eunicea knighti*, *Pseudoplexaura flagellosa*, Antifouling, Quorum sensing, Bacterial Biofilm, Synthesis of Cembranoids

CONTENIDO

RESUMEN.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE TABLAS.....	xvi
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	xvii
CAPÍTULO 1	
INTRODUCCIÓN.....	1
1. MARCO TEÓRICO.....	4
1.1. COMPUESTOS NATURALES CON ACTIVIDAD <i>ANTIFOULING</i> TIPO CEMBRANO AISLADOS DE OCTOCORALES.....	5
1.2. COMPUESTOS SINTÉTICOS Y SEMI-SINTÉTICOS TIPO CEMBRANO.....	9
1.2.1. Compuestos semi-sintéticos tipo cembrano.....	9
1.2.2. Síntesis total de cembranos.....	11
1.3. ALGUNOS ESTUDIOS DE LA RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD <i>ANTIFOULING</i> DE TERPENOS MARINOS.....	13
1.4. PROCESO DEL <i>FOULING</i>	17
1.5. ENSAYOS <i>ANTIFOULING</i>	22
1.6. BREVES CONCLUSIONES DEL ANÁLISIS DE LA BIBLIOGRAFÍA PRESENTADA Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	23
CAPÍTULO 2	
2. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS TIPO CEMBRANO A PARTIR DE LOS OCTOCORALES <i>Pseudoplexaura flagellosa</i> y <i>Eunicea knighti</i> DEL CARIBE COLOMBIANO.....	1
2.1. METODOLOGÍA.....	1
2.1.1. Generalidades.....	1
2.2. MATERIAL ANIMAL.....	2
2.3. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS CRUDOS.....	2
2.4. FRACCIONAMIENTO DE LOS EXTRACTOS CRUDOS.....	3
2.4.1. Fracción orgánica de <i>P. flagellosa</i>	3
2.4.2. Fracción orgánica de <i>E. knighti</i>	5
2.5. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS PRESENTES EN LAS FRACCIONES CON ACTIVIDAD <i>ANTIFOULING</i> Pff6, Pff8 y Pff9 DEL OCTOCORAL <i>P. flagellosa</i> Y EkF5, EkF6 y EkF10 DEL OCTOCORAL <i>E. knighti</i>	5

2.5.1. Obtención de cembranos a partir de las fracciones de <i>P. flagellosa</i>	5
2.5.2. Obtención de cembranos a partir de las fracciones de <i>E. knighti</i>	5
2.5.3. Preparación de los ésteres (<i>R</i>)- y (<i>S</i>)-MPA de los compuestos aislados.....	6
2.6. IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS NATURALES AISLADOS.....	8
2.7. DATOS ESPECTROSCÓPICOS, RAYOS X Y ALGUNAS TRANSFORMACIONES QUÍMICAS DE LOS COMPUESTOS AISLADOS DEL OCTOCORAL <i>p. flagellosa</i>	8
2.7.1. Datos espectroscópicos del octocoral <i>P. flagellosa</i>	8
2.7.2. Datos cristalográficos y análisis de la estructura de Rayos-X de los compuestos 1-3 y 7.....	9
2.7.3. Transformaciones químicas de los compuestos naturales.....	10
2.8. DATOS ESPECTROSCÓPICOS Y ALGUNAS TRANSFORMACIONES QUÍMICAS DE LOS COMPUESTOS AISLADOS DEL OCTOCORAL <i>E. knighti</i>	11
2.8.1. Datos espectroscópicos del octocoral <i>E. knighti</i>	11
2.8.2. Transformaciones químicas de los compuestos naturales.....	12
2.9. ENSAYOS <i>ANTIFOULING IN VITRO</i>	13
2.9.1. Ensayo de Inhibición de sistemas de <i>Quorum Sensing</i>	13
2.9.2. Ensayo de evaluación de la actividad inhibitoria del Biofilm bacteriano.....	13
2.10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	15
2.10.1. Compuestos aislados del octocoral <i>P. flagellosa</i>	15
2.10.2. Compuestos aislados del octocoral <i>E. knighti</i>	30
2.10.3. Evaluación de la actividad <i>antifouling</i> de los compuestos aislados de los octocorales <i>P. flagellosa</i> y <i>E. knighti</i>	39
2.10.4. Actividad Inhibitoria de <i>Quorum Sensing</i> en los compuestos 1-16.....	40
2.10.5. Ensayo de inhibición de biofilm bacteriano en los compuestos naturales 1-16.....	41

CAPÍTULO 3

3. SÍNTESIS DE ANÁLOGOS TIPO CEMBRANO A PARTIR DE COMPUESTOS NATURALES AISLADOS, EVALUACIÓN DE SUS PROPIEDADES <i>ANTIFOULING</i> Y ALGUNAS APROXIMACIONES A LA RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD.....	1
3.1. METODOLOGÍA.....	2
3.1.1. Generalidades.....	2
3.2. SÍNTESIS DE ANÁLOGOS A PARTIR DE ALGUNOS CEMBRANOS NATURALES AISLADOS.....	3
3.2.1. Reacción de acetato de asperdiol (16) con $CDCl_3$ acidificado.....	3
3.2.2. Reacción de acetato de knightol (13) con $CDCl_3$ acidificado.....	4
3.2.3. Reacción del compuesto asperdiol (15) con anhídrido acético.....	5

3.2.4.	Reacción del diacetato de asperdiol (26) con CDCl_3 acidificado.....	6
3.2.5.	Reacción de asperdiol (15) con CDCl_3 acidificado.....	7
3.2.6.	Reacción de acetato de asperdiol (16) con P_2O_5	8
3.2.7.	Reacción de acetato de asperdiol (16) con SeO_2	9
3.2.8.	Reacción del acetato de asperdiol (16) con ácido <i>m</i> -cloroperbenzoico.....	9
3.2.9.	Reacción del asperdiol (15) con PCC.....	9
3.2.10.	Reacción del acetato de asperdiol (16) con yodo.....	10
3.2.11.	Fotólisis del acetato de asperdiol (16).....	11
3.2.12.	Reacción del asperdiol (15) con MeOTf.....	11
3.2.13.	Reacción de 8 <i>S</i> -plexaurolona (1), 8 <i>S</i> -dihidroplexaurolona (3) y 8 <i>R</i> - dihidroplexaurolona (4) con ácido acético.....	11
3.2.14.	Reacción de 8 <i>S</i> -plexaurolona (1) con CH_2Cl_2 acidificado.....	12
3.2.15.	Reacción de 8 <i>S</i> -dihidroplexaurolona (3) con CH_2Cl_2 acidificado.....	13
3.2.16.	Reacción de 8 <i>R</i> -dihidroplexaurolona (4) con CH_2Cl_2 acidificado.....	13
3.3.	ENSAYOS <i>ANTIFOULING IN VITRO</i>	14
3.3.1.	Ensayo de Inhibición de sistemas de <i>Quorum Sensing</i>	14
3.3.2.	Ensayo de evaluación de la actividad inhibitoria del Biofilm bacteriano.....	14
3.4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	15
3.4.1.	Síntesis de análogos tipo cembrano.....	15
3.4.2.	Reacciones usadas y descripción de los compuestos obtenidos.....	15
3.4.2.1.	Reacción de apertura del grupo funcional epóxido en los compuestos 13, 15, 16, y 26.....	16
3.4.2.2.	Reacciones de oxidación.....	20
3.4.2.3.	Tratamiento con yodo en el compuesto acetato de asperdiol 16.....	22
3.4.2.4.	Reacciones fotoquímicas.....	23
3.4.2.5.	Metilaciones y acetilaciones.....	24
3.4.2.6.	Síntesis de hemiacetales cíclicos.....	25
3.5.	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD <i>ANTIFOULING</i> DE LOS ANALOGOS SINTÉTICOS.....	26
3.5.1.	Ensayo de IQS en los análogos sintéticos 17-50.....	26
3.5.2.	Ensayo de inhibición de Biofilm bacteriano en los análogos sintéticos 17-50.....	29

CAPÍTULO 4

4.	ENSAYO DE CAMPO.....	1
4.1.	METODOLOGÍA.....	2
4.1.1.	Generalidades.....	2

4.1.2.	Síntesis del cembrano 28 a partir del asperdiol 15.....	3
4.1.3.	Ensayo de campo.....	3
4.2.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	6
4.2.1.	Resultados generales del ensayo de campo.....	6
4.2.2.	Comparación del efecto de la matriz en la actividad <i>antifouling</i> para cada uno de los principios activos utilizados en las diferentes formulaciones.....	6
4.2.3.	Comparación del potencial <i>antifouling</i> de las diferentes formulaciones.....	10
CAPÍTULO 5		
5.	DISEÑO DE UNA RUTA SINTÉTICA PARA LA OBTENCIÓN DE COMPUESTOS TIPO CEMBRANO CON ACTIVIDAD <i>ANTIFOULING</i>	1
5.1.	METODOLOGÍA.....	4
5.1.1.	Generalidades.....	4
5.1.2.	Síntesis de 6 y 16.....	5
5.1.2.1.	Síntesis de 6.....	5
5.1.2.2.	Síntesis de 16.....	7
5.2.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	14
5.2.1.	Diseño de una ruta sintética para obtener la estructura 19 que presentó la mejor actividad <i>antifouling in vitro</i> e <i>in vivo</i>	14
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		
PUBLICACIONES CIENTÍFICAS Y PARTICIPACIONES EN EVENTOS		
ANEXOS (Ver CD o versión digital)		

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Esquema 1. Representación de la investigación realizada en la presente tesis.....	3
Figura 1.1. Evaluación de la actividad antifouling de compuestos aislados de octocorales del Caribe Colombiano en nuestro grupo de investigación.....	7
Figura 1.2. Sistema LuxR/LuxI.....	18
Figura 1.3. Esquema del proceso del <i>fouling</i>	19
Figura 1.4. Diversos ensayos de inhibición contra el <i>micro-</i> y <i>macrofouling</i>	23

CAPÍTULO 2

Figura 2.1. Octocorales fuente de cembranos.....	2
Figura 2.2. Fraccionamiento bioguiado (en IQS usando <i>C. violaceum</i>) del extracto del octocoral <i>P. flagellosa</i> . Las fracciones o compuestos resaltados en azul fueron activos en el ensayo de IQS.....	4
Figura 2.3. Fraccionamiento bioguiado (en IQS usando <i>C. violaceum</i>) del extracto del octocoral <i>E. knighti</i> . Las fracciones o compuestos resaltados en azul fueron activos en el ensayo de IQS.....	7
Figura 2.4. Modelo del método de Mosher para la preparación de los ésteres (<i>R</i>)- y (<i>S</i>)-MPA.....	8
Figura 2.5. Sistemas de espines para el compuesto 1 establecidos mediante el experimento COSY.....	18
Figura 2.6. Principales correlaciones observadas en el experimento gHMBC para el compuesto 1	18
Figura 2.7. Diagrama ORTEP del compuesto 1	19
Figura 2.8. Estereoestructura del compuesto 1	19
Figura 2.9. Diagrama ORTEP del compuesto 2	21
Figura 2.10. Estereoestructura del compuesto 2	22
Figura 2.11. Correlaciones COSY y gHMBC para el compuesto 3	22
Figura 2.12. Diagrama ORTEP del compuesto 3	23
Figura 2.13. Interconversión química del compuesto 3 en 49	23
Figura 2.14. Correlaciones COSY y gHMBC para el compuesto 49	23
Figura 2.15. Estereoestructura del compuesto 3	24
Figura 2.16. Correlaciones COSY y gHMBC para el compuesto 4	25
Figura 2.17. Estereoestructura del compuesto 4	25
Figura 2.18. Correlaciones COSY y gHMBC para el compuesto 5	26
Figura 2.19. Configuración relativa de los compuesto 5 y 6	26
Figura 2.20. Conversión de los compuestos 1 y 2 en 5 y 6 , respectivamente.....	27
Figura 2.21. Estereoestructuras de los compuestos 5 y 6	28
Figura 2.22. Correlaciones COSY y gHMBC para los compuestos 7 y 8	28

Figura 2.23. Diagrama ORTEP del compuesto 7	29
Figura 2.24. Conversión de los compuestos 1 y 2 en 7 y 8 , respectivamente.....	29
Figura 2.25. Estructuras de los compuestos 1-8 aislados de <i>P. flagellosa</i>	30
Figura 2.26. Correlaciones COSY y gHMBC para el compuesto 9	31
Figura 2.27. Correlaciones clave NOE para el compuesto 9	33
Figura 2.28. Interconversión química del compuesto 9 en 51	34
Figura 2.29. Estereoestructura del compuesto 9	34
Figura 2.30. Correlaciones COSY y gHMBC para el compuesto 10	36
Figura 2.31. Estereoestructura del compuesto 10	37
Figura 2.32. Correlaciones COSY y gHMBC para el compuesto 11	37
Figura 2.33. Estereoestructura del compuesto 11	38
Figura 2.34. Estereoestructuras de los compuestos 12-16	38
Figura 2.35. Estructuras de los compuestos aislados (1-16)	42

CAPÍTULO 3

Figura 3.1. Esquema de obtención de diversos análogos bajo diferentes tipos de reacciones químicas, para su posterior evaluación de actividad biológica y estudios de relación estructura-actividad <i>antifouling</i>	1
Figura 3.2. Compuestos naturales escogidos como cabezas de serie.....	15
Figura 3.3. Apertura del anillo epóxido.....	16
Figura 3.4. Reacción de apertura del anillo epóxido en el compuesto 16	17
Figura 3.5. Reacción de apertura del anillo epóxido en el compuesto 13	18
Figura 3.6. Apertura del anillo epóxido en el compuesto 26	18
Figura 3.7. Reacción de apertura del anillo epóxido en el compuesto 15	19
Figura 3.8. Reacción de oxidación utilizando P_2O_5 al compuesto 16	20
Figura 3.9. Reacción de oxidación utilizando SeO_2 al compuesto 16	21
Figura 3.10. Reacción de epoxidación en el compuesto 16	21
Figura 3.11. Reacción de oxidación con PCC al compuesto 15	22
Figura 3.12. Tratamiento con yodo al compuesto 16	23
Figura 3.13. Reacción fotoquímica en el compuesto 16	23
Figura 3.14. Reacción de metilación del compuesto 15	24
Figura 3.15. Acetilaciones de los compuestos 1, 3 y 4	25
Figura 3.16. Formación de hemiacetales cíclicos a partir de los compuestos 1, 3 y 4	26
Figura 3.17. Compuestos más activos en los bioensayos IQS e inhibición de biofilm.....	30

CAPÍTULO 4

Figura 4.1. Estructura del cembrano 28	1
Figura 4.2. Reacciones para la obtención del cembrano <i>antifouling</i> 28	2
Figura 4.3. Paneles cerámicos y pinturas <i>antifouling</i> utilizados en el ensayo de campo.....	4
Figura 4.4 Disposición y fijación de los paneles cerámicos en el océano.....	5
Figura 4.5. Resultados del ensayo <i>antifouling</i> expresados como porcentaje de organismos asentados y porcentaje de superficie cubierta total. A. Respuesta a la formulación I; B. Respuesta a la formulación II.....	7
Figura 4.6. Resultados del ensayo <i>antifouling</i> expresados como porcentaje de organismos asentados y porcentaje de superficie cubierta total. A. Respuesta a la formulación III; B. Respuesta a la formulación IV.....	7
Figura 4.7. Resultados del ensayo <i>antifouling</i> expresados como porcentaje de organismos asentados y porcentaje de superficie cubierta total. A. Respuesta a la formulación V; B. Respuesta a la formulación VI.....	8
Figura 4.8. Resultados del ensayo <i>antifouling</i> expresados como porcentaje de organismos asentados y porcentaje de superficie cubierta total. A. Respuesta a la formulación VII; B. Respuesta a la formulación VIII.....	8
Figura 4.9. Resultados del ensayo <i>antifouling</i> expresados como porcentaje de organismos asentados y porcentaje de superficie cubierta total. A. Respuesta a la formulación IX; B. Respuesta a la formulación X.....	9
Figura 4.10. Resultados del ensayo <i>antifouling</i> expresados como porcentaje de organismos asentados y porcentaje de superficie cubierta total. A. Respuesta a la formulación XI; B. Respuesta a la formulación XII.....	9
Figura 4.11. Resultados del ensayo <i>antifouling</i> para todas las formulaciones (I-XII) expresados como porcentaje de superficie cubierta.....	11
Figura 4.12. Panel cerámico con la formulación VII. a. Un mes de prueba; b. Seis meses de prueba	11
Figura 4.13. Desarrollo del <i>fouling</i> sobre los paneles cerámicos.....	12

CAPÍTULO 5

Figura 5.1. Características estructurales en el anillo cembrano que le confieren sus propiedades <i>antifouling</i>	2
Figura 5.2. Esquema de síntesis de la estructura tipo cembrano 19 con propiedades <i>antifouling</i>	3
Figura 5.3. Análisis retrosintético de 19	14
Figura 5.4. Análisis retrosintético de 19 vía el precursor 18	15
Figura 5.5. Síntesis de 6	16

Figura 5.6. Análisis retrosintético para obtener 16	16
Figura 5.7. Síntesis del intermediario clave 16	17
Figura 5.8. Reacciones de carboiodinación con los sustratos modelo 15a , 15b y 15c	18
Figura 5.9. Reacción de Heck para acoplar 16c y 6a	19

LISTA DE TABLAS

CAPÍTULO 1

Tabla 1.1. Análogos de la 3-isocianoteonellina y su actividad <i>antifouling</i>	15
---	-----------

CAPÍTULO 2

Tabla 2.1. Ensayo de inhibición de QS usando la bacteria <i>Chromobacterium violaceum</i> para evaluar los extractos y fracciones obtenidas de los octocorales <i>P. flagellosa</i> y <i>E. knighti</i>	3
Tabla 2.2. RMN ¹ H (400 MHz en CDCl ₃) para los compuestos 1-8 y 49	16
Tabla 2.3. RMN ¹³ C (100 MHz) en CDCl ₃ para los compuestos 1-8 y 49	17
Tabla 2.4. Datos espectroscópicos seleccionados de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) para los ésteres MPA en C-3 para 1a,b , 2a,b y en C-11 para 4a,b , 241a,b y sus respectivos valores de $\Delta\delta^{RS} = \delta^R - \delta^S$	20
Tabla 2.5. RMN ¹ H (400 MHz en CDCl ₃) y ¹³ C (100 MHz en CDCl ₃) para los compuestos 9-11	32
Tabla 2.6. Datos espectroscópicos seleccionados de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) para los ésteres MPA en C-11 para 51a,b y 51a,b y en C-7 51a,b y sus respectivos valores de $\Delta\delta^{RS} = \delta^R - \delta^S$	35
Tabla 2.7. Inhibición de quorum sensing y del biofilm bacteriano de los compuestos 1-16	40

CAPÍTULO 3

Tabla 3.1. Inhibición de <i>quorum sensing</i> y del biofilm bacteriano de los compuestos cabeza de serie y de sus análogos sintéticos 17-50	28
--	-----------

CAPÍTULO 4

Tabla 4.1. Formulación de las pinturas <i>antifouling</i>	4
--	----------

CAPÍTULO 5

Tabla 5.1. Reacción de carboiodinación del alqueno 15 bajo diferentes condiciones.....	18
--	-----------

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

Abreviatura ó Subíndice	Término
CLAE	cromatografía líquida de alta eficiencia
QS	quorum sensing
IQS	Inhibición de quorum sensing
iNOS	inducible oxido nítrico sintasa (siglas en ingles)
COX-1	prostaglandina-endoperóxido sintasa 1 (ciclo-oxigenasa)
COX-2	prostaglandina-endoperóxido sintasa 2 (ciclo-oxigenasa)
RMN	resonancia Magnética Nuclear
RMN ¹ H	resonancia Magnética Nuclear de hidrógeno
RMN ¹³ C	resonancia Magnética Nuclear de carbono
RMN 1D	resonancia Magnética Nuclear unidimensional
RMN 2D	resonancia Magnética Nuclear en dos dimensiones
BGC-823	línea celular del carcinoma humano gástrico
MDA-MB-231	línea celular del carcinoma humano de pecho
A-549	línea celular del adenocarcinoma de pulmón humano
HT-29	línea celular del adenocarcinoma de colon humano
CHO-K1	línea celular del carcinoma de ovario en hámster
H116	línea celular tumoral de colon
PSN1	línea celular del adenocarcinoma pancreático humano
T98G	línea celular del glioblastoma humano
KB	línea celular del adenocarcinoma cervical
NCI-60	kit de 60 líneas tumorales humanas
CE ₅₀	concentración efectiva al 50%
DL ₅₀	dosis letal al 50%
CCD	cromatografía en capa delgada
λ_{max}	longitud de onda máximo
CC	cromatografía en Columna
SiO ₂	sílica gel
CGAR-EM	cromatografía de gases de alta resolución acoplada a espectrometría de masas
ESI	ionización por electrospray
He	helio
eV	electrón-voltios
UV/vis	ultravioleta/visible
nm	nanómetros
RP-18	fase reversa de 18 átomos de carbono (siglas en ingles)
MHz	megahertz
Hz	hertz
s	singlete
d	doblete
t	triplete
q	cuarteto
br	ancho

m	multiplete
IR	infrarrojo
R.A.	reactivo analítico
SCUBA	self-contained underwater breathing apparatus (Ingles)
v/v	Volumen a volumen
R- y S-MPA	derivados R y S del ácido metoxifenil acético
tr	tiempo de retención
mg	miligramos
DCC	Diciclohexil carbodiimida
DMAP	4-dimetil amino piridina
EM	espectrometría de masas
NOESY	espectroscopia del efecto nuclear overhauser
COSY	correlación espectroscópica
HMQC	correlación heteronuclear múltiple cuántica
HSQC	correlación heteronuclear simple cuanto
gHMQC	coherencia heteronuclear múltiple cuántica con gradiente
HMBC	correlación heteronuclear de múltiple enlace
gHMBC	coherencia heteronuclear de múltiple enlace con gradiente
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer (ingles)
HRESIMS	espectrometría de masas de alta resolución en modo electrospray, por sus siglas en inglés
ESIMS	Espectrometría de masas de baja resolución en modo electrospray, por sus siglas en inglés
Cfu/mL	Unidades formadoras de colonias por mililitro
mm	milímetros
Pa	pascales
DO	densidad óptica
J	constante de acoplamiento
EP	éter de petróleo
AcOEt	Acetato de etilo
MeOH	Metanol
EtOH	Etanol
Pyr	Piridina
DCM	Diclorometano
DCE	Dicloroetano
TBSCI	Cloruro de tert-butilsililo
TBDPSCI	Cloruro de tert-butildifenilsililo
BOMCI	Cloruro de Benzil oximetil éter
REA	Relación estructura-actividad

Notas:

- Para mayor facilidad en la comprensión del texto por parte del lector, la numeración de los compuestos utilizados en el capítulo 5 es independiente a la usada en el resto de este manuscrito.
- La bibliografía se encuentra distribuida por capítulos y está consignada como pie de página.

INTRODUCCIÓN

El *fouling*, deposición de material biótico y abiótico sobre un sustrato inanimado, se presenta en una gran diversidad de ambientes y condiciones, desde plataformas de tratamiento de agua, cortezas de árboles, dispositivos médicos quirúrgicos, hasta dientes, coronas y otros aditamentos odontológicos.^{1,2} Sin embargo, en esta tesis nos referiremos al *fouling* desde una perspectiva biológica, como la necesidad que tienen micro- y macroorganismos marinos bentónicos de asentarse (deposición y adhesión), desarrollarse y vivir sobre superficies sumergidas, incluyendo las superficies de otros organismos marinos vivos que estén disponibles en el medio, ya que a pesar de su extensión, el océano es limitado en términos del espacio adecuado para el desarrollo de organismos de hábitos bentónicos. Desde una perspectiva industrial, el *fouling* es la modificación (por corrosión y peso ocasionada por diversos organismos *fouling*) de una estructura artificial sumergida que resulta en el deterioro de su eficiencia. Este fenómeno genera graves problemas estructurales y de corrosión en embarcaciones y estructuras sumergidas, causando pérdidas económicas no sólo por los costos de reemplazo de tales estructuras, sino también por los costos del mantenimiento periódico “limpieza” a la que deben someterse tales superficies, además de los costos del recubrimiento (películas *antifouling*) que normalmente se usa para protegerlas.³

Una de las medidas más utilizadas para prevenir este fenómeno, es el uso de recubrimientos con propiedades *antifouling* basados en agentes biocidas. La función de estos biocidas se puede entender como la inhibición de la fijación de organismos indeseados por un efecto letal, previo o posterior a la fijación, eliminando por cualquiera de estos mecanismos los organismos que se concentran cerca de la superficie tratada con uno de estos productos. Entre los recubrimientos más usados, tenemos los que incorporan derivados de estaño en diferentes formas (óxidos, cloruros o fluoruros) y derivados de cobre en grandes cantidades como óxidos, tiocianatos, sulfatos, etc. También se usan cobiocidas que son compuestos orgánicos sintéticos que suplementan la potencia del estaño y del cobre.³ El uso de estos biocidas y cobiocidas ha generado graves problemas de toxicidad, mortalidad y transformaciones genéticas entre otras para la biota marina, por esta razón, en los últimos años se han venido desarrollando dos alternativas no tóxicas con el fin de combatir el problema del *fouling*. La primera de ellas está fundamentada en el conocimiento generado en disciplinas científicas como la física y la electroquímica, aplicadas a la ciencia de materiales, la cual considera que el asentamiento de microorganismos está mediado por fuerzas físicas tales como el movimiento browniano, interacciones electrostáticas, gravedad y fuerzas de *van der Waals*. Con base en estas propiedades, la ciencia de materiales ha contribuido con la elaboración de productos que inhiben la fijación de organismos, basados en mecanismos físico-químicos que debilitan la unión de los organismos con la superficie lo que facilita su posterior remoción.^{4,5} Así, en vez de repeler o matar los organismos incrustantes, se busca reducir la energía superficial del sustrato, resultando en superficies muy lisas y resbalosas que no son favorables para el asentamiento de los organismos debido a que su nivel de adhesión es mínimo.^{4,5}

¹ Callow, M. E.; Callow J. A. **2002**. Marine biofouling: a sticky problem. *Biologist* 49, 1-5.

² Flemming, H. C. **2002**. Biofouling in water systems – cases, causes and countermeasures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59, 629-640.

³ Omae, I. **2003**. General aspects of tin-free antifouling paints. *Chem. Rev.* 103, 3431-3448.

⁴ Giudice, C. A.; Benitez, J. C.; Pereyra, A. Pinturas para controlar la incrustación en estructuras externas. Evaluación de desempeño. INPRA LATINA 2003, pp 1-6.

⁵ Watermann, B.; Daehne, B.; Michaelis, H.; Sievers, S.; Dannenberg, R.; Wiegemann, M. Performance of biocide-free antifouling paints. Summary of Vol. 1-Application of test paints and inspections of 2000. Wold Wildlife Fund. Germany, 2001, p 89.

La segunda alternativa es el uso de compuestos naturales aislados de organismos marinos como potenciales agentes *antifouling*, la cual trata de imitar lo que hacen algunos organismos marinos sésiles, particularmente algas, esponjas y octocorales, los cuales a pesar de estar inmersos en un medio en el cual hay una gran cantidad de microorganismos y macroorganismos buscando un sustrato donde fijarse, tienen una superficie relativamente limpia, debido muy probablemente (existe bastante evidencia experimental) a la presencia de compuestos químicos en su cuerpo, que tienen como función la prevención de la fijación de microepibiontes, la inhibición de la fijación y el crecimiento de larvas de otros invertebrados marinos y/o el asentamiento o germinación de esporas de alga.^{6,7}

Con base en lo anterior y conscientes de la necesidad de buscar alternativas no tóxicas “ambientalmente amigables” nuestro grupo de investigación “Estudio y aprovechamiento de productos naturales marinos y frutas de Colombia” ha venido realizando durante los últimos 6 años algunos estudios tratando de imitar lo que naturalmente hacen algunas especies marinas sésiles, las cuales elaboran sustancias para protegerse de la colonización de otras especies. Por esto, la principal motivación de esta investigación, fue la búsqueda de nuevas sustancias naturales con actividad *antifouling* a partir de organismos bentónicos sésiles como los octocorales del género *Eunicea* y *Pseudoplexaura*. Estudios anteriores han mostrado que algunos de éstos son buena fuente de cembranos con propiedades *antifouling* en nuestros ensayos de laboratorio.^{8,9,10,11,12}

Así, en esta investigación representada en el esquema 1 los octocorales *Pseudoplexaura flagellosa* y *Eunicea knighti* fueron sometidos a extracción y posterior partición con solventes para obtener fracciones, las cuales fueron evaluadas en algunos ensayos *antifouling* (inhibición de sistemas de *quorum sensing* los cuales inhiben la relación asentamiento/fijación¹³) estableciendo de este modo las fracciones más activas, para su posterior separación y el consecuente aislamiento de los compuestos activos, mediante técnicas cromatográficas convencionales y modernas, así como su identificación por técnicas espectroscópicas y espectrométricas (capítulo 2). En la segunda fase de esta investigación, los compuestos aislados fueron sometidos a diversas transformaciones químicas que permitieron obtener una amplia diversidad de compuestos semi-sintéticos análogos a los naturales y con una actividad *antifouling* incrementada, estos compuestos también fueron identificados mediante diversas técnicas espectroscópicas (capítulo 3). En la tercera parte, se seleccionó el mejor compuesto (el de mayor actividad y más baja toxicidad) para proceder a utilizarlo como principio activo en un recubrimiento *antifouling* en campo que pudiera ser utilizado a nivel industrial (capítulo 4). Finalmente y con base en los estudios de estructura química vs. actividad *antifouling* obtenidos se realizó el diseño de una ruta de síntesis total que permitiera obtener el compuesto tipo cembrano más activo (capítulo 5).

⁶ Willemsen, P. R. **1994**. The screening of sponge extracts for antifouling activity using a bioassay with laboratory-reared cyprid larvae of the barnacle *Balanus amphitrite*. *Int. Biodet. Biodegr.* **1**, 361-373.

⁷ Hellio, C.; Marechal, J. P.; Veron, B.; Clare, A. S.; Le-Gal, Y. **2004**. Seasonal variation of antifouling activities of marine algae from the Brittany Coast (France). *Mar. Biotechnol.* **6**, 67-82.

⁸ Tello, E.; Castellanos, L.; Arévalo, C.; Duque, C. **2009**. New cembranoid diterpenes from the caribbean sea whip *Eunicea knighti*. *J. Nat. Prod.* **72**, 1595-1602.

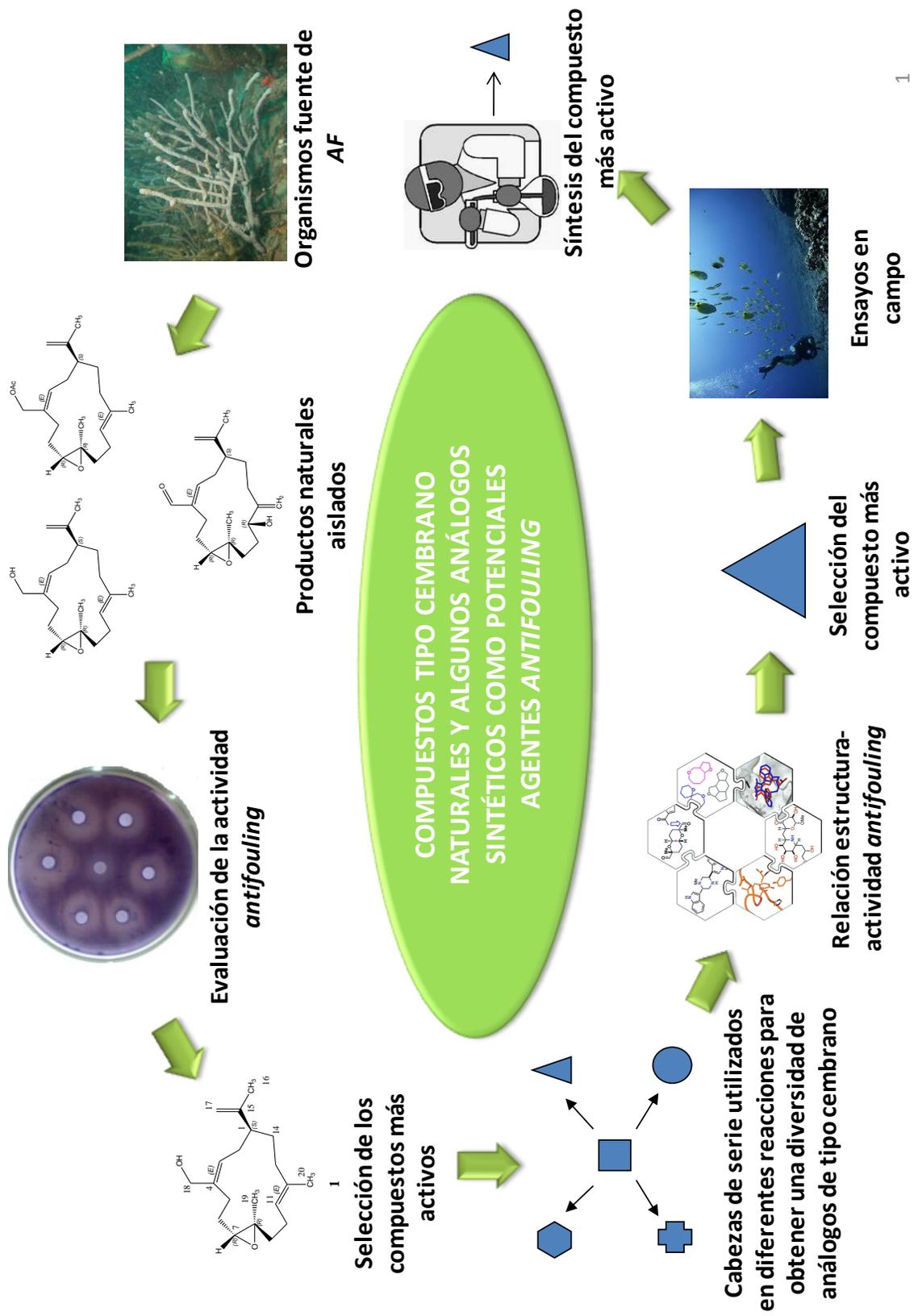
⁹ Tello E. Valoración de las propiedades *antifouling* del coral blando *Eunicea knighti* del Caribe colombiano. Tesis de maestría en Química. Departamento de Química. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia, 2008.

¹⁰ Mora-Cristancho, J.; Arévalo-Ferro, C.; Ramos, F. A.; Tello, E.; Duque, C. C. Lhullier, C.; Falkenberg, M.; Schenkel, E. P. **2011**. Antifouling Activities against Colonizer Marine Bacteria of Extracts from Marine Invertebrates Collected in the Colombian Caribbean Sea and on the Brazilian Coast (Santa Catarina). *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung C.* **66**, 515-526.

¹¹ Cuadrado, C. T. Estudio Químico y evaluación de la actividad *antifouling* en la fracción de diclorometano del octocoral caribeño *Eunicea laciniata*. Trabajo de grado. Departamento de Química. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia, 2007.

¹² Reina, L. E.; Puentes, C. A.; Rojas, J. C. Evaluación de la actividad *antifouling* y estudio químico del extracto del octocoral *Eunicea* sp. del Caribe Colombiano. Trabajo de grado. Licenciatura en Química. Universidad Distrital Francisco José de Caldas. Bogotá, Colombia, 2008.

¹³ Briand, J. F. **2009**. Marine antifouling laboratory bioassays: an overview of their diversity. *Biofouling* **25**, 297-311.



Esquema 1. Representación de la investigación realizada en la presente tesis

1. MARCO TEÓRICO

Colombia es el segundo país en biodiversidad en el mundo, posee costas en dos océanos, tiene el segundo arrecife coralino en extensión en el mar Caribe y sus octocorales crecen profusamente y con una marcada variación quimiotípica comprobada,^{14,15,16,17,18} lo cual hace evidente el compromiso y la necesidad de la nación de estudiar esta biodiversidad mediante una utilización responsable de los recursos y enmarcada en políticas de conservación ambiental, en búsqueda de compuestos de origen marino con aplicaciones medicinales y cosméticas, así como, la solución a algunos problemas tecnológicos para el hombre, como por ejemplo la aplicación en productos útiles para la industria naviera.^{19,20,21}

A pesar de toda esta biodiversidad con que se cuenta en Colombia, la aplicación de los productos naturales en el área medicinal no es un camino fácil, debido a los altos costos económicos que se requieren para llevar un producto natural hasta medicamento;²² sin embargo, la aplicación de compuestos extraídos de organismos marinos al desarrollo de medicamentos es tan solo uno de los caminos que pueden tomar las investigaciones científicas para establecer el uso que podríamos darle a nuestras especies de fauna y flora marina. Por esta razón, y conscientes de la necesidad de valorar en un marco amplio el uso potencial de nuestra biodiversidad, nuestro grupo de investigación ha venido haciendo estudios de algunas de nuestras especies de esponjas, octocorales y últimamente de bacterias asociadas a organismos marinos, con el objetivo principal de conocer su composición química y de establecer la utilidad de los compuestos extraídos de estas especies en el desarrollo de otros productos de uso industrial, por ejemplo los recubrimientos *antifouling*, los cuales aprovechan las propiedades antiépibioticas de algunos compuestos producidos por algunos organismos sésiles para mantener su superficie limpia de colonizadores y defender su espacio vital.^{19,20,21,21} Si bien este esfuerzo ha involucrado un número pequeño de investigadores, ha permitido identificar a los octocorales como un grupo de organismos fuente de compuestos con alto potencial para el desarrollo de nuevos productos *antifouling*.^{8,9}

Los octocorales son los organismos más abundantes en el lecho marino, son miembros conspicuos de la mayoría de las zonas tropicales y subtropicales de los hábitats marinos.^{14,15,23} Los estudios químicos de este interesante grupo de invertebrados marinos comenzaron a principios de los años cincuenta; desde entonces se ha reportado una gran diversidad de estructuras químicas y actividades biológicas de los metabolitos producidos por un grupo relativamente pequeño de gorgónidos recolectados en el mar Caribe y en el

¹⁴ Sánchez, J. Sistemática filogenética del género Eunicea (Lamouroux, 1816) (Octocorallia: Gorgonacea: Plexauridae) con aspectos sobre la historia natural de algunas especies en el Caribe colombiano. Facultad Ciencias. Instituto Ciencias Naturales. Departamento de Biología. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. 1998, p. 134.

¹⁵ Aguilar, C.; Sánchez J. A. **2007**. Phylogenetic reconstruction using secondary structures of Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2, rDNA): Finding the molecular and morphological gap in Caribbean gorgonian corals. *Mol. Phylogenet. and Evol.* **43**, 774-786.

¹⁶ Ardila, N.; Parra, J.; Escobar, D.; Manrique, N.; Sánchez, J. Octocoral abundance and diversity associated to eastern Pacific rocky reefs (Colombia). Ponencia en: 11th International coral reef symposium, Estados Unidos, 2008. Disponible en: http://www.nova.edu/ncr/11icrs/abstract_files/icrs2008-002142.pdf; Fecha de consulta: Noviembre 12 de 2012.

¹⁷ Berrue, F.; Kerr, R. S. **2009**. Diterpenes from gorgonian corals. *Nat. Prod. Rep.* **26**, 681-710.

¹⁸ Duque, C.; Puyana, M.; Castellanos, L.; Arias, A.; Correa, H.; Osorno, O.; Asai, T.; Hara, N.; Fujimoto, Y. **2006**. Further studies on the constituents of the gorgonian octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae* collected in San Andres and Providencia islands, Colombian Caribbean: Isolation of a putative biosynthetic intermediate leading to erogorgiaeno. *Tetrahedron* **62**, 4205 - 4213.

¹⁹ ^aBlunt, J. W.; Coop, B. R.; Keyzers, R. A.; Munro, M. H. G.; Prinsep, M. R. **2013**. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **30**, 237-333 y años anteriores. ^bFaulkner, D. J. **2002**. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **19**, 1-48 y años anteriores.

²⁰ Bhakuni, D. S.; Rawat, D. S. Bioactive marine natural products. Springer-Anamaya Publishers, New Delhi, First Edition, 2005, p. 378.

²¹ Paul, V. J.; Ritson-Williams, R. **2008**. Marine chemical ecology. *Nat. Prod. Rep.* **25**, 662-695.

²² Newman, D. J.; Cragg, G. M. **2012**. Natural products as sources of new drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.* **75**, 311-335 y versiones anteriores 1997, 2003 y 2007.

Indopacífico principalmente.^{14,19,23} Estos organismos poseen moléculas con estructuras nuevas y novedosas que son en gran parte desconocidas en fuentes terrestres,^{17,19} entre ellos pueden mencionarse los diterpenos como constituyentes mayoritarios; las acetogeninas, sesquiterpenos, prostanglandinas y en algunos casos, esteroides altamente funcionalizados, como metabolitos minoritarios.^{17,19,23}

A continuación, se presentan en orden cronológico todos los estudios de compuestos tipo cembrano con actividad *antifouling* (sección 1.1.), algunos estudios relevantes sobre síntesis y semisíntesis de análogos tipo cembrano con miras a potenciar una actividad biológica establecida (sección 1.2.), un estudio de relación estructura-actividad *antifouling* (sección 1.3.), los aspectos más sobresalientes sobre el proceso del *fouling* (sección 1.4.) y la descripción de algunos ensayos *antifouling* (1.5.) reportados en la literatura de acuerdo a la revisión realizada empleando el programa Scifinder Scholarship y las bases de datos CAPLUS, CHEMCATS, MEDLINE y CHEMLIST de la American Chemical Society (ACS) a través de internet, así como los artículos de revisión de Faulkner, D. J. en el Nat. Prod. Rep. desde 1984 hasta 2002 y Blunt *et al.*, en el Nat. Prod. Rep. desde 2003 hasta la fecha,¹⁹ y la base de datos MarinLit de la Universidad de Canterbury (Nueva Zelanda, 2013).

1.1. COMPUESTOS NATURALES CON ACTIVIDAD ANTIFOULING TIPO CEMBRANO AISLADOS DE OCTOCORALES

La gran atención que se les ha prestado a los octocorales, se debe a los compuestos presentes en ellos, particularmente los de tipo diterpeno, algunos con núcleos inusuales, estructuralmente interesantes por su novedad, y por los nuevos y más efectivos mecanismos de acción o bioactividad que han mostrado. Entre los compuestos generalmente aislados de este orden, se destacan los de núcleo cembrano, pseudoterano, amflectano, dolabelano, serrulatano y briarano.^{17,19,23} Entre ellos, los cembranos, amflectanos y briaranos son los grupos más abundantes.

Estudios de actividad biológica sobre algunos de estos compuestos aislados de muchas especies de octocorales, han mostrado un amplio rango de actividades entre las que se incluyen: anticancerígena (más común),²⁴ antiinflamatoria,^{25,26} anti-bacterial,^{27,28} anti-viral y anti-malárica²⁹; así como, estudios ecológicamente relevantes como disuasivos de la depredación contra peces^{17,23,20,21,22} y recientemente como fuente de compuestos *antifouling*^{3,8,10,30} e inhibidores del *quorum sensing* bacteriano.^{8,31}

En 1996, Clare y colaboradores aislaron del octocoral *Leptogorgia virgulata* dos compuestos con núcleo cembrano, la pukalida y la epoxipukalida, los cuales mostraron inhibición del asentamiento y metamorfosis de larvas *cypris* del cirripedio cosmopolita *B. amphitrite* (19,0 ng/mL), uno de los principales organismos del *macrofouling*.³²

²³ Rodríguez, A. D. **1995**. The natural products chemistry of west Indian gorgonian octocorals. *Tetrahedron* 51, 4571-4618.

²⁴ Ortega, M. J.; Zubía, E.; Sánchez, M. C.; Carballo, J. L. **2008**. Cembrane diterpenes from the gorgonian *Leptogorgia laxa*. *J. Nat. Prod.* 71, 1637-1639.

²⁵ Chih-Hua, C.; Zhi-Hong, W.; Yang-Chang, W.; Hsiao-Chien, Y.; Jyh-Horng, S. **2008**. Cytotoxic and Anti-inflammatory cembranoids from the soft coral *Lobophytum crassum*. *J. Nat. Prod.* 71, 1819-1824.

²⁶ Lu, Y.; Huang, C.; Lin, Y.; Wen, Z.; Su, J. H.; Kuo, Y. H.; Chiang, M. Y.; Sheu, J. H. **2008**. Anti-inflammatory cembranoids from the soft corals *Sinularia querciformis* and *Sinularia granosa*. *J. Nat. Prod.* 71, 1754-1759.

²⁷ Shi-Yie, C.; Zhi-Hong, W.; Shang-Kwei, W.; Shu-Fen, C.; Chi-Hsin, H.; Chang-Feng, D.; Chiang, M. Y.; Chang-Yih, D. **2009**. Unprecedented hemiketal cembranolides with anti-inflammatory activity from the Soft Coral *Lobophytum durum*. *J. Nat. Prod.* 72, 152-155.

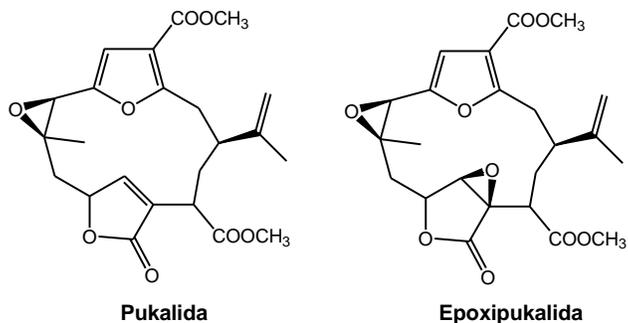
²⁸ Kamel, H. N.; Ding, Y.; Li, X.; Ferreira, D.; Fronczek, F. R.; Slattey, M. **2009**. Beyond polymaxenolide: cembrane-africanane terpenoids from the hybrid soft coral *Sinularia maxima* × *S. polydactyla*. *J. Nat. Prod.* 72, 900-905.

²⁹ Wei, X.; Rodríguez, A. D.; Baran, P.; Raptis, R. G.; Sánchez, J. A.; Barria, O. E.; Gonzáles, J. **2004**. Antiplasmodial cembradiene diterpenoids from a southwestern Caribbean gorgonian octocoral of the genus *Eunicea*. *Tetrahedron* 60, 11813-11819.

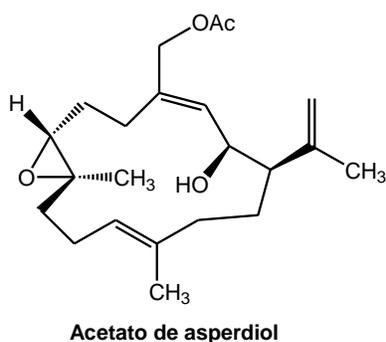
³⁰ Qi, S.; Zhang, S.; Qian, P.; Xiao, Z.; Li, M. **2006**. Ten new antifouling briarane diterpenoids from the south China sea gorgonian *Junceella juncea*. *Tetrahedron* 62, 9123-9130.

³¹ Skindersoe, M. E.; Ettinger-Epstein, P.; Rasmussen, T. B.; Bjarnsholt, T.; Nys, R.; Givskov, M. **2008**. Quorum sensing antagonism from marine organisms. *Mar. Biotech.* 10, 56-63.

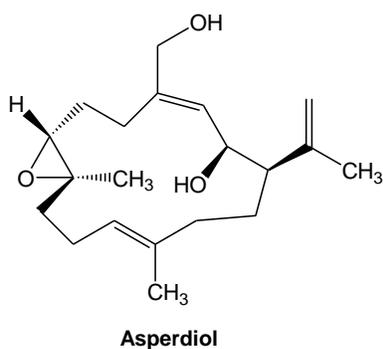
³² Clare, A. S. **1996**. Marine natural product antifoulants: Status and potential. *Biofouling* 9, 211-229.



Rodríguez y Acosta en 1997 aislaron el cembrano derivado monoacetilado del asperdiol, a partir de *E. succinea*,³⁴ recolectada en la Isla de Mona en el mar Caribe de Puerto Rico, su estructura fue elucidada mediante métodos espectroscópicos y transformaciones químicas. Tello *et al.*, en el 2009 aislaron también el acetato de asperdiol pero de la especie *E. knighti* recolectada en Santa Marta, Colombia y en ensayos *in vitro* se pudo establecer una moderada actividad antimicrobiana contra un panel de seis bacterias marinas asociadas al *fouling* (30,0 µg/disco) (Figura 1.1.).⁸



El asperdiol es un cembrano aislado de *Eunicea aspérula* de la región Caribe en 1997 y cuya estructura fue elucidada mediante Rayos-X.^{33,34} Tello *et al.*, en el 2009 aislaron de *E. Knighti* este mismo compuesto y por medio de ensayos antibacteriales utilizando bacterias asociadas al *fouling* se pudo establecer una actividad moderada contra *Bacillus* sp. (4,0 µg/disco) (Figura 1.1.).⁸

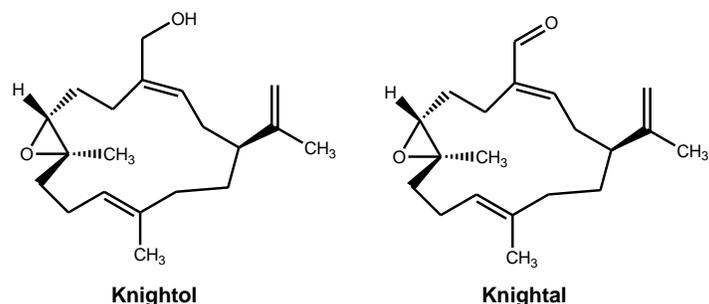


A nivel local, en nuestro grupo de investigación se han aislado una gran variedad de compuestos con actividad *antifouling*, principalmente de octocorales del género *Eunicea*, uno de ellos fue el desarrollado por

³³ Weinheimer, A. J.; Spraggins, R. L. 1969. The occurrence of two new prostaglandin derivatives (15-epi-PGA2 and its acetate, methyl ester) in the gorgonian *Plexaura homomalla* chemistry of coelenterates. XV. *Tetrahedron Lett.* 59, 5185-5188.

³⁴ Rodríguez, A. D.; Acosta, A. L. 1997. New cembranoid diterpenes and a geranylgeraniol derivative from the common Caribbean sea whip *Eunicea succinea*. *J. Nat. Prod.* 60, 1134-1138.

Tello *et al.*, en el 2009,^{8,9} en el cual se aislaron del octocoral *Eunicea knighti* los compuestos novedosos tipo cembrano knightol (2,0 µg/disco contra Gram +) y knightal (8,0 µg/disco contra Gram -) los cuales presentaron actividad *antifouling* en ensayos *in vitro* contra seis bacterias asociadas al *fouling*.



Adicionalmente, estos cembranos, también inhibieron los sistemas de comunicación bacteriana en *Escherichia coli* pS401 (100,0 µg/disco) y también presentaron inhibición del asentamiento contra micro- y macroalgas y el de algunos invertebrados (Figura 1.1.).

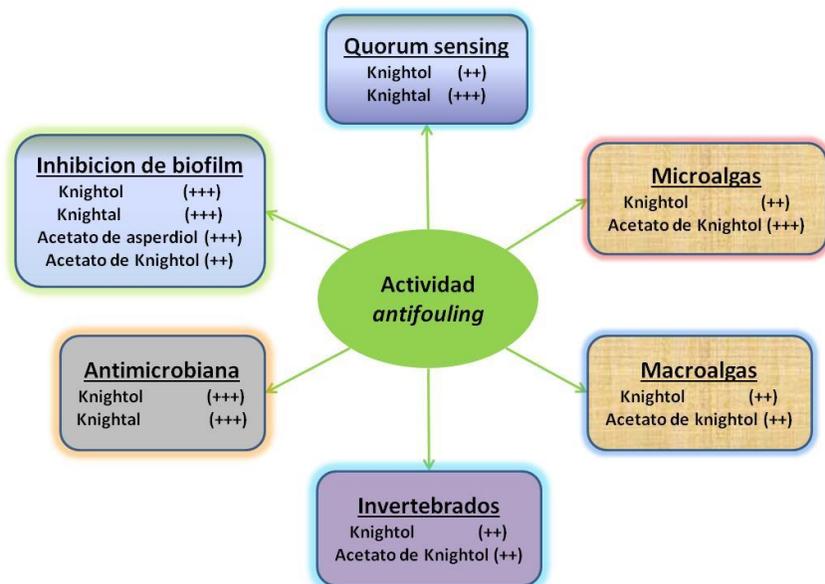
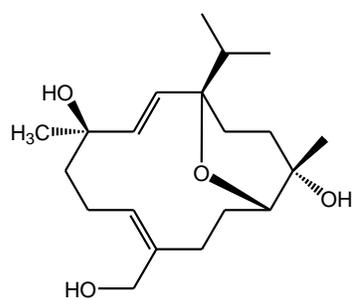


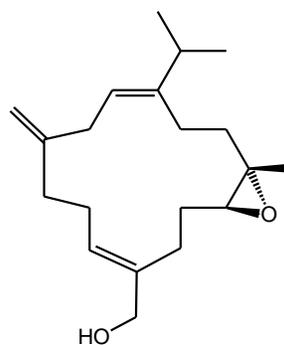
Figura 1.1. Evaluación de la actividad antifouling de compuestos aislados de octocorales del Caribe Colombiano en nuestro grupo de investigación.

Los cembranos Sinulariol *J* y Sinulariol *P* fueron aislados del coral blando *S. rigida* en un estudio realizado en el 2011.³⁵ Los compuestos fueron elucidados con base en los análisis espectroscópicos mono- y bidimensionales así como en su espectro de masas y su actividad *antifouling* fue establecida contra la inhibición del asentamiento larval de *B. amphitrite* y *B. neritina*, encontrando que el compuesto *J* inhibió significativamente el asentamiento larval en *B. amphitrite* (5.65 µg/mL), mientras que *P* mostró una moderada inhibición contra la adhesión de *B. neritina* (14.03 µg/mL).

³⁵ Lai D. Li, Y.; Xu, M.; Deng, Z.; Ofwegen, L. V.; Qian, P.; Proksch, P. Lin, W. **2011**. Sinulariols A-S, 19-oxygenated cembranoids from the Chinese soft coral *Sinularia rigida*. *Tetrahedron* 67, 6018-6029.

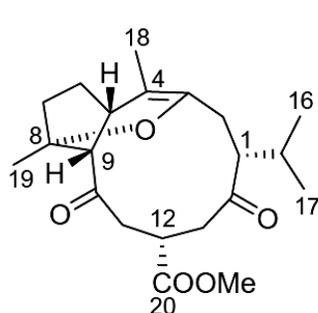


Sinulariol J

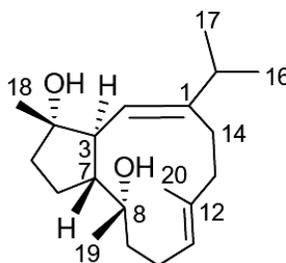


Sinulariol P

Un estudio de la composición química del coral blando *S. pavida* realizado en el 2012 condujo al aislamiento de los cembranos Pavidólidos C y D, su identificación estructural fue realizada mediante extensos análisis de los datos espectroscópicos. Estos cembranos mostraron una moderada inhibición contra el asentamiento larval del cirripedio *B. amphitrite* (4.32 $\mu\text{g/mL}$; 2.12 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) y una baja toxicidad (>50 $\mu\text{g/mL}$).³⁶

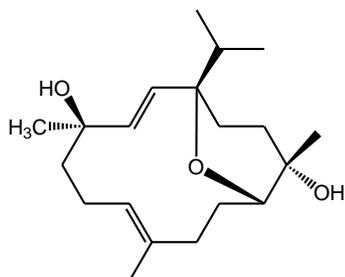


Pavidólido C

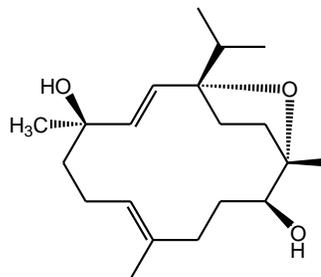


Pavidólido D

Finalmente, un análisis químico del coral blando *Sinularia rigida* realizado en el 2013 permitió aislar los cembranos Sinulariol Z y el (2*E*,7*E*)-4,11-dihidroxi-1,12-oxidocebra-2,7-dieno, los cuales fueron identificados con base en sus datos espectroscópicos de RMN y en su espectro de masas.³⁷ El sinulariol Z y el (2*E*,7*E*)-4,11-dihidroxi-1,12-oxidocebra-2,7-dieno mostraron una potente actividad *antifouling* en la inhibición del cirripedio *Balanus amphitrite* (4.57 $\mu\text{g/mL}$; 4.86 $\mu\text{g/mL}$) y una moderada inhibición contra *Búgula neritina* (13.48 $\mu\text{g/mL}$; 12.34 $\mu\text{g/mL}$), respectivamente.



Sinulariol Z



(2*E*,7*E*)-4,11-dihidroxi-1,12-oxidocebra-2,7-dieno

³⁶ Shen, S.; Zhu, H.; Chen, D.; Liu, D.; Ofwegen, L. V.; Proksch, P.; Lin, W. **2012**. Pavidolides A–E, new cembranoids from the soft coral *Sinularia pavida*. *Tetrahedron Letters*. *Tetrahedron Lett.* 53, 5759–5762.

³⁷ Lai, D.; Geng, Z.; Deng, Z.; Ofwegen, L. V.; Proksch, P.; Lin, W. **2013**. Cembranoids from the soft coral *Sinularia rigida* with antifouling activities. *J. Agric. Food Chem.* 61(19), 4585–4592.

De la revisión bibliográfica mostrada es evidente que los octocorales son fuente de diterpenos con núcleo cembrano, muchos de ellos con actividades citotóxica, antiinflamatoria, antibacteriana (no mostrada en este capítulo) y también con actividad *antifouling*. Estos resultados han despertado un inmenso interés por parte de los químicos hacia el estudio de los octocorales, ya que se hace evidente que estos organismos son una fuente muy importante de compuestos bioactivos, no solo para su posible aplicación a nivel farmacológico sino también a nivel industrial como agentes *antifouling*; además, las cantidades relativamente altas (niveles de multigramos) en las cuales algunos de estos metabolitos se encuentran en los octocorales, los hacen excelentes candidatos para realizar diversos estudios biológicos con análogos semi-sintéticos obtenidos a partir de cembranos naturales en busca de mejorar una actividad específica. Todo lo anterior es una clara evidencia de que los compuestos tipo cembrano pueden llegar a ser potenciales agentes *antifouling* y ser incorporados en recubrimientos industriales capaces de proteger superficies sumergidas contra agentes colonizadoras.

1.2. COMPUESTOS SINTÉTICOS Y SEMI-SINTÉTICOS TIPO CEMBRANO

1.2.1. Compuestos semi-sintéticos tipo cembrano

Desde hace aproximadamente 26 años se han publicado varios estudios acerca de la semi-síntesis de diterpenos de la familia de los cembranos (62 trabajos reportados en la base de datos scifinder desde 1986 hasta 2013). En muchos de estos estudios se muestran diversas modificaciones realizadas a compuestos tipo cembrano naturales, tales como acetilaciones, aperturas de epóxidos, oxidaciones, reducciones, metilaciones, transposiciones, rearrreglos cíclicos, saponificaciones entre otras.^{38,39,40,41} Estas modificaciones estructurales se han realizado en la mayoría de los casos con el propósito de mejorar una actividad específica (principalmente citotoxicidad) mostrada por el precursor natural, encontrando que en algunos casos la actividad de los análogos es mejor que la de los compuestos naturales aislados. Este hecho ha despertado el interés hacia el estudio de análogos sintéticos de cembranos naturales en busca de una mejor actividad específica. A continuación se muestran algunos de estos casos.

En el 2002 el cembranolido natural sarcófina y su derivado sarcófina A, fueron oxidados usando dióxido de selenio (SeO₂) a diferentes temperaturas para preparar derivados hidroxilados.⁴² En este proceso se obtuvieron cinco compuestos (sarcófinas B-F). La determinación de la estereoquímica, así como la selectividad observada en estas reacciones fueron discutidas con base en RMN 2D y modelamientos moleculares. Tanto el compuesto natural como los derivados semi-sintéticos fueron evaluados en ensayos *in vitro* contra la inhibición de la activación del virus Epstein-Barr (VEB), determinando que las sarcófinas B, C-F presentaron una mayor actividad que su precursor natural, principalmente el compuesto F (96% de inhibición) exhibió una potente actividad inhibitoria de VEB.⁴²²

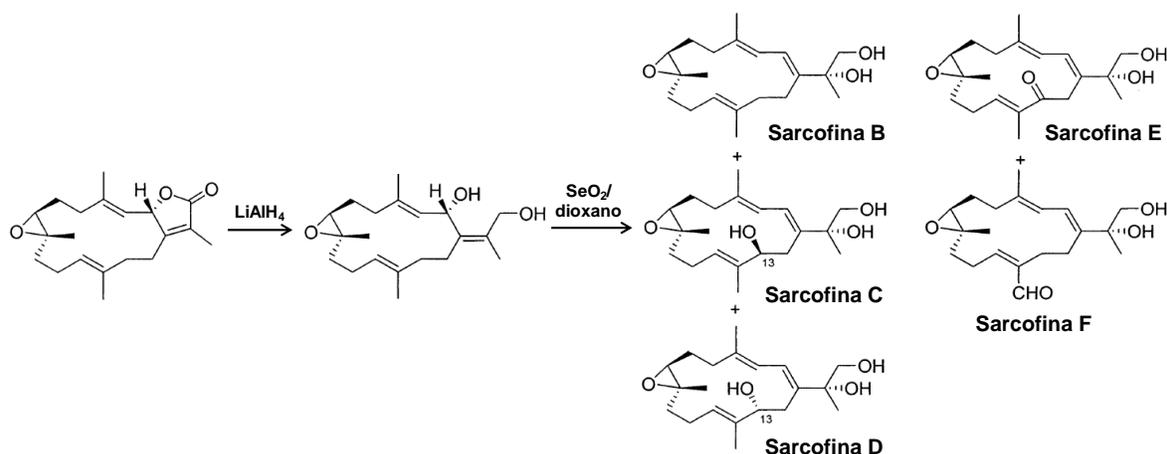
³⁸ Rodríguez, A. D.; Piña, I. C.; Acosta, A. L.; Barnes, C. L. **2001**. Synthesis of cytotoxic cembranolide analogues via acid-induced opening of oxiranes. *Tetrahedron* *57*, 93-107.

³⁹ Rodríguez, A. D.; Piña, I. C.; Acosta, A. L.; Ramírez, C.; Soto, J. J. **2001**. Synthesis of analogues of *Eunicea* γ -cembranolides containing cyclic ethers via saponification. *J. Org. Chem.* *66*, 648-658.

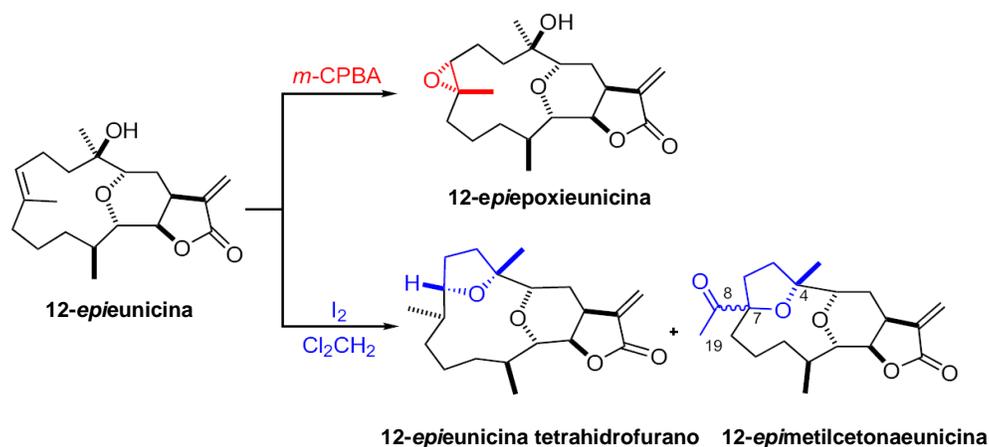
⁴⁰ Fattorusso, E.; Romano, A.; Tagliatalata-Scafati, O.; Irace, C.; Maffettone, C.; Bavestrello, G.; Cerrano, C. **2009**. Oxygenated cembranoids of the decaryol type from the Indonesian soft coral *Lobophytum* sp. *Tetrahedron* *65*. 2898–2904.

⁴¹ Nii, K.; Tagami, K.; Matsuoka, K.; Munakata, T.; Ooi, T.; Kusumi, T. **2006**. Unusual transannular cyclization products of sarcophytoxide, a 14-membered marine cembranoid: anomalous stereochemistry of epoxide-ketone rearrangement. *Org. Lett.* *8*, 2957-2960.

⁴² Katsuyama, I.; Fahmy, H.; Zjawiony, J. K.; Khalifa, S. I.; Kilada, R. W.; Konoshima, T.; Takasaki, M.; Tokuda, H. **2002**. Semisynthesis of new sarcophine derivatives with chemopreventive activity. *J. Nat. Prod.* *65*, 1809-1814.



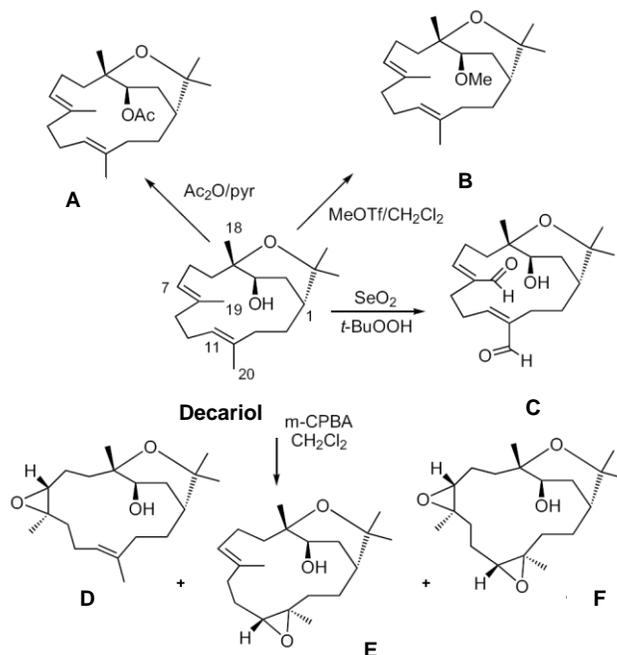
En el 2006 el cembranólido natural 12-*epieunicina* fue aislado del octocoral *Eunicea mammosa* recolectada en Bahamas, su estructura fue establecida por métodos espectroscópicos y cálculos de minimización de energías,⁴³ y con el fin de establecer algunos estudios de relación estructura-actividad citotóxica, se obtuvieron algunos análogos semi-sintéticos de la 12-*epieunicina*. El compuesto 12-*epiepoxieunicina* fue obtenido mediante una epoxidación, el compuesto 12-*epieunicina*-tetrahidrofurano presentó la formación de un anillo tipo tetrahidrofurano debido a la ciclación intramolecular entre el oxígeno en C4 y el carbono C-7, mientras el compuesto 12-*epimetilcetonaunicina* presentó una formación de una metil cetona unida a C-7 implicando un rearrreglo del esqueleto carbonado. Los compuestos naturales así como los semi-sintéticos fueron evaluados contra las líneas celulares tumorales A549 (carcinoma de pulmón humano), H116 (carcinoma de colon humano), PSN1 (adenocarcinoma pancreático humano) y T98G (glioblastoma humano), encontrando una actividad moderada para los análogos y es de resaltar que el análogo sintético 12-*epieunicina*-tetrahidrofurano presentó una mayor potencia que el precursor natural.⁴³³



Fattorusso *et al.*, en el 2009 aislaron algunos cembranos del coral blando *Lobophytum* sp. recolectado en la Isla de Siladen en Indonesia, sus estructuras fueron establecidas a través de análisis espectroscópicos, aplicación del método de Mosher e interconversiones químicas.⁴⁰ Adicionalmente, con el fin de potenciar la actividad citotóxica encontrada en el cembrano natural decariol, un potente agente inhibidor del crecimiento celular, se prepararon seis derivados semi-sintéticos (decariólidos A-F), el compuesto A fue obtenido por medio de una acetilación, el B por una metilación, el C por una oxidación vinílica selectiva y los compuestos D-F por epoxidación en los dobles enlaces. Estos derivados fueron evaluados en ensayos de

⁴³ Nieto, M. I.; González, N.; Rodríguez, J.; Kerr, R. G.; Jiménez, C. 2006. New cytotoxic cembranolides: isolation, biogenética studies, and synthesis of analogues. *Tetrahedron* 62, 11747–11754.

inhibición del crecimiento de líneas celulares (H9c2 mioblastos cardiacos, C6 glioma y HeLa carcinoma epitelial), encontrando que el derivado semi-sintético *O*-metil-decariol B exhibió una significativa y selectiva actividad contra la línea celular C6 (glioma) inclusive mejor que la mostrada por el compuesto natural.⁴⁰



1.2.2. Síntesis total de cembranos

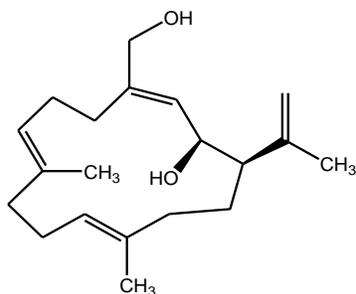
En muchas ocasiones, el desarrollo de compuestos bioactivos hasta medicamentos o productos industriales no es exitoso, debido a la poca cantidad con la que se cuenta del metabolito, razón por la cual se debe recurrir a otros métodos para la obtención de estos compuestos en mayor cantidad, tales como la acuicultura, maricultura, cultivo celular, síntesis y síntesis combinatoria.²² La síntesis es de gran ayuda cuando se trata de una molécula objetivo a la cual se puede llegar en relativamente pocos pasos y con un aceptable rendimiento global.

En la literatura se encuentran algunos estudios acerca de la síntesis total de cembranos, entre ellos, los estudios realizados por Tius y Fauq en 1985,⁴⁴ por Kato y colaboradores en 1986⁴⁵ y por Marshall y colaboradores en 1986,⁴⁶ en los cuales se realiza la síntesis enantioselectiva convergente del (+)-desepoxyasperdiol, el cembrano antitumoral (±)-asperdiol y el isolobofitólido, respectivamente. La síntesis total de estas moléculas fueron unas de las primeras aproximaciones sintéticas desarrolladas en la síntesis de cembranos desarrolladas en la literatura.

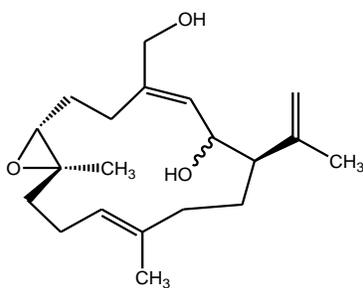
⁴⁴ Tius, M. A.; Fauq, A. H. **1986**. Total Synthesis of (+)-Desepoxyasperdiol. *J. Am. Chem. Soc.* *108*, 1035-1039.

⁴⁵ Kato, T.; Aoki, M.; Uyehara, T. **1986**. Synthesis of (±)-asperdiol, an anticancer cembranoid. *J. Org. Chem.* *52*, 1803-1810.

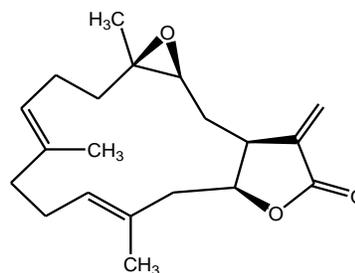
⁴⁶ Marshall, J. A.; Andrews, R. C.; Lebiodaf, L. **1986**. Synthetic studies on cembranolides. stereoselective total synthesis of isolobophytolide. *J. Org. Chem.* *52*, 2378-2388.



(+)-desepoxiasperdiol

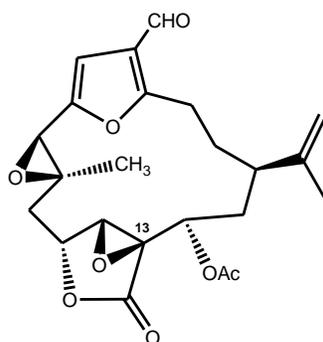


(±)-asperdiol



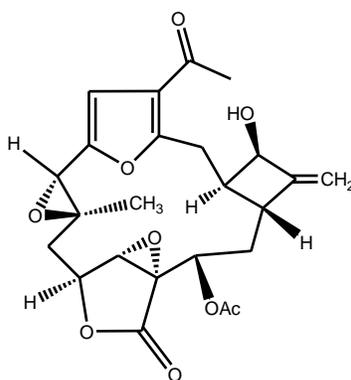
isolobofitólido

Otro estudio relevante fue el desarrollado por Wipf y Grenon en Pittsburgh, Estados Unidos en el 2006.⁴⁷ En este estudio, además de haber realizado avances en la síntesis total de la lophotoxina, un furanocembranólido con potente actividad citotóxica, se resalta la incorporación de un centro asimétrico (C-13) por medio de una desimetrización catalítica de un anhídrido meso cíclico.



Lophotoxina

Una aproximación sintética a la unión de una subestructura furilciclobutano en el furanocembranoide Providencina a partir de un precursor común de ciclobutano, fue desarrollada por Schweizer *et al.*, en el 2007 en Austria.⁴⁸

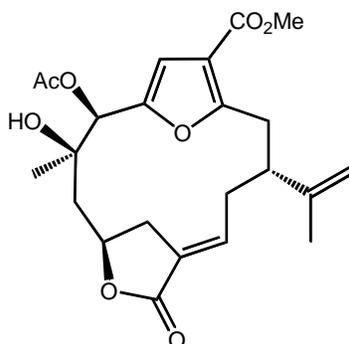


Providencina

⁴⁷ Wipf, P.; Grenon, M. **2006**. Toward the total synthesis of lophotoxin - New methodologies and synthetic strategies. *Can. J. Chem.* **84**, 1226-1241.

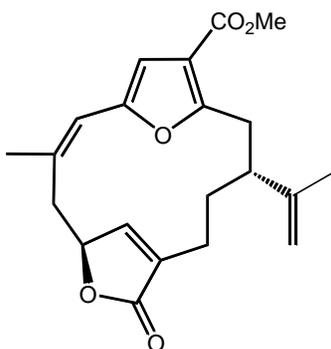
⁴⁸ Schweizer, E.; Gaich, T.; Brecker, L.; Mulzer, J. **2007**. Synthetic studies towards the total synthesis of providencin. *Synthesis* **24**, 3807-3814.

Otro estudio realizado por el grupo de Pattenden también en el 2010,⁴⁹ fue la síntesis de la danielida, un macrociclo oxigenado e insaturado perteneciente a los furanocembranoides. La aproximación sintética consistió en una condensación intermolecular tipo Knoevenagel junto con una aldolización intramolecular para obtener el anillo furano y la lactona, respectivamente.



Danielida

Uno de los de mayor relevancia y más reciente fue el desarrollado por Pattenden en el 2010,⁵⁰ en este trabajo se realizó la síntesis total de la (+)-Z-deoxipukalida usando una combinación de las reacciones de acoplamiento de Stille y Nozaki-Hiyama-Kishi (NHK) como pasos claves. El compuesto (+)-Z-deoxipukalida es un derivado de la pukalida, el primer cembrano miembro de los furanobutenólidos en ser aislado de un coral.



(+)-Z-deoxipukalida

Todos estos estudios en los cuales se realiza la síntesis del asperdiol y algunos análogos, son un gran camino recorrido, el cual permite tener referentes metodológicos para establecer rutas sintéticas en la síntesis de este tipo de moléculas.

1.3. ALGUNOS ESTUDIOS DE LA RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD *ANTIFOULING* DE TERPENOS MARINOS

Hasta ahora en el texto se han mostrado una gran variedad de compuestos naturales, así como sintéticos con núcleo cembrano como potenciales agentes farmacológicos e industriales. Este hecho nos motiva a realizar estudios de relación estructura-actividad con los compuestos tipo cembrano, teniendo en cuenta

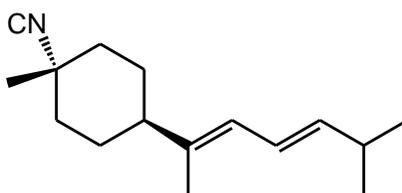
⁴⁹ Pattenden, G.; Winne, J. M. **2010**. Synthetic studies towards oxygenated and unsaturated furanocembranoid macrocycles. Precursors to plumarellide, rameswaralide and mandapamates. *Tetrahedron Lett.* 51, 5044–5047.

⁵⁰ Tang, B.; Bray, C. D.; Pattenden, G.; Rogers, J. **2010**. Total synthesis of (+)-Z-deoxypukalide, a furanobutenolide-based cembranoid isolated from the pacific octocoral *Leptogorgia* spp. *Tetrahedron* 66, 2492–2500.

que las modificaciones estructurales que se le pueden realizar a una molécula modifican algunos de sus parámetros fisicoquímicos (capacidad de atravesar membranas, interacción con receptores, etc) que en última instancia afectan su bioactividad.

Acerca de esta relación estructura-actividad existen muchos estudios a nivel farmacológico, los cuales han permitido desarrollar modelos computacionales con los cuales se pueden hacer aproximaciones para encontrar la mejor relación estructura-actividad ante una actividad específica, por ejemplo algunos estudios de actividad antiinflamatoria pueden llevar a establecer cuál de los posibles mecanismos de inhibición de la inflamación se está presentando para un determinado compuesto o farmacóforo, es decir, si se están inhibiendo específicamente las enzimas ciclo-oxigenasa y lipo-oxigenasa (COX-1 y COX-2) y de este modo evitar la formación de los mediadores proinflamatorios prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos, o si se está inhibiendo la enzima óxido nítrico sintasa (iNOS), la cual es la responsable de la formación del óxido nítrico, por mencionar sólo algunos de los mecanismos.⁵¹ Sin embargo, cuando se habla de compuestos *antifouling* no se conocen estudios de relación estructura-actividad, este hecho es debido principalmente, a que en muchos casos son demasiados los organismos involucrados en un *hábitat* marino, por lo cual son demasiadas las interacciones que se presentan entre el agente activo y los diversos organismos, por esta razón no se puede establecer un solo mecanismo de acción o de relación estructura-actividad, tan solo se pueden establecer los mecanismos para un individuo en un medio donde existen miles de especies. Desafortunadamente para los cembranos no se han reportado ningún estudio de relación estructura-actividad *antifouling* hasta nuestro conocimiento. Sin embargo consideramos pertinente mencionar a continuación de manera resumida un ejemplo de una aproximación a la aplicación de un modelo REA *antifouling* que permitió desarrollos industriales, y el cual fue hecho a lo largo de 12 años por Nogata y Kitano y presentado en el 2006.⁵² En este trabajo se desarrollaron una gran variedad de análogos sintéticos de terpenoides con función isociano, con el fin de encontrar un mejor agente *antifouling* y estructuralmente sencillo, para incorporarlo en un recubrimiento industrial.

En este estudio se reporta que desde 1972 se han aislado cerca de 200 compuestos con funciones isociano, isotiocianato y derivados de formamida con propiedades *antifouling* aislados de esponjas de las familias *Axinellidae* y *Hallichondriidae*. Algunos de estos compuestos han presentado una excelente actividad en ensayos *in vitro*; uno de ellos, la 3-isocianoteonellina con función isociano es uno de los compuestos más activos aislado de la esponja *Acanthella cavernosa*; su actividad *antifouling* fue establecida mediante el ensayo de inhibición del asentamiento de las larvas *cipryds* del cirripedio *Balanus amphitrite* (CE₅₀ 0.13 µg/ml y DL₅₀ >100 µg/ml).⁵²



3-isocianoteonellina

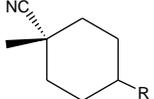
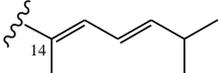
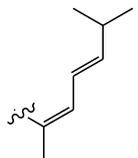
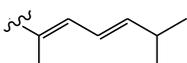
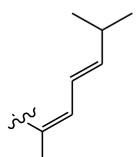
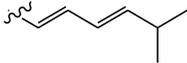
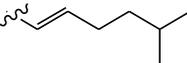
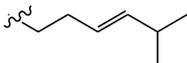
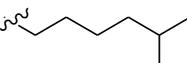
Este resultado junto con el de otros compuestos de estructura relacionada, permitió proponer a los compuestos con función isociano como buenos candidatos a agentes *antifouling*, por lo cual los autores procedieron a realizar estudios de relación estructura-actividad *antifouling* por medio de la síntesis de una gran variedad de análogos relacionados con el compuesto 3-isocianoteonellina,⁵² los cuales se muestran en la tabla 1.1.

⁵¹ Correa, H.; Valenzuela, A. L.; Ospina, L. F.; Duque, C. **2009**. Anti-inflammatory effects of the gorgonian *Pseudopterogorgia elisabethae* collected at the Islands of Providencia and San Andrés (SW Caribbean). *J. Inflamm.* (Lond) *10*, 6:5.

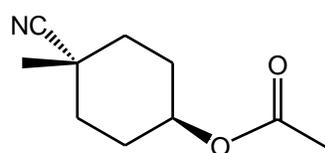
⁵² Nogata, Y.; Kitano, Y. Isocyanide compounds as non-toxic antifoulants. En: *Antifouling Compounds*, Fusetani, N.; Clare, A. S. Ed. Berlin-Heidelberg, Springer, 2006, pp. 87-104.

Al evaluar estos compuestos en el ensayo contra larvas *cypris* de cirripedios, pudieron establecer que los estereoisómeros R1-R3 fueron más activos que el control positivo usado CuSO_4 (Tabla 1.1). Los dienos (Z y E) R2 y R4, isómeros geométricos de la 3-isocianoteonellina y R3, también exhibieron potente actividad, aunque fueron ligeramente menos activos. Además, todos los compuestos mostraron una baja toxicidad contra los cirripedios a altas concentraciones, comparados con el patrón usado CuSO_4 (2.95 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Estos resultados sugirieron que la estereoquímica del grupo isociano en C-3 y la geometría del butadieno no afectaba ni la actividad, ni la toxicidad. Las diferentes modificaciones estructurales del grupo butadieno (análogos R5-R8) influenciaron la actividad *antifouling*, por ejemplo la ausencia del metilo en C-14 en el análogo R5 condujo a una disminución de la actividad, aunque las razones de este hecho no pudieron ser claramente establecidas.

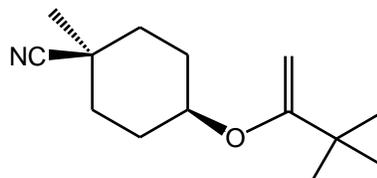
Tabla 1.1. Análogos de la 3-isocianoteonellina y su actividad *antifouling*⁵²

Compuesto	Geometría		CE_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	DL_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
R1	<i>trans</i>		0.19	>100
R2	<i>trans</i>		0.29	>100
R3	<i>cis</i>		0.18	>100
R4	<i>cis</i>		0.41	>100
R5	<i>cis</i>		1.80	>100
R6	<i>cis</i>		7.20	>100
R7	<i>cis</i>		1.80	>100
R8	<i>cis</i>		3.80	>100
CuSO_4	-	-	0.30	2.95

Posteriormente, se sintetizaron y evaluaron una gran variedad de isocianociclohexanos con grupo funcional oxigenado en el C-4, en lugar de la cadena isoprenílica, encontrando que el acetato de isocianociclohexano (0.0096 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y el pivaloato de isocianociclohexano (0.019 $\mu\text{g}/\text{ml}$) fueron mucho más activos que el CuSO_4 y mostraron una baja toxicidad.⁵²

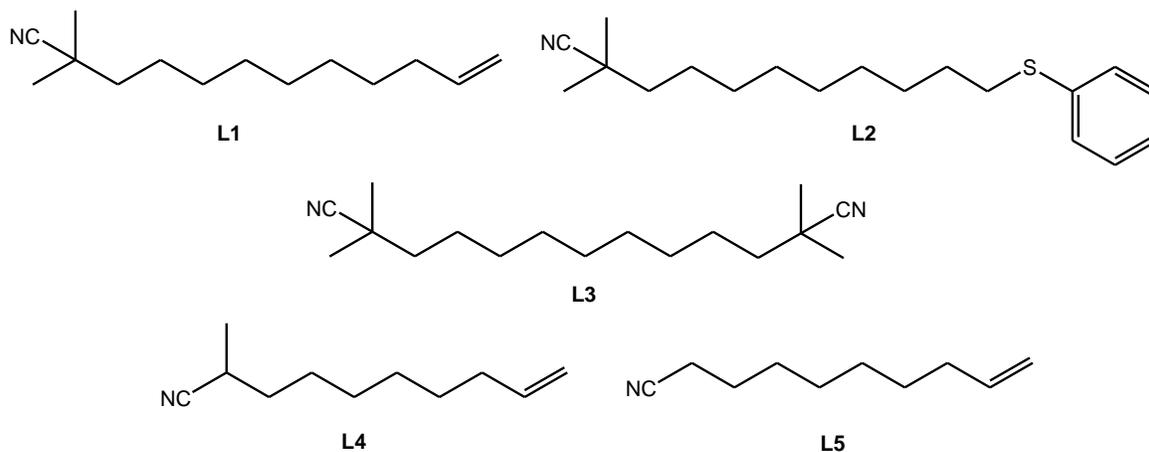


Acetato de isocianociclohexano



Pivalato de isocianociclohexano

Estudios adicionales de relación estructura-actividad *antifouling*, pero usando análogos sintéticos tipo isociano lineal,⁵² les condujo a establecer que la mayoría de los compuestos sintetizados y evaluados poseen una potente actividad *antifouling* con una baja toxicidad, en particular el alqueno L1 (0.046 $\mu\text{g/ml}$) y el sulfuro L2 (0.056 $\mu\text{g/ml}$) mostraron los mejores valores de actividad *antifouling* y bajas toxicidades, mejores aún que los del CuSO_4 y que la 3-isocianoteonellina. Es importante notar que aunque el diisociano L3 presentó una buena actividad, no fue tan activo como el compuesto alqueno L1 a pesar de tener dos grupos isociano. Adicionalmente, los resultados obtenidos en los ensayos *antifouling* para compuestos con función isociano, los cuales tenían variaciones solamente en este grupo funcional (isociano primario, secundario y terciario), les permitió establecer que la actividad se veía favorecida si el isociano era terciario (L1 (0.046 $\mu\text{g/ml}$), L4 (0.48 $\mu\text{g/ml}$) y L5 (0.14 $\mu\text{g/ml}$)).⁵²



Todos estos resultados de ensayos *in vitro* sugirieron al compuesto L1 como el mejor candidato *antifouling*, el cual fue incorporado en un recubrimiento *antifouling* experimental y usado en ensayos en campo, mostrando excelentes resultados durante los tres meses que duró la prueba.⁵² Estos resultados determinaron que este tipo de compuestos representan un modelo muy útil para el desarrollo de una pintura *antifouling*; además, este ejemplo nos muestra claramente cómo se puede aprovechar el uso de la relación estructura-actividad *antifouling*, la semi-síntesis y la síntesis para obtener un compuesto con excelentes características *antifouling*.

En conclusión de lo visto hasta ahora, algunos compuestos aislados de organismos marinos incluyendo los de tipo cembrano, han presentado actividad *antifouling*, esta actividad ha sido potenciada en el caso de los terpenos isociano arriba mencionados preparando algunos análogos sintéticos. Este hecho despertó nuestro interés por comprender la importancia del desarrollo de nuevos análogos tipo cembrano para así poder realizar una aproximación a la relación estructura-actividad *antifouling*. Así mismo, este conocimiento nos permitió ir un paso más allá y seleccionar el mejor agente *antifouling* (el más potente y estructuralmente menos complejo) para luego implementarlo en ensayos en campo y evaluar su capacidad de inhibir el asentamiento de diferentes organismos del *fouling* en un medio natural y finalmente proponer una ruta sintética que nos permita obtener este compuesto tipo cembrano con los grupos funcionales y arreglos estructurales que le confieren sus propiedades *antifouling*.

1.4. PROCESO DEL FOULING

Muchos de los invertebrados marinos tienen una etapa larval planctónica, en este periodo las larvas son dispersadas y transportadas por las corrientes. Cuando estas larvas maduran, adquieren la habilidad para desarrollar su metamorfosis, etapa en la cual empiezan a explorar diversas superficies nadando para buscar el sustrato más adecuado, este proceso se desarrolla principalmente en la parte inferior de la columna de agua. Una vez ha sido localizado el sustrato adecuado, se instalan y transforman en juveniles, ya que la supervivencia de estos organismos depende en gran medida del asentamiento y desarrollo sobre un sustrato. Por otro lado, el asentamiento de las larvas y su metamorfosis están influenciados por factores locales como la salinidad, temperatura, luz, tipo de sustratos, edad de las larvas y condiciones nutricionales de las larvas. Sin embargo, uno de los factores más importantes para el asentamiento es la presencia de señales químicas originadas de los adultos no específicos y los organismos presa. Un tipo de estas señales son las películas microbianas, las cuales inducen el asentamiento larval y la metamorfosis diferencialmente en muchas especies de invertebrados, desafortunadamente, los factores que regulan el biofilm bacteriano no han sido aún caracterizados completamente.⁵³ La formación del primer biofilm sobre una superficie, el asentamiento y los siguientes pasos de colonización biológica son conocidos como *fouling*, el cual puede ser definido (desde un punto de vista industrial) como la indeseable acumulación de compuestos químicos, microorganismos, algas y animales en los diversos sustratos sumergidos lo cual conduce al posterior biodeterioro de la superficie colonizada.⁵⁴

El proceso del *fouling* es ecológicamente una compleja interacción entre basibiontes, colonizadores de superficies y larvas del *fouling*, todo mediado por señales químicas. El asentamiento de organismos *fouling* sobre basibiontes puede tener efectos deletéreos severos en ellos, tales como inhibición de la fotosíntesis, bloqueo del filtro de alimentación y un elevado riesgo de desprendimiento mecánico o de depredación. En este escenario, la competencia por espacio representa fuerzas ecológicas comparables con la depredación, ya que el espacio es recurso limitado en el océano; por lo tanto, los invertebrados marinos tienen que competir por su lugar en las superficies colonizadas. En consecuencia, los invertebrados sésiles han establecido armas para colonizar a través de la evolución, *i.e.* cuando están en estadio de larva, ellos pueden localizar y asentarse sobre superficies para poder colonizar y desarrollarse; pero cuando ellos son adultos, tienen que mantener sus propias superficies limpias y así evitar el asentamiento de larvas de otras especies.⁵⁵

Actualmente, el *biofouling* ha sido entendido como una compleja interacción de fenómenos biológicos, físicos y químicos, tanto orgánicos como inorgánicos. Tradicionalmente este proceso se ha establecido como un proceso secuencial de cuatro pasos.^{9,13,56,57,58} El primero consiste en la adsorción de macromoléculas orgánicas, que se produce inmediatamente después de la inmersión de cualquier superficie, y se caracteriza por la formación de una película compuesta por proteínas, glicoproteínas y polisacáridos, en un proceso regulado por fuerzas físicas que se conoce como *fouling* molecular o película molecular.^{54,56,62} esta película es subsecuentemente colonizada por bacterias. El segundo paso, ocurre en aproximadamente una hora luego de la inmersión del sustrato en el agua, se caracteriza por el asentamiento de procariotas y el posterior desarrollo de una biopelícula bacteriana. Una vez ocurrida la fijación bacteriana al sustrato, las células bacterianas empiezan a producir una matriz de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) que es crítica para mantener la adhesión y el posterior desarrollo del biofilm así como su consolidación.^{61,62} Estos

⁵³ Fusetani, N. Biofouling and antifouling. Natural Products Report 2004; 21 94-104.

⁵⁴ Callow, J. A.; Callow, M. E. Biofilms. In: Fusetani N. Clare AS. (Eds.) Antifouling Compounds. Berlin-Heidelberg, Springer; 2006; p141.

⁵⁵ Krug, P. J. Defense of benthic invertebrates against surface colonization by larvae: A chemical arms race in antifouling compounds. In: Fusetani, N. Clare A. S. (Eds.) Antifouling Compounds. Berlin-Heidelberg, Springer; 2006, 1-53.

⁵⁶ Davis, A. R.; Targett, N. M.; McConnell, O. J.; Young, C. M. Epibiosis of marine algae and benthic invertebrates: natural products chemistry and other mechanisms inhibiting settlement and overgrowth. En Bioorganic Marine Chemistry, Scheuer, P.J., Ed.; Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 1989, pp 85-114.

⁵⁷ Flemming, H. C. 2002. Biofouling in water systems – cases, causes and countermeasures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59, 629-640.

⁵⁸ Wahl, M. 1989. Marine epibiosis. I. "Fouling and antifouling". *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 58, 175-189.

biofilms son comunidades bacterianas ensambladas que coordinan para la expresión de diferentes fenotipos que cambian con el tiempo y el medio ambiente, y dependen de diferentes factores que influyen, también, en una mayor colonización de la superficie. Recientemente, el quorum sensing (QS) ha sido reconocido como uno de los principales factores que determinan la maduración del biofilm, y esto es quizás el factor más determinante para poder establecer un biofilm apropiado. Este fenómeno es definido como la regulación de la expresión genética en función de la densidad de la población bacteriana y permite la sincronización de los fenotipos mediante la comunicación bacteriana. Es importante explicar brevemente, cómo la regulación del QS funciona (Figura 1.2.). Básicamente, funciona a través de un circuito genético compuesto por un factor de transcripción (LuxR) y por acilhomoserin lactonas (AHL's) sintetizadas (LuxI). La acumulación de AHL's en el medio, debido a la gran cantidad de células bacterianas presentes en un cultivo, conduce a la expresión de los genes (fenotipo) regulados por LuxR; algunos de ellos implicados en la maduración del biofilm.^{59,60}

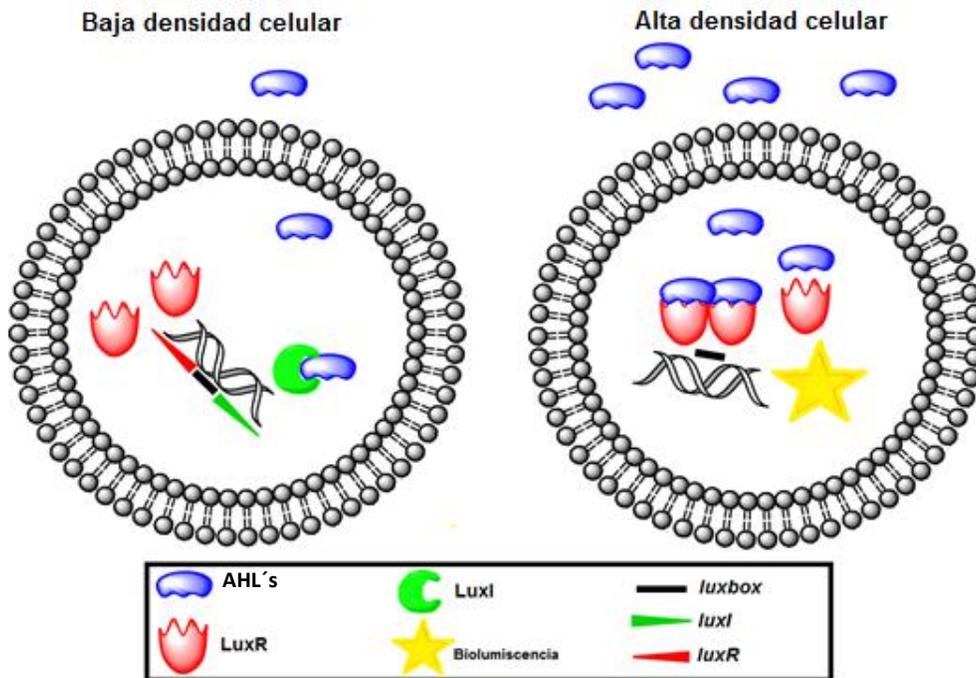


Figura 1.2. Sistema LuxR/LuxI. QS se define como la expresión del gen regulado por la densidad poblacional. El gen *luxI* codifica la AHL's sintetasa. Las moléculas de AHL's funcionan como un "auto-inductor" que pueden difundir libremente a través de la membrana celular, y cuando éstas se acumulan hasta un umbral específico, entonces se unen al factor de transcripción LuxR. El complejo formado LuxR-AHL's activa la transcripción de genes regulados por el promotor *luxbox* que es el responsable de la expresión de los fenotipos como factores de virulencia, bioluminiscencia, motilidad, biofilm entre otros.^{59,60}

El tercer paso en la formación del *fouling* es la colonización del sustrato por eucariotas unicelulares, las cuales incluyen taxa fotosintética como las diatomeas y suspensiones heterótrofas de alimentadores y depredadores. El paso final es el asentamiento y fijación de propágulos de organismos multicelulares, larvas de invertebrados y esporas de algas, los organismos predominantes difieren en las zonas templadas y en los trópicos, temporada del año, así como otras condiciones locales.^{9,13, 56,58,61} Hoy en día es reconocido que la naturaleza de los biofilms varía ampliamente y pueden presentar una serie de estímulos positivos y/o

⁵⁹ Fuqua, W. C.; Winans, S. C.; Greenberg, E. P. **1994.** Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J. bacterial.* 176(2), 269-275.

⁶⁰ Duque, C.; Tello, E.; Castellanos, L.; Fernández, M.; Arévalo-Ferro, C. Bacterial Sensors in Microfouling Assays. En *State of the Art in Biosensors - Environmental and Medical Applications*, Rinken, T. Ed. Intech. Croacia, 2013, capítulo 4.

⁶¹ Clare, A. S.; Rittschof, D.; Gerhart, D. J.; Maki, J. S. **1992.** Molecular approaches to nontoxic antifouling. *Invert. Repr. Dev.* 22, 67-76.

negativos en el asentamiento larval. Las larvas presentes en la columna de agua pueden responder a las señales químicas provenientes del sustrato y al entrar en contacto con las características fisicoquímicas y biológicas de la superficie puede elegir asentarse o rechazar dicha superficie. En este contexto, no es sorprendente que muchos invertebrados marinos hospedan comunidades bacterianas específicas, para así inhibir el *fouling* mediante la disuasión de las larvas, o mediante la prevención de la formación de biofilms por cepas inductoras.⁵³

En el estudio hacia el entendimiento de las condiciones bajo las cuales las larvas de invertebrados seleccionan un sustrato, se fijan a éste y sufren metamorfosis para seguir su desarrollo como juveniles, se ha obtenido sólida experiencia experimental que indica que para muchos organismos, se requiere de una previa adecuación de la superficie mediante la formación de la biopelícula microbiana;^{9,13,62} además, las bacterias pueden alterar la energía de la superficie o bien sus características físicas, químicas o biológicas y generar respuestas en las larvas mediante productos solubles del metabolismo bacterial o por compuestos asociados a la superficie de sus células.^{13,62} Por lo tanto, el asentamiento y fijación de larvas obedece a la percepción de señales químicas particulares producidas por los microorganismos que constituyen la biopelícula o bien se asocian a ésta, de este modo estos compuestos pueden tener una influencia tanto negativa (disuadir el asentamiento) como positiva (estimular el asentamiento).^{32,54,55}

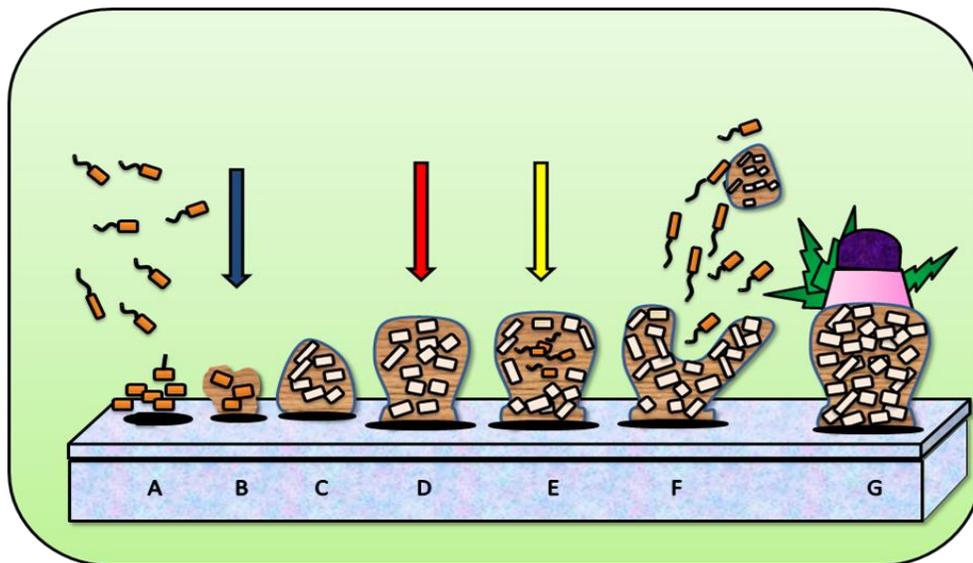


Figura 1.3. Esquema del proceso del *fouling*.⁶⁰

La figura 1.3 ilustra esquemáticamente el proceso del *fouling* descrito anteriormente. En ella pueden ser observados varios pasos claves en el proceso del *microfouling*: primero la fijación reversible de microorganismos (A) (principalmente células bacterianas y de algas), en este punto ellas pueden ser removidas de la superficie con un simple lavado con agua; en segundo lugar está la fijación irreversible de estos microorganismos al sustrato (B) seguido por la división celular (C), crecimiento (D), formación de biofilm (E) y luego la continuación del reclutamiento larval (F).^{1,53,54,60} En este punto el quorum sensing y la formación de biofilm bacteriano son piezas claves ya que se encuentran en todas las estructuras sumergidas en el ambiente marino y frecuentemente en asociación con algas, protozoos y hongos.⁵⁴ Aunque es probable que para la mayoría de los microorganismos, una superficie recubierta de biofilm no sea un pre-requisito para su asentamiento, en la práctica la colonización por esporas y larvas de diversos organismos pertenecientes al *fouling* se lleva a cabo a través de una superficie previamente acondicionada con biofilms (G). Por lo tanto, es de esperarse que para evitar el *fouling* marino en superficies sumergidas, podemos utilizar compuestos naturales o sus análogos, los cuales pueden ser seleccionados a través de la evaluación

⁶² Johnson, C.R.; Lewis, T. E.; Nichols, D.S.; Degnan, B. M. 1997. Bacterial induction of settlement and metamorphosis in marine invertebrates. Proc. 8th Int. Coral Reef Symp. Panama, 2, 1219-1224.

de sus propiedades *antifouling* en diversos ensayos *antimicrofouling* como la inhibición de los sistemas de quorum sensing y de los biofilm bacterianos.

En resumen, podemos distinguir dentro de la estructura del *fouling* dos niveles de organización, el *microfouling* y el *macrofouling*. El primero rige al segundo, y en la actualidad los esfuerzos para controlar el fenómeno del *fouling* están concentrados en controlar los biofilms bacterianos, ya que su inhibición, mediante el uso de inhibidores de los sistemas de quorum sensing, puede evitar el *macrofouling*.

Por último es importante mencionar que el *fouling* ha sido identificado como el causante de severos problemas en diferentes escenarios, por ejemplo, se estima que el consumo de combustible en los barcos aumenta en un 6% por cada 100 deformaciones (rugosidad) que presente al casco causada por organismos *fouling*, así como la mayor frecuencia en las entradas de las embarcaciones a dique seco o también a nivel ecológico muchas especies del *fouling* son introducidas accidentalmente en diferentes latitudes por las diferentes embarcaciones cubiertas con organismos del *fouling*. Por lo tanto, la protección inadecuada contra el *fouling* es una amenaza a los ecosistemas marinos con un daño incalculable, y sólo para el sector del transporte marítimo el costo podría ser estimado en varios miles de millones de dólares.^{53,57,58} Otras industrias pueden verse afectadas por este fenómeno, es decir, las industrias marinas explotadoras de gas y petróleo, la acuicultura, torres de enfriamiento, sistemas de distribución de agua potable, materiales de construcción, etc, y el casco de las embarcaciones que contienen *fouling* es también un vector importante para especies marinas invasoras. Con el fin de hacer frente a este problema el uso de las pinturas *antifouling* (AF) ha surgido como la solución más útil; de este modo, las pinturas *antifouling* contienen biocidas que se liberan durante la vida útil del revestimiento y están presentes dentro de una microcapa superficial de agua adyacente a la superficie de la pintura, evitando la fijación de organismos juveniles incrustantes. Debido al gran número de organismos involucrados en el *fouling* marino los biocidas utilizados en las pinturas deben tener un amplio espectro de actividad para ser capaces de disuadir a los diversos organismos colonizadores. Por lo tanto, los productos *antifouling* juegan un papel importante en la industria de transporte marítimo y son de gran importancia económica.^{53,55,57}

El uso de agentes *antifouling* para proteger los barcos no es un concepto nuevo, ya que los romanos y los griegos recubrían sus embarcaciones con revestimientos de plomo. En el descubrimiento y colonización de América, los barcos eran recubiertos con brea y sebo, y en el Imperio Británico usaban como pintura *antifouling* grasa, azufre y brea, y posteriormente se utilizaron revestimientos de cobre. Finalmente, a mediados de la década de 1800 las pinturas *antifouling* fueron desarrolladas debido a que con la introducción de los barcos de hierro, los revestimientos de cobre que se utilizaban en ese entonces causaban corrosión, lo que generó la necesidad crear nuevas formulaciones.⁵⁵ Estas pinturas *antifouling* incluyeron una gran cantidad de compuestos tóxicos como óxido de cobre, arsénico, óxido de mercurio y aglutinantes de resina. Después de la Segunda Guerra Mundial, las pinturas a base de cobre llegaron a ser las más populares hasta la aparición del tributilestaño (TBT), el cual resultó ser excelente en la prevención de las incrustaciones.³ Una gran cantidad de ventajas fueron atribuidas al agente *antifouling* TBT, por ejemplo, tenía un amplio espectro biocida y era eficaz contra la mayoría de los organismos colonizadores, se podía incorporar en pinturas de colores, ya que no tiene color y no promueve la corrosión galvánica en los barcos de hierro y, además, también se podía usar sobre superficies de aluminio. Debido a que es un compuesto orgánico puede ser co-polimerizados en pinturas a base de resina e incorporado en pinturas autopulimentantes, las cuales mantienen su efectividad durante largos períodos de tiempo.⁶³ Sin embargo, hoy en día se sabe que compuestos orgánicos de estaño, tales como el tributilestaño (TBT) y óxido de tributilestaño (TBTO), son los biocidas más tóxicos introducidos en el medio marino^{3,64} y que además presentan efectos biológicos perjudiciales sobre un gran número de organismos marinos y no solo los pertenecientes al *fouling*, por ejemplo, se han encontrado grandes cantidades de TBT en tejidos de mamíferos marinos, peces y algunas aves. Por lo tanto, la Organización Marítima Internacional (OMI) adoptó

⁶³ Arai, T.; Harino, H.; Ohji, M. In: Langston, W, J. (Ed). Ecotoxicology of antifouling biocides. Japan, Springer; 2009, p 437.

⁶⁴ Qian, P.Y.; Xu, Y.; Fusetani. N. 2010. Natural products as antifouling compounds: recent progress and future perspectives. *Biofouling* 26(2), 223–234.

un tratado internacional sobre el tema titulado "La Convención internacional sobre el control de *antifoulants* perjudiciales en las embarcaciones en el 2001", la cual prohibió la presencia de compuestos orgánicos de estaño en las pinturas *antifouling* a partir del 1 de enero de 2008.⁶⁵

La prohibición de pinturas con base en TBT ha forzado a desarrollar diferentes alternativas como los biocidas de refuerzo, entre ellos se encuentran Irgarol 1051, sea-nine 211, dichlofluanid, clorotalonil, piritionas de zinc, diuron, piridina TCMS, TCMTB, zineb, etc. Estos biocidas están siendo utilizados en muchos países, pero se ha encontrado que se acumulan en las aguas costeras y se han convertido en una amenaza para el medio marino también. Estas alternativas al TBT también son tóxicas y el impacto sobre los organismos no objetivo es poco conocido en la mayoría de los casos, de ahí que la contaminación en el medio ambiente acuático ha sido un tema de creciente importancia en los últimos años. Algunas de las revisiones más importantes pueden ser consultadas en biocidas en pinturas *antifouling*³ o ecotoxicología de biocidas *antifouling*.⁶³ Hoy en día, algunos países han firmado un acuerdo para restringir el uso de los biocidas Irgarol 1051 y diuron.^{3,64}

En este contexto, el desarrollo de *antifoulants* "ambientalmente amigables" es una necesidad urgente, la cual incluye pinturas *antifouling* y sistemas eléctricos *antifouling*; sin embargo, muchos investigadores están tratando de utilizar sistemas de defensas químicas a partir de organismos marinos sésiles para este propósito.⁶⁴ Estos compuestos naturales incorporados en una pintura podrían imitar a los organismos marinos que mantienen sus superficies limpias gracias a la producción de sustancias *antifouling* naturales con alto poder repelente y también con propiedades disuasivas del asentamiento, pero sin efectos biocidas. Muchos compuestos con diferentes estructuras han sido identificados como agentes *antifouling*, entre los que se incluyen terpenos, compuestos nitrogenados, fenoles, esteroides y otros. Adicionalmente, la combinación de algunos productos naturales podría ser útil debido a las propiedades sinérgicas observadas en ellos, y es de esperarse que este efecto sinérgico sea mucho mejor inhibidor del *fouling* que los compuestos derivados de estaño.⁶⁶ Fusetani ha presentado varias reseñas sobre el uso de productos naturales como agentes *antifouling*, en donde diferentes compuestos han sido identificados como productos naturales como posibles candidatos a agentes *antifoulant*. Por citar algunos ejemplos: el sesquiterpeno elatol aislado de alga roja *Laurencia elata*, las furanonas aisladas del alga roja *Delisea pulchra*, algunos isocianoterpenos aislados de la esponja *Acanthella cavernosa* y de los nudibranquios *Phyllidia pustulosa*, *P. ocelata*, *P. varicosa* y *Phyllidiopsis krempfi* y finalmente, el 5,6-dicloro-1-metilgramina (DCMG) inspirado en el producto natural 2,5,6-tribromo-1-metilgramina.^{64,65} Hay, sin embargo, un inconveniente bastante reconocido en los productos naturales y es el problema de suministro, el cual tiene que ser superado con el fin de aplicar estos productos en tecnologías *antifouling*. En este contexto, las bacterias y los hongos son una fuente prometedora, por lo cual se deben realizar mayores esfuerzos hacia el desarrollo de compuestos *antifouling* a partir de microorganismos marinos.

Por otra parte, las pinturas *antifouling* actuales no son eficaces contra la colonización del *microfouling* (bacterias y diatomeas) ya que estos microorganismos tienen la capacidad de colonizar superficies enteras tratadas previamente con pinturas *antifouling* comunes. Por lo tanto, el desarrollo de nuevos compuestos para regular la densidad de los microorganismos en revestimientos *antifouling* es una necesidad prioritaria. En este contexto, los compuestos Inhibidores de Quorum Sensing (IQS) son una nueva alternativa, ya que también pueden ser utilizados para la protección antimicrobiana en la acuicultura, así como en el control del desarrollo de *biofilms* en el área medicinal. Dobretsov *et al.*⁶⁶ estableció al ácido kójico como un compuesto que tiene la capacidad de prevenir el *microfouling*, mediante un experimento controlado en el mesocosmo. Este ácido inhibió la formación de comunidades microbianas en placas de vidrio, disminuyendo la densidad de bacterias y diatomeas, lo cual sugirió que los productos naturales con propiedades inhibitoras QS pueden ser utilizados para el control de las comunidades del *biofouling*.^{66,67}

⁶⁵ Fusetani, N. 2011. Antifouling marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 28, 400-410.

⁶⁶ Dobretsov, S.; Teplitski, M.; Bayer, M.; Gunasekera, S.; Proksch, P.; Paul, V. J. 2011. Inhibition of marine biofouling by bacterial quorum sensing inhibitors. *Biofouling* 27(8), 893-905.

⁶⁷ Nadell, C. D.; Xavier, J. B.; Levin, S. A.; Foster, K. R. 2008. The evolution of quorum sensing in bacterial biofilms. *PLoS Biology* 6(1), e14.

1.5. ENSAYOS ANTIFOULING

No existe un bioensayo específico que permita determinar el potencial como agente *antifouling* de una sustancia, debido a la gran diversidad de organismos marinos presentes tanto en el *microfouling* como en el *macrofouling*. Adicionalmente, el transporte de organismos adheridos a los cascos de las embarcaciones ha favorecido la introducción de especies exóticas en todo el mundo, ampliando de éste modo la variedad de organismos *fouling* en diversas latitudes. Este hecho hace evidente la necesidad de desarrollar un amplio número de ensayos para evaluar la actividad *antifouling*, ya que para establecer una actividad *antifouling in vitro* con amplio espectro, se requiere hacer la correlación de varios bioensayos contra algunos de los principales organismos *fouling* y aún así, de acuerdo a lo mostrado en la literatura es posible que en ensayos en campo no se presente esta actividad. Las últimas publicaciones en el área han sido coincidentes en que una sola sustancia no puede inhibir el asentamiento y desarrollo de todos los organismos implicados en el *fouling* marino.^{13,62} Sin embargo, varios bioensayos han sido desarrollados para determinar cuáles productos naturales inhiben organismos específicos y reconocidos por estar presentes en el proceso del *fouling*, principalmente, están dirigidos a entender la influencia de la colonización inicial por bacterias (*microfouling*) en el subsecuente asentamiento y desarrollo del *macrofouling*. Adicionalmente, la evaluación directa de los candidatos en ensayos de campo demanda grandes cantidades de cada compuesto, además, los ensayos son afectados por incontrolables fenómenos y factores, incluyendo temporada del año, clima etc. por lo cual es recomendable una selección previa del compuesto y la forma más adecuada es mediante bioensayos de laboratorio.¹³ Como consecuencia, un gran número de ensayos *antifouling* han sido desarrollados en los últimos años; sin embargo, muy pocos compuestos han sido evaluados en campo, lo cual es necesario para evaluar la actividad *antifouling* global, lo cual sugerirá finalmente al mejor compuesto *antifouling* y su posible uso en recubrimientos industriales.^{13,64} Los bioensayos pueden agruparse en tres grupos de acuerdo al objetivo, organismos del *microfouling*, organismos del *macrofouling* y enzimas.¹³

Debido a la amplia diversidad de organismos involucrados en el proceso del *fouling*, se requiere de diferentes objetivos (organismos) para evaluar las propiedades *antifouling* de un compuesto en particular (Figura 1.4.). Por esta razón, un amplio número de organismos ha sido utilizado en bioensayos *antifouling*, sin embargo la selección del más adecuado debe hacerse de acuerdo con la respuesta a resolver; por ejemplo para entender el proceso ecológico deben ser seleccionados aquellos que reflejen un potencial como organismos del *micro-* o *macrofouling* y los bioensayos deben ser realizados en las especies más dominantes del *fouling* (bacterias marinas, diatomeas, algas, mejillones y cirripedios).^{9,13,64,65} Sin embargo, la dificultad y el costo del cultivo de los diversos organismos bentónicos son un punto importante a la hora de escoger el organismo para el bioensayo. En algunos bioensayos se utiliza una sola especie, principalmente cuando el organismo objetivo es un macroorganismo, pero en los ensayos de *microfouling*, usualmente se utilizan mezclas de consorcios. En este sentido, los microorganismos más usados son cepas de bacterias aisladas de biopelículas marinas, especialmente las marinas que son relativamente fáciles de aislar y de cultivar. Como se ha reportado en varias publicaciones, las comunidades microbianas se desarrollan rápidamente y a menudo están involucradas en procesos que también regulan el *macrofouling*, promoviéndolo o inhibiéndolo.^{13,62,65} También, las diatomeas han sido ampliamente utilizadas para ensayos *antifouling* y su uso en este tipo de ensayos es muy importante porque muchos revestimientos *antifouling* no son efectivos contra los consorcios de microalgas dominados por diatomeas. Los hongos marinos a diferencia de las bacterias no suelen ser muy utilizados en los ensayos *antifouling*, ya que no es uno de los principales de organismos del *fouling*.¹³ Por otro lado, los macro-organismos más importantes que intervienen en la colonización de embarcaciones son los cirripedios; lo cual ha hecho a este organismo uno de los más populares en los bioensayos, principalmente, utilizando el estadio final de las larvas cypris del cirripedio tropical y subtropical *Balanus amphitrite*.¹³ Finalmente, el segundo grupo de organismos más utilizado en bioensayos, con base en el número de publicaciones son los mejillones *Mytilus* spp. Los ensayos con *Balanus* y *Mytilus* son utilizados en aproximadamente la cuarta parte de las publicaciones que contienen ensayos *antifouling* (29 y 23 respectivamente de 109 artículos), esto es debido a que los cirripedios y mejillones son los mayores organismos *fouling* en estructuras sumergidas en el medio marino; además, ambos organismos son relativamente fáciles de cultivar y tienen un ciclo larval corto.^{13,66}

Los ensayos de inhibición de crecimiento son una clase de ensayos *antimicrofouling* (Figura 1.4.) y se pueden realizar tanto en difusión en disco como en medio líquido, sin embargo, estos ensayos no son tan relevantes porque el *fouling* implica *biofilm*, y estos ensayos no toman en cuenta este hecho, además, es bien conocido que la sensibilidad de los microorganismos en un *biofilm* es menor que la de aquellos en cultivos planctónicos. Por otra parte, estas pruebas pueden ser automatizadas y los compuestos pueden ser evaluados rápidamente en placas multipozo midiendo el cambio en la turbidez. Por ejemplo, para las diatomeas, la inhibición del crecimiento se puede evaluar en matraces con medio de cultivo líquido, mediante la medición de la absorbancia o la concentración de clorofilas. Los ensayos de fijación (principalmente en bacterias y microalgas) son otro tipo de bioensayos para evaluar la actividad contra el *microfouling*; sin embargo, la mayoría de ellos generan un biofilm *in vitro* bajo condiciones estáticas de agua, con unas pocas excepciones en las que se utilizan cámaras de flujo y aún así bajo estos parámetros, no se reflejan las condiciones reales del *fouling* marino. Además, una biopelícula bacteriana de multiespecies refleja de la mejor manera las condiciones naturales, debido a que el papel del sinergismo en la resistencia a los agentes antimicrobianos es fundamental. Por último, actualmente es ampliamente reconocido el papel del quorum sensing en la consolidación de las biopelículas, así como en el proceso del fouling, debido a este hecho los ensayos de inhibición de QS están llevándose a cabo para determinar el potencial *antifouling* de los compuestos puros.^{13,64,65}

La inhibición QS ha sido una estrategia de algas, plantas, bacterias y otros microorganismos para controlar su propia población y para sincronizar la expresión de diferentes fenotipos en una comunidad. El QS puede ser inhibido en varios puntos de los circuitos de comunicación, siendo la degradación o la competencia con las moléculas señalizadoras por el sitio de unión en la proteína reguladora, las más estudiadas.^{59,65,67} Algunas bacterias tienen fenotipos útiles regulados por QS, por ejemplo, la bioluminiscencia o la producción de pigmentos como la violaceína, estas características pueden ser reporteros excepcionales para la inhibición de QS. Estos fenotipos son en muchos casos la herramienta común para evaluar la actividad de las moléculas en simples ensayos de cajas de Petri.^{66,67}



Figura 1.4. Diversos ensayos de inhibición contra el *micro-* (azul) y *macrofouling* (verde)

1.6. BREVES CONCLUSIONES DEL ANÁLISIS DE LA BIBLIOGRAFÍA PRESENTADA Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Toda la revisión anterior nos permite concluir que los octocorales del mar Caribe Colombiano, son excelentes candidatos para la búsqueda de compuestos con actividad *antifouling*. Aprovechando los resultados preliminares obtenidos por nosotros en los cuales se ha establecido que algunas de estas especies presentan compuestos con esta actividad, que poseen una química interesante sin contraparte terrestre, que crecen abundantemente y que además presentan una gran riqueza metabólica, podemos preparar diversos análogos sintéticos que permitan hacer algunas aproximaciones a la relación estructura-actividad *antifouling* para establecer así, el mejor agente *antifouling* tipo cembrano. Adicionalmente, estos organismos presentan pocos estudios a nivel químico y biológico, lo cual abre las puertas para nuevos descubrimientos de moléculas novedosas con potencial uso a nivel industrial como recubrimientos *antifouling* no tóxicos, así como en otras posibles áreas a nivel medicinal e industrial.

Con toda la información anterior de compuestos de origen marino usados como agentes *antifouling* en recubrimientos y aprovechando los resultados preliminares obtenidos hasta el momento^{8,9,10,12,68,69}, **se propuso establecer por medio de ensayos *antifouling* y estudios de relación estructura-actividad, si los compuestos tipo cembrano naturales extraídos de organismos bentónicos sésiles como los octocorales del género *Eunicea* y *Pseudoplexaura*, así como sus análogos sintéticos, son buenos candidatos como agentes *antifouling* para su aplicación en un recubrimiento industrial como una alternativa no tóxica “ambientalmente amigable” para la protección de superficies sumergidas.** Para este trabajo se escogió a *Eunicea knighti* y *Pseudoplexaura flagellosa*,^{8,10} por la actividad mostrada por sus extractos en los ensayos preliminares y por su capacidad de producir terpenos con núcleo cembrano en cantidades considerables, lo que permite disponer de materia prima para obtener a partir de ellos diversos análogos semi-sintéticos.

⁶⁸ Cuadrado, T.; Castellanos, L.; Osorno, O.; Ramos, F. A.; Duque, C.; Puyana M. **2010**. Estudio Químico y Evaluación de la Actividad Antifouling del Octocoral Caribeño *Eunicea laciniata*. *Quimica Nova* 33, 656-661.

⁶⁹ Reina, E.; Puentes, C.; Rojas, J.; García, J.; Castellanos, L.; Aragón, M.; Ospina, L. F.; Ramos, F. **2011**. Fuscoside E: A strong anti-inflammatory diterpene from Caribbean octocoral *Eunicea fusca*. *Bioor. & Med. Chem. Lett.* 5888-5891.

2. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS TIPO CEMBRANO A PARTIR DE LOS OCTOCORALES *Pseudoplexaura flagellosa* y *Eunicea knighti* DEL CARIBE COLOMBIANO

2.1. METODOLOGÍA

2.1.1. Generalidades

Todos los fraccionamientos y reacciones fueron monitoreadas mediante cromatografía en capa delgada (CCD) usando placas de aluminio cubiertas con gel de sílice 60F₂₅₄ de Merck, las cuales fueron visualizadas con luz ultravioleta ($\lambda_{\text{max}} = 254 \text{ nm}$), y luego reveladas con soluciones de sulfato cérico amónico ácido, permanganato de potasio básico o ácido fosfomolibdico, a no ser que otra indicación se especifique.

Para la cromatografía en columna (CC) de compuestos de baja y mediana polaridad se empleó como adsorbente gel de sílice (63-200 μm) de Merck y para la CC al vacío se utilizó también gel de sílice pero de menor tamaño de partícula (40-63 μm) suministrado por Merck.

Los análisis por cromatografía de gases de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (CGAR-EM) se llevaron a cabo en un cromatógrafo de gases Shimadzu GC-17A conectado a un espectrómetro de masas QP5050A como detector y los análisis por espectrometría de masas en un Bruker MicroTOF system, usando la técnica electrospray (ESI). En cromatografía se empleó una columna DB-1 de sílica fundida (25 m x 0.25 mm d.i., película 1 μm) y usando He (1 mL/min) como gas de arrastre. La fuente de ionización se mantuvo en 70 eV.

Los análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) preparativa fueron hechos en un cromatógrafo Merck-Hitachi con un detector UV/Vis L-4250 a 210 nm usando una columna LichroCART RP-18 (250 x 10 mm d.i.; 5 μm), como eluyente se utilizó una mezcla de MeOH-H₂O 80:20 a un flujo de 3 mL/min.

Los análisis por CLAE analítica y la toma de los espectros UV de cada compuesto se obtuvieron en un cromatógrafo líquido Merck-Hitachi con detector de arreglo de diodos, equipado con una columna Shimpack CLC-ODS (150 x 6 mm d.i., 5 μm), utilizando como fase móvil un gradiente de MeOH-H₂O de 50% a 100% de MeOH en 30 min, el flujo se fijó en 1.0 mL/min.

Los espectros de resonancia magnética nuclear RMN fueron obtenidos en los equipos Bruker AVANCE 400 (400 MHz para ¹H y 100 MHz para ¹³C) y en un Bruker Avance 500 (500 MHz para ¹H y 125 MHz para ¹³C) como soluciones diluidas (~ 10 mg/0.4 mL) en un solvente deuterado. Los desplazamientos químicos fueron reportados en partes por millón (ppm) relativos al pico del solvente residual y la multiplicidad de cada señal fue designada por las siguientes abreviaciones: s (singlete), d (doblete), t (triplete), q (cuarteto), br (ancho), m (multiplete). Todas las constantes de acoplamiento fueron reportadas en hertz (Hz) y las asignaciones fueron hechas de acuerdo a los desplazamientos químicos y al análisis de los experimentos bidimensionales. Los solventes deuterados utilizados fueron CDCl₃ (99.8%), CD₂Cl₂ (99.9%) y MeOD (99.8%).

La actividad óptica fue medida en un polarímetro Polartronic ADP440+, Bellinghan+stanley polarimeter, las concentraciones se expresan como g/100 mL y el disolvente usado se indica en cada caso. Los espectros IR fueron tomados en un espectrofotómetro Perkin-Elmer-FT-IR Paragon 500, series 1000.

Los solventes utilizados fueron grado R.A. y usados directamente del proveedor a no ser que se dé otra indicación.

2.2. MATERIAL ANIMAL

Los corales blandos *Pseudoplexaura flagellosa* y *Eunicea knighti* fueron recolectados en El Morro, al oeste de la costa de Santa Marta, mediante buceo autónomo SCUBA a una profundidad de 8 y 12 metros, respectivamente (Figura 2.1). Los animales fueron congelados inmediatamente después de ser recolectados y mantenidos a -4°C hasta el momento de su extracción. El material animal fue identificado por el Doctor Sven Zea Profesor del Departamento de Biología de la Universidad Nacional de Colombia y por la Doctora Mónica Puyana profesora de la Universidad Jorge Tadeo Lozano. Un fragmento de referencia de cada organismo fue depositado en la colección de invertebrados del Instituto de Ciencias Naturales (ICN) de la Universidad Nacional de Colombia bajo los códigos ICN-MHN-PO 0257 (*P. flagellosa*) y ICN-MHN-CO 0106 (*E. knighti*).



Eunicea knighti, Bayer 1961

<http://biogeodb.stri.si.edu/bioinformatics/dfm/metas/view/13274>



Pseudoplexaura flagellosa, Houttuyn 1772

<http://picasaweb.google.com/lh/photo/n5VIRECbJiHspegug9dRw>

Figura 2.1. Octocorales fuente de cembranos

2.3. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS CRUDOS

Las colonias de los octocorales *P. flagellosa* y *E. knighti* (360 g y 650 g, peso húmedo, respectivamente) fueron cortadas en trozos pequeños y extraídas separadamente con una mezcla $\text{MeOH}-\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (1:1 v/v, 300 mL x 4) a temperatura ambiente. Los extractos resultantes fueron filtrados y concentrados a presión reducida en rotaevaporador (40°C) hasta obtener dos residuos aceitosos de color verde oscuro (65.0 g de *P. flagellosa* y 59.0 g de *E. knighti*) los cuales fueron denominados extractos crudos y sometidos a un bioensayo *antifouling* (inhibición de sistemas de quorum sensing (QS)), resultando activos (Tabla 2.1). Posteriormente, los extractos crudos fueron fraccionados en forma bioguiada (Figuras 2.2 y 2.3) como se indica más adelante, hasta obtener los compuestos puros responsables de la actividad inicialmente detectada.^{1,2}

¹ Tello, E.; Castellanos, L.; Arévalo-Ferro, C.; Rodríguez, J.; Jiménez, C.; Duque C. **2011**. Absolute Stereochemistry of Antifouling Cembranoid Epimers at C-8 from the Caribbean Octocoral *Pseudoplexaura flagellosa*. Revised structures of plexaurulones. *Tetrahedron* 67, 9112-9121.

² Tello, E.; Castellanos, L.; Arevalo-Ferro, C.; Duque, C. **2012**. Disruption in Quorum sensing Systems and Biofilm Inhibition of Bacteria by Cembranoid Diterpenes Isolated from the Octocoral *Eunicea knighti*. *J. Nat. Prod.* 75, 1637-1642.

Tabla 2.1. Ensayo de inhibición de QS usando la bacteria *Chromobacterium violaceum* para evaluar los extractos y fracciones obtenidas de los octocorales *P. flagellosa* y *E. knighti*

<i>P. flagellosa</i> ^a	Inhibición de QS ^b	<i>E. knighti</i> ^a	Inhibición de QS ^b
Extracto crudo	+	Extracto crudo	+
PfF1	-	EkF1	-
PfF2	-	EkF2	-
PfF3	-	EkF3	-
PfF4	-	EkF4	-
PfF5	-	EkF5	+
PfF6	+	EkF6	+
PfF7	-	EkF7	-
PfF8	+	EkF8	-
PfF9	+	EkF9	-
PfF10	+	EkF10	+
PfF11	-	EkF11	-
PfF12	-	EkF12	-
PfF13	-	EkF13	-

^aLos extractos y fracciones fueron evaluadas a 300 µg/disco. ^b (+) fracciones que presentaron actividad; (-) fracciones que no presentaron actividad.

2.4. FRACCIONAMIENTO DE LOS EXTRACTOS CRUDOS

Los extractos crudos de los octocorales fueron sometidos separadamente a una partición líquido-líquido con CH₂Cl₂-H₂O (50:50 v/v, 250 mL x 3). Las fases orgánicas obtenidas de cada organismo fueron reunidas y concentradas al vacío, obteniéndose una fracción orgánica para *P. flagellosa* (48.0 g, verde aceitosa)¹ y otra fracción orgánica para *E. knighti* (43.0 g, verde aceitosa)².

2.4.1. Fracción orgánica de *P. flagellosa*¹

Una porción de la fracción orgánica obtenida de *P. flagellosa* (30.0 g) fue sometida a CC sobre sílica gel al vacío, eluyendo con 500 mL de una serie de solventes de polaridad creciente, obteniendo trece fracciones: **PfF1** (benceno 100%, incoloro, 86 mg), **PfF2** (benceno 100%, de color amarillo, 1245 mg), **PfF3** (benceno-AcOEt 80:20 v/v, de color amarillo claro, 247 mg), **PfF4** (benceno-AcOEt 70:30 v/v, de color verde oscuro, 113 mg), **PfF5** (benceno-AcOEt 70:30 v/v, de color verde, 4001 mg), **PfF6** (benceno-AcOEt 50:50 v/v, de color verde, 6392 mg), **PfF7** (benceno-AcOEt 50:50 v/v, de color verde claro, 6541 mg), **PfF8** (benceno-AcOEt 30:70 v/v, de color aguamarina, 2565 mg), **PfF9** (benceno-AcOEt 30:70 v/v, de color salmón, 3617 mg), **PfF10** (AcOEt 100%, de color naranja, 1656 mg), **PfF11** (AcOEt-MeOH 80:20 v/v, de color amarillo, 234 mg), **PfF12** (AcOEt-MeOH 50:50 v/v, de color verde, 1292 mg), **PfF13** (MeOH 100%, de color verde oscuro, 467 mg). Posteriormente, estas fracciones fueron sometidas al bioensayo de evaluación de actividad *antifouling* que se menciona en el numeral 2.9.1., resultando las fracciones **PfF6**, **PfF8**, **PfF9** y **PfF10** activas (Tabla 2.1 y Figura 2.2) y por lo tanto seleccionadas para su estudio en la presente tesis.

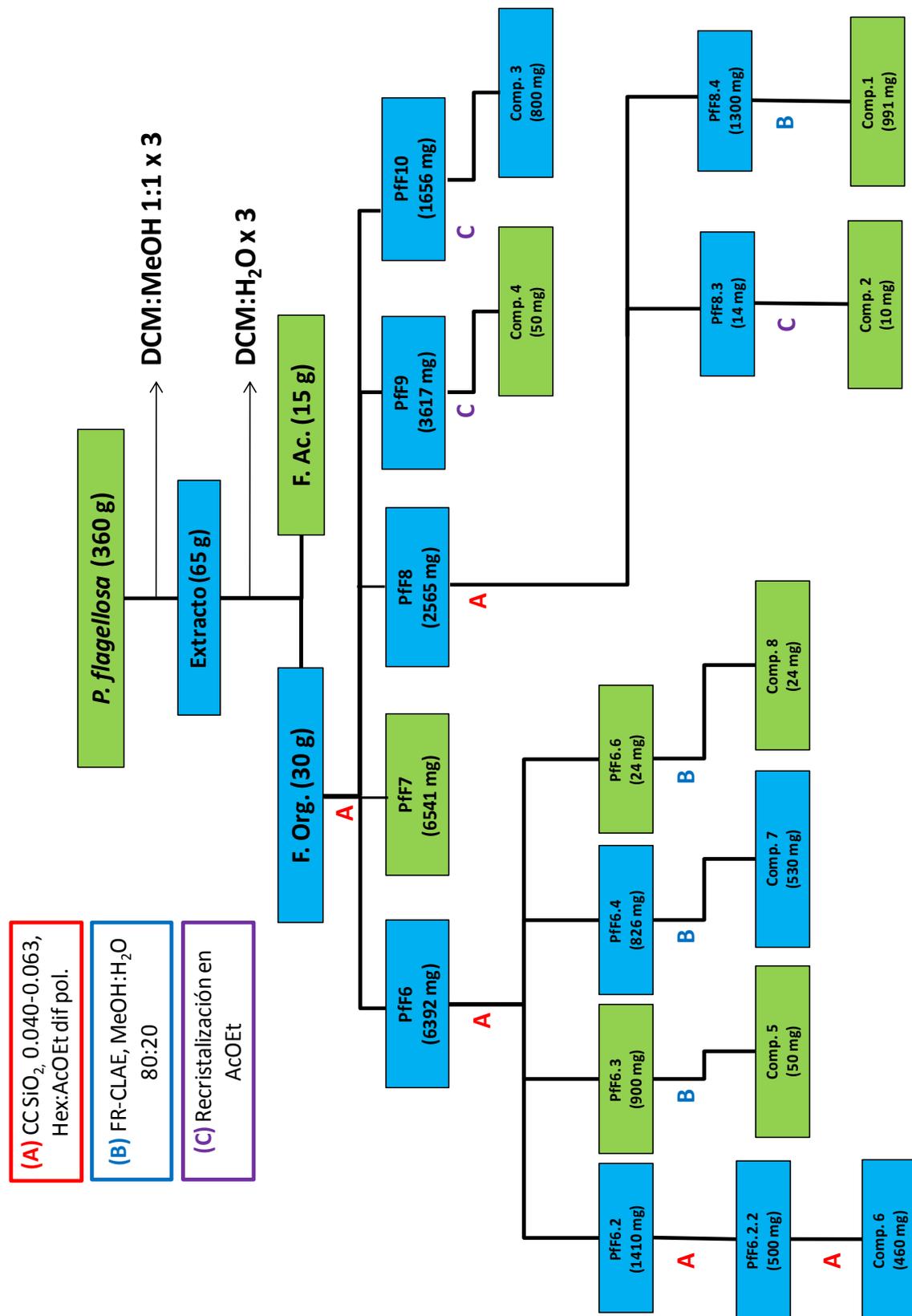


Figura 2.2. Fraccionamiento bio guiado (en IQS usando *C. violaceum*) del extracto del octocoral *P. flagellosa*. Las fracciones o compuestos resaltados en azul fueron activos en el ensayo de IQS.

2.4.2. Fracción orgánica de *E. knighti*²

La fracción orgánica obtenida de *E. knighti* (43.0 g) fue sometida a CC sobre sílica gel al vacío, eluyendo con 400 mL de una serie de solventes de polaridad creciente, obteniendo trece fracciones: **EkF1** (hexano 100%, incoloro, 250 mg), **EkF2** (hexano 100%, de color amarillo oscuro, 599 mg), **EkF3** (hexano–AcOEt 80:20 v/v, de color rojo, 303 mg), **EkF4** (hexano–AcOEt 70:30 v/v, de color verde-amarillo, 738 mg), **EkF5** (hexano–AcOEt 70:30 v/v, de color verde oscuro, 8712 mg), **EkF6** (hexano–AcOEt 70:30 v/v, de color verde, 8134 mg), **EkF7** (hexano–AcOEt 50:50 v/v, de color amarillo, 1156 mg), **EkF8** (hexano–AcOEt 50:50 v/v, de color salmón, 2111 mg), **EkF9** (AcOEt 100%, de color naranja, 4908 mg), **EkF10** (AcOEt 100%, de color amarillo, 10008 mg), **EkF11** (AcOEt–MeOH 50:50 v/v, de color amarillo oscuro, 3837 mg), **EkF12** (AcOEt–MeOH 50:50 v/v, de color café oscuro, 1187 mg), **EkF13** (MeOH 100%, de color verde oscuro, 467 mg). Posteriormente, estas fracciones fueron sometidas al bioensayo de evaluación de actividad *antifouling* que se menciona en el numeral 2.9.1., resultando las fracciones **EkF5**, **EkF6** y **EkF10** activas (Tabla 2.1 y Figura 2.3) y por lo tanto seleccionadas para su estudio en la presente tesis.

2.5. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS PRESENTES EN LAS FRACCIONES CON ACTIVIDAD ANTIFOULING Pff6, Pff8 y Pff9 DEL OCTOCORAL *P. flagellosa* Y EkF5, EkF6 y EkF10 DEL OCTOCORAL *E. knighti*

2.5.1. Obtención de cembranos a partir de las fracciones de *P. flagellosa*¹

La fracción **Pff6** (6.4 g) obtenida de la columna de cromatografía instantánea al vacío, fue analizada mediante CCD encontrando que ésta estaba constituida por una mezcla de al menos cuatro compuestos, por lo cual se procedió a realizar una nueva CC sobre sílica gel eluyendo con hexano–AcOEt 95:5 v/v. Se recolectaron 72 fracciones de ~ 15 mL cada una y estas fracciones fueron agrupadas y concentradas de acuerdo a su perfil cromatográfico en CCD (hexano–AcOEt 85:15 v/v), lográndose obtener siete subfracciones (**Pff6.1-Pff6.7**). La subfracción **Pff6.2** fue sometida repetidamente a CC bajo presión en sílica gel, usando como eluyente hexano–AcOEt 95:5 v/v, obteniéndose el compuesto puro **6** (460 mg, polvo incoloro). En adición, las subfracciones **Pff6.3**, **Pff6.4** y **Pff6.6** fueron sometidas separadamente a una purificación final en CLAE preparativa en fase reversa en una columna LichroCART RP-18 usando MeOH–H₂O (80:20 v/v, flujo 3 mL/min) como eluyente, logrando obtener los compuestos puros **5** (50 mg, polvo incoloro), **7** (530 mg, agujas amarillas) y **8** (24 mg, polvo incoloro), respectivamente (Figura 2.2).

La fracción **Pff8** (2.6 g) fue sometida a CC bajo presión en sílica gel, usando hexano–AcOEt 50:50 v/v como fase móvil, se recolectaron 118 fracciones cada una de ~ 15 mL, las cuales fueron agrupadas en seis subfracciones (**Pff8.1-Pff8.6**). De estas subfracciones, **Pff8.4** fue sometida repetidamente a cristalización en AcOEt para obtener el compuesto puro **1** (991 mg); además, la subfracción **Pff8.3** fue finalmente purificada por CLAE en fase reversa, usando MeOH–H₂O (70:30 v/v, flujo 3 mL/min) como eluyente, para obtener el compuesto puro **2** (10 mg, cristales blancos). Finalmente, las fracciones **Pff9** (eluida con hexano–AcOEt 30:70 v/v) y **Pff10** (eluida con AcOEt 100%) fueron sometidas a procesos de cristalización en AcOEt para obtener los compuestos puros **4** (50 mg, cristales blancos) y **3** (800 mg, cristales blancos), respectivamente (Figura 2.2).

2.5.2. Obtención de cembranos a partir de las fracciones de *E. knighti*²

La fracción **EkF5** (8.7 g) de la columna de cromatografía instantánea al vacío, fue examinada mediante CCD encontrando que ésta estaba constituida por una mezcla de compuestos. Se procedió entonces a hacer una CC sobre sílica gel eluyendo con volúmenes de 80 mL de hexano–AcOEt 95:5, 90:10, 85:15 y 80:20 v/v. Se

recolectaron 92 fracciones de ~ 20 mL cada una, estas fracciones fueron agrupadas y concentradas en 14 subfracciones (**EkF5.1-EkF5.14**) de acuerdo a su perfil cromatográfico en CCD (hexano–AcOEt 85:15 v/v).

La subfracción **EkF5.3** activa en el bioensayo *antifouling* y eluída con hexano–AcOEt 90:10 v/v, fue posteriormente concentrada en rotaevaporador y separada mediante CLAE preparativa en fase reversa en una columna LichroCART RP-18 usando MeOH–H₂O (90:10 v/v, flujo 3 mL/min) como eluente, logrando obtener los compuestos puros **9** (10 mg, aceite incoloro) y **12** (60 mg, aceite incoloro, tr 28.3). La subfracción **EkF5.7** igualmente activa y eluída con hexano–AcOEt 85:15 v/v, fue posteriormente concentrada en rotaevaporador y monitoreada mediante CCD (hexano–AcOEt 90:10 v/v) y CLAE analítica en fase reversa en una columna shimpack CLC-ODS utilizando como fase móvil un gradiente de MeOH–H₂O de 50:50 a 100% de MeOH en 30 min y un flujo fijo de 1.0 mL/min. Este análisis mostró que esta subfracción contenía principalmente dos compuestos minoritarios con tiempo de retención de 29.3 y 31.3 min., entonces se procedió a realizar una CLAE preparativa en fase reversa en una columna LichroCART RP-18 usando MeOH–H₂O (90:10 v/v, flujo 3 mL/min) como eluente, obteniendo los compuestos puros **13** (50 mg, aceite incoloro, tr 31.3) y **14** (30 mg, aceite incoloro, tr 29.3) (Figura 2.3).

La fracción **EkF6** (8.0 g) eluída de la columna de cromatografía instantánea al vacío, fue sometida a CC sobre sílica gel y eluída con hexano–AcOEt 85:5 v/v como fase móvil. Se recolectaron 65 fracciones de ~ 12 mL cada una, estas fracciones fueron agrupadas y concentradas en siete subfracciones (**EkF6.1-EkF6.7**) de acuerdo a su perfil cromatográfico en CCD (hexano–AcOEt 85:15 v/v). De estas subfracciones, **EkF6.2 y EkF6.3** fueron sometidas separadamente a CLAE preparativa en fase reversa en una columna LichroCART RP-18 usando MeOH–H₂O (50:50 v/v, flujo 3 mL/min) como eluente, logrando obtener los compuestos **10** (14 mg, aceite incoloro) **11** (13 mg, aceite incoloro) y **16** (400 mg, aceite incoloro), respectivamente. Finalmente, la fracción **EkF10** (10.0 g) eluída de la columna de cromatografía instantánea al vacío, fue analizada mediante CLAE encontrando que esta fracción estaba constituida mayoritariamente por un solo compuesto, por lo cual fue igualmente sometida a CC sobre sílica gel y eluída con hexano–AcOEt 50:50 v/v como fase móvil. Se recolectaron 85 fracciones de ~ 20 mL, las cuales fueron reagrupadas en tres subfracciones (**EkF10.1-EkF10.3**) de acuerdo a su perfil cromatográfico en CCD (hexano–AcOEt 70:30 v/v). De ella la subfracción **EkF10.2** mostró estar constituida por el compuesto puro **15** (9.0 g, polvo fino) (Figura 2.3).

2.5.3. Preparación de los ésteres (*R*)- Y (*S*)-MPA de los compuestos aislados

Los ésteres MPA de los compuestos que requirieron este proceso, fueron preparados de acuerdo al procedimiento publicado por Riguera y colaboradores (Figura 2.4),^{3,4} haciéndolos (1 eq.) con *R*-MPA (1 eq.) en DCM seco (1 mL), en presencia de DCC (1.1 eq.) y DMAP (cantidades catalíticas) durante 24 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción fue filtrada para remover la dicitohexil úrea producida en la reacción. El producto esterificado fue purificado por CLAE en fase reversa utilizando una columna Shimpack CLC-ODS RP-18 MeOH–H₂O 85:15 v/v.^{1,2,5} Los ésteres *S*-MPA fueron preparados y purificados de la misma forma que los ésteres *R*-MPA.

³ Seco, J. M.; Quiñoa, E.; Riguera, R. **2004**. The assignment of absolute configuration by NMR. *Chem. Rev.* *104*, 17-117.

⁴ Seco, J. M.; Quiñoa, E.; Riguera, R. A. **2001**. Practical guide for the assignment of the absolute configuration of alcohols, amines and carboxylic acids by NMR. *Tetrahedron Asymmetry* *12*, 2915-2925.

⁵ Latypov, S. K.; Seco, J. M.; Quiñoa, E.; Riguera, R. **1998**. Are both the (*R*)- and the (*S*)-MPA esters really needed for the assignment of the absolute configuration of secondary alcohols by NMR? the use of a single derivative. *J. Am. Chem. Soc.* *120*, 877-882.

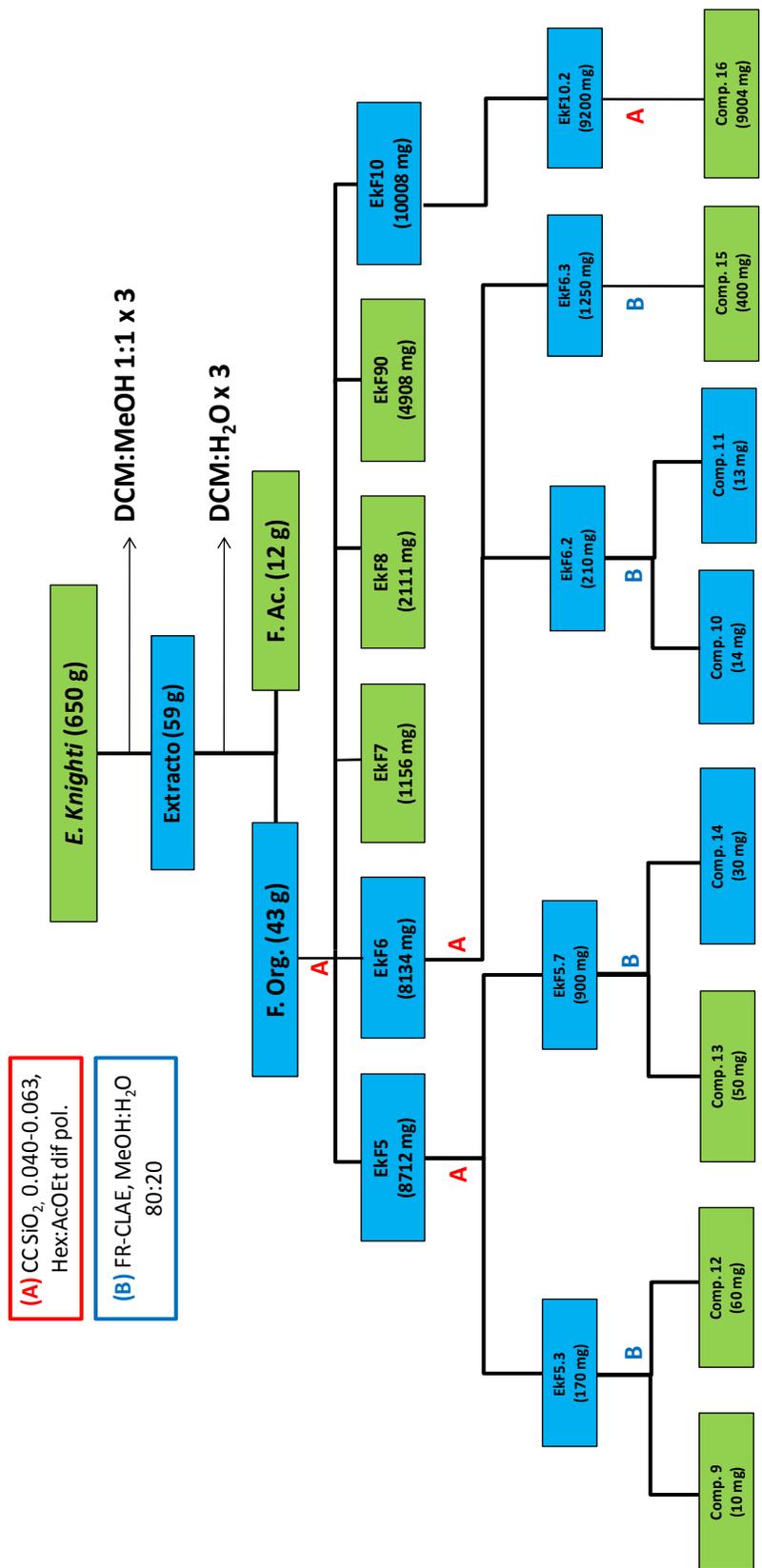


Figura 2.3. Fraccionamiento bioguiado (en IQS usando *C. violaceum*) del extracto del octocoral *E. knighti*. Las fracciones o compuestos resaltados en azul fueron activos en el ensayo de IQS

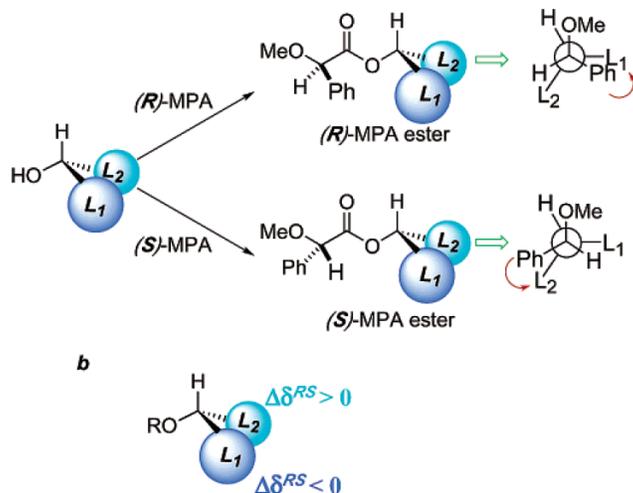


Figura 2.4. Modelo del método de Mosher para la preparación de los ésteres (R)- y (S)-MPA

2.6. IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS NATURALES AISLADOS

Para la completa identificación de los compuestos naturales aislados se usaron extensos análisis espectroscópicos (UV, IR, EM de baja y alta resolución, RMN ^1H y ^{13}C , mono- y bidimensional) y métodos químicos (transformaciones usuales en productos naturales). Para la identificación de los compuestos obtenidos por transformaciones químicas a partir de los compuestos naturales aislados, se usaron igualmente métodos espectroscópicos para su identificación (UV, IR, EM de baja y alta resolución, RMN ^1H y ^{13}C , mono- y bidimensional). La determinación de la estereoquímica absoluta fue establecida mediante múltiples experimentos de correlación espacial (NOESY), así como con la aplicación del método modificado de Mosher.

A continuación se muestran los datos espectroscópicos y físicos de los compuestos naturales aislados y de los compuestos sintéticos obtenidos mediante transformaciones químicas.

2.7. DATOS ESPECTROSCÓPICOS, RAYOS X Y ALGUNAS TRANSFORMACIONES QUÍMICAS DE LOS COMPUESTOS AISLADOS DEL OCTOCORAL *p. flagellosa*¹

2.7.1. Datos espectroscópicos del octocoral *P. flagellosa*

8S-Plexaurolona (1)

Cristales blancos; $[\alpha]_D^{25}$ -6.6 (c 0.23, CHCl_3); IR (KBr), ν_{max} 3417, 1697, 1643, 879 cm^{-1} ; Datos de RMN ^1H y ^{13}C , ver tablas 2.2 y 2.3, respectivamente; ESIMS m/z 345 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; HRESIMS m/z 345.2385 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (Calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}_3\text{Na}$, 345.2406).

8R-plexaurolona (2)

Cristales blancos; $[\alpha]_D^{25}$ +18.0 (c 0.22, CHCl_3); IR (KBr), ν_{max} 3417, 1697, 1643, 879 cm^{-1} ; Datos de RMN ^1H y ^{13}C , ver tablas 2.2 y 2.3, respectivamente; ESIMS m/z 345 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; HRESIMS m/z 345.2386 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (Calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}_3\text{Na}$, 345.2406).

8S-dihidroplexaurolona (3)

Cristales blancos; $[a]_D^{25} +49.0$ (c 0.25, CH₂Cl₂); IR (KBr), ν_{\max} 3433, 1689, 1643, 887 cm⁻¹; Datos de RMN ¹H y ¹³C, ver tablas 2.2 y 2.3, respectivamente; ESIMS m/z 347 [M + Na]⁺; HRESIMS m/z 347.2568 [M+Na]⁺ (Calculado para C₂₀H₃₆O₃Na, 347.2562).

8R-dihidroplexauroolona (4)

Cristales blancos; $[a]_D^{25} +40.5$ (c 0.29, CHCl₃); IR (KBr), ν_{\max} 3433, 1689, 1643, 887 cm⁻¹; Datos de RMN ¹H y ¹³C, ver tablas 2.2 y 2.3, respectivamente; ESIMS m/z 347 [M + Na]⁺; HRESIMS m/z 347.2563 [M+Na]⁺ (Calculado para C₂₀H₃₆O₃Na, 347.2562).

8S-dehidroxiplexauroolona (5)

Polvo incoloro; $[a]_D^{25} -4.8$ (c 0.23, CHCl₃); IR (KBr), ν_{\max} 1705, 1651, 887 cm⁻¹; Datos de RMN ¹H y ¹³C, ver tablas 2.2 y 2.3, respectivamente; ESIMS m/z 329 [M + Na]⁺; HRESIMS m/z 329.2456 [M+Na]⁺ (Calculado para C₂₀H₃₄O₂Na, 329.2457).

8R-dehidroxiplexauroolona (6)

Polvo incoloro; $[a]_D^{25} +3.0$ (c 0.22, CHCl₃); IR (KBr), ν_{\max} 1705, 1651, 887 cm⁻¹; Datos de RMN ¹H y ¹³C, ver tablas 2.2 y 2.3, respectivamente; ESIMS m/z 329 [M + Na]⁺; HRESIMS m/z 329.2454 [M + Na]⁺ (Calculado para C₂₀H₃₄O₂Na, 329.2457).

8S-dehidroplexauroolona (7)

Agujas blancas; $[a]_D^{25} +6.8$ (c 0.40, CHCl₃); IR (KBr), ν_{\max} 1705, 1643, 887 cm⁻¹; Datos de RMN ¹H y ¹³C, ver tablas 2.2 y 2.3, respectivamente; ESIMS m/z 343 [M + Na]⁺; HRESIMS m/z 343.2246 [M+Na]⁺ (Calculado para C₂₀H₃₂O₃Na, 343.2249).

8R-dehidroplexauroolona (8)

Polvo incoloro; $[a]_D^{25} -3.3$ (c 0.21, CHCl₃); IR (KBr), ν_{\max} 1705, 1643, 887 cm⁻¹; Datos de RMN ¹H y ¹³C, ver tablas 2.2 y 2.3, respectivamente; ESIMS m/z 343 [M + Na]⁺; HRESIMS m/z 343.2248 [M+Na]⁺ (Calculado para C₂₀H₃₂O₃Na, 343.2249).

2.7.2. Datos cristalográficos y análisis de la estructura de Rayos-X de los compuestos 1-3 y 7

Pequeñas placas incoloras de los compuestos **1-3** y **7** fueron cristalizadas mediante una lenta evaporación de una solución de CH₃CN. Los datos fueron registrados en un difractómetro X8 APEX II BRUKER-NONIUS equipado con un aparato KYROFLEX de baja temperatura operando a 100 K. Fue escogido el cristal más adecuado y posteriormente dispuesto en un equipo Mitegen MicroMount (radiation-hard polymer). Los datos fueron medidos usando un scan omega de 0.5% por cuadro por 10 segundos, un total de 2382 cuadros fueron registrados, con una resolución final de 0.785% Å. Los datos de integración y reducción fueron analizados usando el software Apex2 Service v2010, 1-2 (BRUKER AXS). La corrección de la absorción fue realizada usando SADABS (2008) incorporado en el software anterior. Las estructuras fueron resueltas mediante el método directo usando SHELX-XS versión 2008/1 y refinadas mediante el método de mínimos cuadrados en F2 SHELXL versión 2008/4, incorporado en el software del Apex2.

(8S)-Plexauroolona (1). El refinamiento de la matriz completa mediante los mínimos cuadrados (en F^2) de 213 variables convergieron a valores residuales cristalográficos convencionales $R1 = 0.0301$ ($wR2 = 0.0809$) para los datos con $[I > 2\sigma(I)]$ y $R1 = 0.0348$ ($wR2 = 0.0829$) para todos los datos. El goodness-of-fit en F^2 fue 1.367.

Datos del cristal: Bloque incoloro: 0.42 × 0.35 × 0.16 mm; ortorrómbico; grupo espacial $P2_12_12_1$; dimensiones de unidad de celda $a = 8.2215$, $b = 13.2649$, $c = 17.1484$ Å, $V = 1870.16$ Å³, $Z = 4$, $d_{\text{calcd}} = 1.145$ Mg m⁻³.

(8R)-Plexauroлона (2). El refinamiento de la matriz completa mediante los mínimos cuadrados (en F^2) de 213 variables convergieron a valores residuales cristalográficos convencionales $R1 = 0.0458$ ($wR2 = 0.1162$) para los datos con [$I > 2\sigma(I)$] y $R1 = 0.0397$ ($wR2 = 0.1095$) para todos los datos. El goodness-of-it en F^2 fue 0.975.

Datos del cristal: Bloque incoloro: $0.50 \times 0.09 \times 0.05$ mm; monoclinico; grupo espacial $P2_1$; dimensiones de unidad de celda $a = 5.2009$, $b = 18.5086$, $c = 9.9092$ Å, $\alpha = \gamma = 90$, $\beta = 103.4814$, $V = 927.59$ Å³, $Z = 2$, $d_{calcd} = 1.155$ Mg m⁻³.

(8S)-dihidroplexauroлона (3). El refinamiento de la matriz completa mediante los mínimos cuadrados (en F^2) de 427 variables convergieron a valores residuales cristalográficos convencionales $R1 = 0.0357$ ($wR2 = 0.0904$) para los datos con [$I > 2\sigma(I)$] y $R1 = 0.0331$ ($wR2 = 0.0882$) para todos los datos. El goodness-of-it en F^2 fue 1.017.

Datos del cristal: Bloque incoloro: $0.37 \times 0.34 \times 0.28$ mm; monoclinico; grupo espacial $P2_1$; dimensiones de unidad de celda $a = 10.6225$, $b = 10.8495$, $c = 16.9084$ Å, $\alpha = \gamma = 90$, $\beta = 99.916$, $V = 1919.56$ Å³, $Z = 4$, $d_{calcd} = 1.123$ Mg m⁻³.

(8S)-dehidroplexauroлона (7). El refinamiento de la matriz completa mediante los mínimos cuadrados (en F^2) de 231 variables convergieron a valores residuales cristalográficos convencionales $R1 = 0.0514$ ($wR2 = 0.1352$) para los datos con [$I > 2\sigma(I)$] y $R1 = 0.0692$ ($wR2 = 0.1243$) para todos los datos. El goodness-of-it en F^2 fue 1.025.

Datos del cristal: agujas amarillas: $0.49 \times 0.07 \times 0.04$ mm; monoclinico; grupo espacial $P2_12_12_1$; dimensiones de unidad de celda $a = 5.6582$, $b = 17.7897$, $c = 18.6316$ Å, $\alpha = \beta = \gamma = 90$, $V = 1875.41$ Å³, $Z = 4$, $d_{calcd} = 1.135$ Mg m⁻³.

2.7.3. Transformaciones químicas de los compuestos naturales

Conversión de la 8R-plexauroлона (2) en 8R-dehidroplexauroлона

El compuesto **2** (20 mg) fue tratado con PCC (24 mg) en diclorometano seco (1 mL) durante 2 h con agitación constante y a temperatura ambiente.^{1,6} La reacción fue finalizada mediante la adición de agua (3 mL). Las fases fueron separadas y la fase acuosa extraída con diclorometano (3 x 3 mL), las fases orgánicas fueron agrupadas y lavadas con una solución saturada de cloruro de sodio, y secadas con MgSO₄. La fase orgánica fue concentrada a sequedad. El residuo fue purificado mediante CC (SiO₂, Hexano–AcOEt 90:10 v/v) para obtener un producto idéntico al compuesto **8**. El producto purificado (15.8 mg), un polvo incoloro con una $[a]_D^{25} -3.2$ (c 0.15, CHCl₃), presentó datos espectroscópicos de RMN coincidentes con los presentados por el compuesto **8** (Tabla 2.2).

Conversión de la 8S-plexauroлона (1) en 8S-dehidroplexauroлона

El compuesto **1** (20 mg) fue tratado en la misma forma como se describió para el compuesto **2**.^{1,6} El producto purificado (18.0 mg), un polvo incoloro con una $[a]_D^{25} +10.0$ (c 0.22, CHCl₃), presentó datos espectroscópicos de RMN coincidentes con los presentados por el compuesto **7** (Tabla 2.2).

Conversión de la 8R-plexauroлона (2) en 8R-dehidroxiplexauroлона

La mesilación de **2** (20 mg) fue llevada a cabo usando MsCl (13.0 mg) en piridina seca (2 mL) con agitación a temperatura ambiente durante 6 h.⁷ Posteriormente agua-hielo fue adicionada a la mezcla de reacción y el producto fue extraído con diclorometano (3 x 2 mL). Las fases orgánicas fueron separadas y concentradas. Posteriormente el residuo fue tratado con LiAlH₄ (3.0 mg) en THF seco (2 mL) a temperatura ambiente. Luego de 5 horas, la mezcla fue tratada gota a gota con una solución de NaOH 1M. La mezcla final fue

⁶ Chan, W. R.; Tinto, W. F.; Manchand, P. S.; Todaro, L. S.; Ciereszko, L. S. **1989**. New cembranoids from *Plexaura*. *Tetrahedron* **45**, 103-106.

⁷ Tello, E.; Castellanos, L.; Arévalo, C.; Duque, C. **2009**. New cembranoid diterpenes from the caribbean sea whip *Eunicea knighti*. *J. Nat. Prod.* **72**, 1595-1602.

filtrada y purificada mediante CC (SiO₂, Hexano–AcOEt 90:10 v/v) para obtener un producto idéntico al compuesto **6**. El producto purificado (3.2 mg), un polvo incoloro con una $[\alpha]_D^{25} +3.1$ (c 0.23, CHCl₃), presentó datos espectroscópicos de RMN ¹H coincidentes con los presentados para el compuesto **6** (Tabla 2.2).

Conversión de la 8S-plexaurolona (**1**) en 8S-dehidroxiplexaurolona

El compuesto **1** (20 mg) fue tratado en la misma forma como se describió para el compuesto **2**.⁷ El producto purificado (2.8 mg) fue un polvo incoloro con una $[\alpha]_D^{25} -4.4$ (c 0.22, CHCl₃), presentó datos espectroscópicos de RMN ¹H coincidentes con los presentados para el compuesto **5** (Tabla 2.2).

Conversión de la 8S-dihidroxiplexaurolona (**3**) en **49**

El compuesto **3** (20 mg) fue disuelto en 3 mL de diclorometano acidificado (a esta solución fueron adicionados 150 µL de ácido acético). La transformación *in situ* de **3** en un compuesto cuyas características en CCD fueron iguales a las del compuesto **49**, fue establecida por los cambios de Rf.

2.8. DATOS ESPECTROSCÓPICOS Y ALGUNAS TRANSFORMACIONES QUÍMICAS DE LOS COMPUESTOS AISLADOS DEL OCTOCORAL *E. knighti*²

2.8.1. Datos espectroscópicos del octocoral *E. knighti*

Knightina (9). Aceite incoloro; $[\alpha]_D^{25} -7.9$ (c 0.24, CHCl₃); IR, (CH₂Cl₂) ν_{\max} 2938, 1643, 1459, 1228, 879, 745 cm⁻¹; Datos de RMN ¹H y ¹³C, ver Tabla 2.4. HRESIMS m/z 311.2321 [M+Na]⁺ (Calculado para C₂₀H₃₂O₄Na, 311.2351).

11(R)-hidroxi-12(20)-en-knightal (10). Aceite incoloro; $[\alpha]_D^{25} +14.3$ (c 0.28, CHCl₃); UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 242 (4.56) nm. IR, (CH₂Cl₂) ν_{\max} 3455, 3036, 2938, 2794, 1715, 1459, 1205, 878, 745 cm⁻¹; Datos de RMN ¹H y ¹³C, ver Tabla 2.4. HRESIMS m/z 341.2075 [M+Na]⁺ (Calculado para C₂₀H₃₀O₃Na, 341.2087).

Acetato de 11(R)-hidroxi-12(20)-en-knightol (11). Aceite incoloro; $[\alpha]_D^{25} +29.6$ (c 0.27, CHCl₃); IR, (CH₂Cl₂) ν_{\max} 3301, 3027, 2975, 1742, 1644, 1195, 878, 745 cm⁻¹; Datos de RMN ¹H y ¹³C, ver Tabla 2.4. HRESIMS m/z 385.2358 [M+Na]⁺ (Calculado para C₂₂H₃₄O₄Na, 385.2349).

Knightol (12). Aceite incoloro; $[\alpha]_D^{25} -32.0$ (c 0.25, CHCl₃); IR (CH₂Cl₂) ν_{\max} 3420, 3070, 2930, 1643, 1452, 1074, 886, 736 cm⁻¹; RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz), δ 1.97 (m, 1H, H-1), 1.82 (m, 1H, H-2a), 2.37 (m, 1H, H-2b), 5.51 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-3), 2.22 (m, 1H, H-5a), 2.33 (m, 1H, H-5b), 1.49 (m, 1H, H-6a), 2.02 (m, 1H, H-6b), 2.76 (dd, $J = 7.5, 3.4$ Hz, 1H, H-7), 1.42 (m, 1H, H-9a), 2.04 (m, 1H, H-9b), 1.59 (m, 1H, H-10a), 2.16 (m, 1H, H-10b), 5.19 (br t, $J = 6.6$ Hz, 1H, H-11), 2.17 (m, 1H, H-13a), 2.22 (m, 1H, H-13b), 1.45 (m, 1H, H-14a), 1.59 (m, 1H, H-14b), 1.68 (s, 3H, H-16), 4.61 (br s, 1 H, H-17a), 4.73 (br s, 1H, H-17b), 4.03 (d, $J = 12.6$ Hz, 1H, H-18a), 4.09 (d, $J = 12.6$ Hz, 1H, H-18b), 1.21 (s, 3H, H-19), 1.61 (s, 3H, H-20); RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz), δ 45.3 (d, C-1), 29.5 (t, C-2), 125.4 (d, C-3), 139.3 (s, C-4), 24.6 (t, C-5), 26.6 (t, C-6), 64.5 (d, C-7), 60.5 (s, C-8), 37.2 (t, C-9), 23.8 (t, C-10), 124.8 (d, C-11), 135.2 (s, C-12), 36.4 (t, C-13), 30.5 (t, C-14), 148.3 (s, C-15), 19.4 (q, C-16), 110.5 (t, C-17), 66.6 (t, C-18), 16.9 (q, C-19), 15.4 (q, C-20); HRESIMS m/z 327.2301 [M + Na]⁺ (Calculado para C₂₀H₃₂O₂Na, 327.2294).

Acetato de knightol (13). Aceite incoloro; $[\alpha]_D^{25} -60.0$ (c 0.25, CHCl₃); IR (CH₂Cl₂) ν_{\max} 3069, 1742, 1228, 1074, 735 cm⁻¹; RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz), δ 1.96 (m, 1H, H-1), 1.82 (m, 1H, H-2a), 2.38 (m, 1H, H-2b), 5.56 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-3), 2.23 (m, 1H, H-5a), 2.30 (m, 1H, H-5b), 1.46 (m, 1H, H-6a), 1.88 (m, 1H, H-6b), 2.74 (dd, $J = 7.4, 3.4$ Hz, 1H, H-7), 1.42 (m, 1H, H-9a), 2.00 (m, 1H, H-9b), 1.59 (m, 1H, H-10a), 2.16 (m, 1H, H-10b), 5.16 (t, $J = 6.7$ Hz, 1H, H-11), 2.14 (m, 1H, H-13a), 2.22 (m, 1H, H-13b), 1.44 (m, 1H, H-14a), 1.58 (m, 1H, H-14b), 1.66 (s, 3H, H-16), 4.60 (br s, 1 H, H-17a), 4.71 (br s, 1H, H-17b), 4.43 (d, $J = 12.3$ Hz, 1H, H-18a), 4.54 (d, $J = 12.3$

H_z, 1H, H-18b), 1.20 (s, 3H, H-19), 1.59 (s, 3H, H-20), 2.06 (s, 3H, H-22); RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz), δ 45.1 (d, C-1), 29.7 (d, C-2), 129.2 (d, C-3), 134.4 (s, C-4), 24.9 (t, C-5), 26.5 (t, C-6), 64.3 (d, C-7), 60.5 (s, C-8), 37.2 (t, C-9), 23.8 (t, C-10), 124.8 (d, C-11), 135.2 (s, C-12), 36.3 (t, C-13), 30.4 (t, C-14), 148.0 (s, C-15), 19.4 (q, C-16), 110.7 (t, C-17), 68.1 (t, C-18), 16.9 (q, C-19), 15.4 (q, C-20), 170.8 (s, C-21), 21.0 (q, C-22); HRESIMS *m/z* 369.2406 [M + Na]⁺ (Calculado para C₂₂H₃₄O₃Na, 369.2400).

Knigtal (14). Aceite incoloro; $[a]_D^{25} +7.0$ (c 0.29, CHCl₃); UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 229 (3.39) nmIR (CH₂Cl₂) ν_{max} 3075, 1727, 1228, 1024 cm⁻¹; RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz), δ 2.09 (m, 1H, H-1), 2.10 (m, 1H, H-2a), 2.70 (m, 1H, H-2b), 6.49 (dd, *J* = 9.8, 5.0 Hz, 1H, H-3), 2.33 (dt, *J* = 13.7, 6.9 Hz, 1H, H-5a), 2.45 (dt, *J* = 14.3, 7.4 Hz, 1H, H-5b), 1.47 (m, 1H, H-6a), 1.96 (m, 1H, H-6b), 2.65 (dd, *J* = 7.3, 4.1 Hz, 1H, H-7), 1.46 (m, 1H, H-9a), 1.88 (m, 1H, H-9b), 2.13 (m, 2H, H-10), 5.21 (br t, *J* = 6.6 Hz, 1H, H-11), 2.07 (m, 1H, H-13a), 2.14 (m, 1H, H-13b), 1.53 (m, 1H, H-14a), 1.64 (m, 1H, H-14b), 1.69 (s, 3H, H-16), 4.64 (br s, 1 H, H-17a), 4.78 (br s, 1H, H-17b), 9.33 (s, 1H, H-18), 1.14 (s, 3H, H-19), 1.59 (s, 3H, H-20); RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz), δ 45.1 (d, C-1), 30.4 (t, C-2), 153.4 (d, C-3), 143.3 (s, C-4), 21.8 (t, C-5), 26.6 (t, C-6), 63.8 (d, C-7), 60.4 (s, C-8), 37.2 (t, C-9), 23.6 (t, C-10), 125.5 (d, C-11), 134.6 (s, C-12), 36.6 (t, C-13), 30.5 (t, C-14), 146.8 (s, C-15), 18.9 (q, C-16), 111.8 (t, C-17), 195.1 (d, C-18), 17.2 (q, C-19), 15.4 (q, C-20); HRESIMS *m/z* 325.2149 [M + Na]⁺ (Calculado para C₂₀H₃₀O₂Na, 325.2194).

Asperdiol (15). Sólido blanco en forma de agujas; $[a]_D^{25} -96.3$ (c 0.27, CH₂Cl₂); IR (CH₂Cl₂) ν_{max} 3440, 3068, 2925, 1640, 1060, 796 cm⁻¹; RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz), δ 2.08 (m, 1H, H-1), 4.50 (dd, *J* = 7.5, 6.0 Hz, 1H, H-2), 5.44 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-3), 2.28 (m, 1H, H-5a), 2.40 (m, 1H, H-5b), 1.51 (m, 1H, H-6a), 1.89 (m, 1H, H-6b), 2.70 (dd, *J* = 5.7, 4.5 Hz, 1H, H-7), 1.36 (m, 1H, H-9a), 2.05 (m, 1H, H-9b), 2.20 (m, 2H, H-10), 5.13 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H, H-11), 2.02 (m, 2H, H-13), 1.51 (m, 1H, H-14a), 1.74 (m, 1H, H-14b), 1.77 (s, 3H, H-16), 4.76 (br s, 1 H, H-17a), 4.95 (br s, 1H, H-17b), 4.02 (d, *J* = 13.6, 1H, H-18a), 4.10 (d, *J* = 13.5, 1H, H-18b), 1.20 (s, 3H, H-19), 1.62 (s, 3H, H-20); RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz), δ 50.6 (d, C-1), 68.4 (d, C-2), 128.7 (d, C-3), 139.5 (s, C-4), 25.8 (t, C-5), 26.6 (t, C-6), 64.9 (d, C-7), 60.4 (s, C-8), 37.5 (t, C-9), 24.1 (t, C-10), 124.6 (d, C-11), 135.5 (s, C-12), 36.1 (t, C-13), 28.1 (t, C-14), 145.8 (s, C-15), 22.4 (q, C-16), 113.7 (t, C-17), 65.6 (d, C-18), 16.6 (q, C-19), 15.9 (q, C-20); HRESIMS *m/z* 343.2243 [M + Na]⁺ (Calculado para C₂₀H₃₂O₃Na, 343.2249).

Acetato de asperdiol (16). Aceite incoloro; $[a]_D^{25} -60.0$ (c 0.27, CHCl₃); IR (CH₂Cl₂) ν_{max} 3459, 3069, 2933, 1731, 1644, 1025, 800 cm⁻¹; RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz), δ 2.09 (m, 1H, H-1), 4.50 (m, 1H, H-2), 5.47 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-3), 2.29 (m, 1H, H-5a), 2.33 (m, 1H, H-5b), 1.53 (m, 1H, H-6a), 1.86 (m, 1H, H-6b), 2.69 (dd, *J* = 5.8, 4.6 Hz, 1H, H-7), 1.32 (m, 1H, H-9a), 1.99 (m, 1H, H-9b), 2.20 (m, 2H, H-10), 5.13 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H, H-11), 2.05 (m, 2H, H-13), 1.49 (m, 1H, H-14a), 1.82 (m, 1H, H-14b), 1.76 (s, 3H, H-16), 4.77 (br s, 1 H, H-17a), 4.97 (br s, 1H, H-17b), 4.48 (d, *J* = 12.8, 1H, H-18a), 4.55 (d, *J* = 12.8, 1H, H-18b), 1.20 (s, 3H, H-19), 1.62 (s, 3H, H-20), 2.07 (s, 3H, H-22); RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz), δ 50.4 (d, C-1), 68.3 (d, C-2), 132.2 (d, C-3), 135.4 (s, C-4), 26.2 (t, C-5), 26.5 (t, C-6), 64.6 (d, C-7), 60.3 (s, C-8), 37.5 (t, C-9), 24.1 (t, C-10), 124.8 (d, C-11), 134.5 (s, C-12), 36.1 (t, C-13), 28.0 (t, C-14), 145.5 (s, C-15), 22.5 (q, C-16), 113.9 (t, C-17), 67.1 (t, C-18), 16.7 (q, C-19), 15.9 (q, C-20), 170.7 (s, C-21), 20.9 (q, C-22); HRESIMS *m/z* 385.2364 [M + Na]⁺ (Calculado para C₂₂H₃₄O₄Na, 385.2355).

2.8.2. Transformaciones químicas de los compuestos naturales

Conversión del compuesto 9

El compuesto **9** (10 mg) fue disuelto en CDCl₃ (1 mL) y un cristal de yodo fue entonces adicionado. Luego, 100 μL de CDCl₃ acidificado (HCl_(g)) fue burbujado en 1 mL de CDCl₃ durante 30 s) fue adicionado a la mezcla de reacción.^{2,7,8} luego de 36 h, la reacción fue detenida mediante la adición de agua y extraída con dietil éter (3 x 2 mL), concentrada y sometida a cromatografía en sílica gel, eluyendo con Hexano–AcOEt 90:10 v/v, para producir el compuesto puro **51** con las siguientes características físicas y espectroscópicas (4.1 mg, 41.0 %).

⁸ Greenland, J. G.; Bowden, B. F. 1994. Cembranoid diterpenes related to sarcophytol A from the soft coral *Sarcophyton trocheliophorum* (Alcyonacea). *Aust. J. Chem.* 47, 2013-2021.

Aceite incoloro; IR (CH₂Cl₂) ν_{\max} 3457, 1730, 1372, 1235, 737 cm⁻¹; RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz), 5.34 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-3), 5.25 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-11), 4.74 (br s, 1H, H-17a), 4.65 (br s, 1H, H-17b), 3.56 (dd, *J* = 9.0, 3.1 Hz, 1H, H-7), 2.53 (m, 1H, H-10), 2.40 (m, 1H, H-10), δ 2.39-1.53 (m, 12H), 1.76 (s, 3H, H-16), 1.72 (s, 3H, H-18), 1.71 (s, 3H, H-19), 1.67 (s, 3H, H-20), EM (3:1 proporción) *m/z* 347.2 [M+Na]⁺ and 349.2 [M+Na+2]⁺.

2.9. ENSAYOS ANTIFOULING IN VITRO^{1,2,9}

Con el fin de valorar las propiedades *antifouling* de las fracciones y compuestos naturales obtenidos mediante la metodología descrita en los numerales 2.4. y 2.5. se realizaron los siguientes bioensayos:

La inhibición de los sistemas de *Quorum Sensing* (IQS) de la bacteria sensora y la inhibición de *biofilm* bacteriano de la bacteria modelo. Estos dos sistemas se encuentran altamente relacionados entre sí, lo mismo que con el *microfouling* (ver marco teórico, capítulo 1).^{10,11,12,13}

2.9.1. Ensayo de Inhibición de sistemas de *Quorum Sensing*^{1,2,10,14}

El ensayo estándar de difusión en disco fue usado para establecer la actividad inhibitoria de quórum sensing de los compuestos tipo cembrano naturales y semisintéticos, siguiendo los parámetros de la NCCLS¹⁵ y usando la cepa biosensora *Chromobacterium violaceum* (ATCC 31532), la cual se cultivó en agar tripticasa de soya. Los sensidiscos Whatman (5.2 mm de diámetro) inicialmente esterilizados a 10 x 10⁴ Pa de presión durante 15 minutos fueron cargados con 30.0, 15.0, 7.5, 5.0 y 2.5 μ g de cada compuesto (**1-16**) previamente disueltos en MeOH y secados a temperatura ambiente durante 1 h. Los sensidiscos fueron dispuestos en las cajas de Petri servidas con agar y 100 μ L del cultivo de *C. violaceum* crecido en caldo tripticasa de soya (10⁶ cfu/mL, 0.5 Mac Farland). Posteriormente las cajas de agar fueron incubadas durante 48 h a 26°C. Este ensayo de inhibición de QS está basado en la inhibición de la producción del pigmento violeta cuando los sistemas de QS son interrumpidos en *C. violaceum* sin interferir en el crecimiento bacteriano. De este modo, la actividad inhibitoria de QS de los compuestos fue establecida por la aparición de un halo incoloro pero viable y evaluada cuantitativamente como la mínima cantidad del compuesto (en μ g por disco) requerida para inhibir la producción del pigmento violeta en las zonas de inhibición alrededor de los discos.¹⁶ El ácido kójico un reconocido inhibidor de sistemas de quorum sensing^{1,10,17} fue usado como control positivo, adicionalmente, el agente antifouling Cu₂O fue también evaluado como otro control positivo.¹⁸

2.9.2. Ensayo de evaluación de la actividad inhibitoria del Biofilm bacteriano^{1,2}

La inhibición de la formación del biofilm bacteriano fue desarrollada en placas multipozo de poliestireno (96 pozos), los pre-inóculos de las cepas bacterianas *Vibrio harveyi*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* fueron crecidas en el medio de cultivo Luria-Bertani, a una densidad óptica (DO) a 600 nm de 0.2-0.3

⁹ Tello, E.; Castellanos, L.; Duque, C. **2013**. Synthesis of cembranoid analogues and evaluation of their potential as quorum sensing inhibitors. *Bioorg. & Med. Chem.* **21**, 242-256. DOI 10.1016/j.bmc.2012.10.022.

¹⁰ Dobretsov, S.; Teplitski, M.; Bayer, M.; Gunasekera, S.; Proksch, P.; Paul, V. J. **2011**. Inhibition of marine biofouling by bacterial quorum sensing inhibitors. *Biofouling* **27**, 893-905.

¹¹ Steidle, A.; Allesen-Holm, M.; Riedel, K.; Berg, G.; Givskov, M.; Molin, S.; Eberl, L. **2002**. Identification and characterization of an N-acyl-homoserine lactone-dependent quorum-sensing system in *Pseudomonas putida* strain IsoF. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, **12**, 6371-6382.

¹² Reading, N. C.; Sperandio, V. **2006**. Quorum sensing: the many languages of bacteria. *FEMS Microb. Lett.* **254**, 1-11.

¹³ Clare, A. S.; Rittschof, D.; Gerhart, D. J.; Maki, J. S. **1992**. Molecular approaches to nontoxic antifouling. *Invert. Repr. Dev.* **22**, 67-76.

¹⁴ Briand, J. F. **2009**. Marine antifouling laboratory bioassays: an overview of their diversity. *Biofouling* **25**, 297-311.

¹⁵ National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. Fourteenth Informational Supplement. NCCLS document M100-514. NCCLS, Wayne, PA, 2004.

¹⁶ Fotso, S.; Zabriskie, T. M.; Proteau, P. J.; Flatt, P. M.; Santosa, D. A.; Sulastri, M. T. **2009**. Limazepines A-F, pyrrolo[1,4]benzodiazepine Antibiotics from an Indonesian Micrococcus sp. *J. Nat. Prod.* **72**, 690-695.

¹⁷ Dobretsov, S.; Teplitski, M.; Paul, V. **2009**. Mini-review: quorum sensing in the marine environment and its relationship to biofouling. *Biofouling* **25**, 413-427.

¹⁸ Omae, I. **2003**. General aspects of tin-free antifouling paints. *Chem. Rev.* **103**, 3431-3448.

A. Posteriormente, veinte microlitros (20 μ L) de cada suspensión bacteriana fue inoculada en cada pozo y mezclada con tres diferentes concentraciones (0.5, 1.0, 2.5, 10 y 100 ppm) de cada compuesto puro **1-16**. Finalmente, cada pozo fue llevado a 200 μ L de volumen con medio de cultivo LB. Los microplatos fueron incubados durante 48 h a 27° C. Después de descartar el medio de cultivo por inversión de las placas, los pozos fueron lavados tres veces con agua destilada (200 μ L/pozo), la bacteria remanente adherida a la superficie de los pozos fue teñida durante 5 minutos con 200 μ L de cristal violeta (1%), el cual fue posteriormente descartado por inversión de las placas y cada pozo fue lavado dos veces con agua destilada (200 μ L/pozo). Una solución de etanol–acetona (200 μ L, 80:20 v/v) fue adicionada durante 10 minutos para redissolver el colorante. La diferencia de tinción en los pozos fue cuantificada mediante la absorbancia a 621 nm usando un escáner de microelisa (Merck). Para cada experimento, una corrección de la línea base fue realizada sustrayendo el valor de absorbancia del blanco (cristal violeta adicionado sobre los pozos no inoculados). El valor promedio de absorbancia del cultivo bacteriano teñido sin ningún compuesto fue usado como línea base para calcular la inhibición del biofilm bacteriano. El control de la inhibición del crecimiento fue monitoreado midiendo la absorbancia de cada pozo a 621 nm antes y después de la incubación.

2.10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

2.10.1. Compuestos aislados del octocoral *P. flagellosa*¹

El material congelado del octocoral *P. flagellosa* recolectado en la Bahía de Santa Marta, en el Caribe Colombiano, fue extraído con CH₂Cl₂-MeOH (50:50 v/v) y el extracto crudo obtenido luego de la evaporación del solvente fue sometido a una partición L-L entre CH₂Cl₂-H₂O (50:50 v/v). La fracción orgánica resultante resultó activa en el ensayo de inhibición de QS, por lo cual fue sometida a sucesivas cromatografías en columnas sobre sílica gel y finalmente a CLAE-fase reversa para obtener los compuestos puros **1-8**.

El compuesto **1**, aislado como cristales blancos, presentó una fórmula molecular de C₂₀H₃₄O₃ con cuatro grados de insaturación asignada usando RMN ¹³C y el ion aducto en *m/z* 345.2385 [M+Na]⁺ observado en su espectro de masas de alta resolución en modo electrospray. Su espectro IR reveló la presencia de los grupos hidroxilo, carbonilo y olefina por la presencia de las bandas en 3441 cm⁻¹, 1705 cm⁻¹, 1643 cm⁻¹ y 879 cm⁻¹, respectivamente. Los datos de RMN ¹H de **1** (Tabla 2.2) mostraron cuatro grupos metilos (δ 1.66, s; δ 1.02, d, *J* = 6.9 Hz; δ 0.98, d, *J* = 6.8 Hz; δ 0.94, d, *J* = 6.8 Hz), el primero como un sustituyente de una olefina y los otros tres como sustituyentes alifáticos. También, la presencia de la señal correspondiente a un protón carbinólico (δ 3.33, d, *J* = 9.0 Hz) pudo ser establecida. Por otra parte, el espectro de RMN ¹H reveló la presencia de dos singletes anchos correspondientes a los protones de un metileno terminal en δ 4.66 y en δ 4.71. Los datos de RMN ¹³C de **1** (Tabla 2.3) revelaron la presencia de 20 señales de carbonos, las cuales fueron asignadas mediante la ayuda del experimento DEPT a cuatro metilos, ocho metilenos (uno olefínico resonando a δ_c 109.9), cinco metinos sp³ (incluyendo un carbono mono-oxigenado resonando a δ_c 70.7) y tres carbonos cuaternarios (incluyendo dos cetonas resonando a δ_c 214.4 y δ_c 211.4 y un carbón olefínico a δ_c 148.7). Los datos anteriores permitieron establecer tres de los cuatro grados de insaturación, por lo cual se pudo inferir una estructura cíclica tipo cembrano para **1**.^{19, 20,21,22} Del experimento COSY fue posible establecer tres sistemas de espines (Figura 2.5), el más grande desde H₂-5 pasando a través de H-1 hasta H₃-20, el segundo desde H₂-7 hasta H₂-10 y el último por el acoplamiento a larga distancia entre H₃-16 y H₂-17, los cuales fueron correlacionados con los carbonos cuaternarios C-6 y C-11 por medio del entrecruzamiento de picos observado en el experimento gHMBC, este experimento mostró las siguientes correlaciones claves: H-3 con C1, C-5 y C-18; H₃-18 con C-3, C-4 y C-5; H₃-19 con C-7, C-8 y C-9; H₃-20 con C-11, C-12 y C-13 y H₃-16 con C-1, C-15 y C-17 (Figura 2.6).

¹⁹ Rodríguez, A. D. **1995**. The natural products chemistry of west Indian gorgonian octocorals. *Tetrahedron* *51*, 4571-4618.

²⁰ Berrue, F.; Kerr, R. S. **2009**. Diterpenes from gorgonian corals. *Nat. Prod. Rep.* *26*, 681-710.

²¹ Mattern, M. L.; Scott, W. D.; McDaniel, C. A.; Weldon, P. J.; Graves, D. E. **1997**. Cembrene A and a Congeneric Ketone Isolated from the paracloacal glands of the Chinese alligator (*Alligator sinensis*). *J. Nat. Prod.* *60*, 828-831.

²² Marville, K. I.; McLean, S.; Reynolds, W. F.; Tinto, W. F. **2003**. New cembrane diterpenes of the marine octocoral *Eunicea tourneforti* from the eastern Caribbean. *J. Nat. Prod.* *66*, 1284-1287.

Tabla 2.2. RMN ¹H (400 MHz en CDCl₃) para los compuestos **1-8** y **49**

Compuesto	1	2	3 ^a	4	5	6	6	8	49
Posición ^b	δ _H , (J en Hz)	δ _H , (J en Hz)							
1	2.16, m	2.14, m	2.23, m	2.21, m	1.81, m	1.79, m	2.54, m	2.55, m	2.08, m
2a	1.60, m	1.53, m	1.61, m	1.61, m			1.24, m	1.03, m	2.12, m
2b	1.34, m	1.34, m	1.40, m	1.38, m	1.25, m	1.34, m	0.96, m	0.96, m	1.22, m
3a			3.45, ddd (9.0, 6.4, 2.7)	3.43, d (10.9)	1.08, m	1.13, m			3.95, ddd (12.6, 7.0, 2.4)
3b	3.33, d (9.0)	3.34, d (10.4)				1.01, m			
4	2.00, m	2.17, m	2.09, m	2.08, m	2.06, m	2.25, m	2.43, m	2.36, m	2.27, qt (14.0, 7.1)
5a	2.37, m	2.74, m	2.47, dd (15.0, 11.3)	2.44, dd (16.4, 9.8)	2.53, m	2.49, m	2.17, m	1.64, m	2.04, m
5b	2.23, m	2.65, m	2.36, m	2.31, m	2.32, m	2.18, m	1.52, m	1.57, m	1.70, m
6	----	----	----	----	----	----	----	----	----
7a	2.53, m	2.64, m	2.58, dd (16.4, 9.8)	2.59, dd (15.0, 11.3)	2.25, m	2.23, m	2.08, m	2.53, m	1.80, m
7b	2.30, m	2.52, m	2.31, m	2.26, m	2.11, m	2.11, m	2.01, m	2.27, m	1.65, m
8	2.12, m	2.20, m	1.50, m	1.49, m	1.90, m	1.48, m	1.90, m	2.12, m	1.58, m
9a	1.48, m	1.53, m	1.58, m	2.15, m			1.33, m	1.55, m	1.74, m
9b	1.24, m	1.36, m	1.27, m		1.92, m	1.48, m	0.89, m	1.36, m	1.13, m
10a	2.49, m	2.42, m	1.48, m	1.42, m	2.13, m	2.35, m	2.94, m	2.41, m	1.57, m
10b	2.23, m	2.33, m	1.40, m	1.17, m	2.06, m	2.30, m	2.47, m	2.32, m	1.44, m
11	----	----	3.32, d (10.9)	3.31, ddd (9.0, 6.4, 2.7)	----	----	----	----	4.01, dd (10.5, 4.2)
12	2.47, m	2.47, m	2.10, m	2.08, m	2.47, m	2.42, m	3.20, dd, (7.2, 3.0)	3.20, ddt, (11.0, 7.0, 3.5)	1.60, m
13a	1.46, m	2.22, m	1.48, m	1.40, m			2.52, m	2.98, dd, (16.4, 11.3)	1.51, m
13b	1.44, m	1.46, m	1.17, m	1.16, m	1.10, m	1.11, m	2.43, m	2.15, m	1.29, m
14a	1.69, m	2.16, m	1.44, m	1.52, m			3.20, m	2.80, m	2.47, td (10.1, 5.3)
14b	1.16, m	1.35, m	1.31, m	1.47, m	1.10, m	1.22, m	2.20, m	2.71, m	1.31, m
15	----	----	----	----	----	----	----	----	----
16	1.66, s	1.69, s	1.75, s	1.70, s	1.63, s	1.61, s	1.68, s	1.66, s	1.75, s
17a	4.71, br s	4.74, br s	4.75, br s	4.70, br s	4.70, s	4.68, s	4.72, br s	4.71, br s	4.88, br s
17b	4.66, br s	4.70, br s	4.69, br s	4.64, br s	4.62, s	4.59, s	4.72, br s	4.70, br s	4.83, br s
18	0.94, d (6.8)	0.94, d (6.6)	0.96, d (6.8)	0.94, d (6.8)	0.92, d (6.7)	0.93, d (6.9)	0.99, d (6.9)	0.97, d (6.9)	0.94, d (6.9)
19	0.98, d (6.8)	0.98, d (7.0)	1.01, d (6.9)	0.98, d (6.9)	0.97, d (6.6)	0.91, d (6.9)	1.04, d (6.6)	0.91, d (7.0)	0.88, d (6.9)
20	1.02, d (6.9)	1.02, d (6.9)	0.98, d (6.6)	0.96, d (6.6)	1.02, d (6.7)	1.01, d (6.9)	1.03, d (6.5)	1.03, d (7.2)	0.83, d (6.6)

^aDatos de RMN ¹H (500 MHz) en CD₂Cl₂; ^bLa completa asignación fue realizada mediante el análisis de los experimentos DEPT, gHMOC y gHMBC

Tabla 2.3. RMN ^{13}C (100 MHz) en CDCl_3 para los compuestos **1-8** y **49**

Compuesto	1	2	3^a	4	5	6	7	8	49
Posición	δ_{C} , mult. ^b								
1	43.0, CH	42.8, CH	41.8, CH	41.7, CH	46.8, CH	46.2, CH	41.4, CH	41.1, CH	43.5, CH
2	39.0, CH ₂	38.0, CH ₂	38.1, CH ₂	37.9, CH ₂	29.4, CH ₂	29.1, CH ₂	30.0, CH ₂	30.8, CH ₂	25.4, CH ₂
3	70.7, CH	72.0, CH	70.1, CH	70.1, CH	33.8, CH ₂	34.3, CH ₂	215.6, qC	215.1, qC	79.0, CH
4	37.1, CH	36.7, CH	36.5, CH	36.5, CH	28.1, CH	27.0, CH	47.2, CH	47.3, CH	37.4, CH
5	48.2, CH ₂	47.7, CH ₂	48.8, CH ₂	49.0, CH ₂	37.4, CH ₂	35.9, CH ₂	31.6, CH ₂	31.1, CH ₂	46.5, CH ₂
6	211.4, qC	211.6, qC	211.3, qC	211.8, qC	210.6, qC	210.6, qC	210.4, qC	210.7, qC	109.7, qC
7	48.3, CH ₂	47.7, CH ₂	47.9, CH ₂	47.9, CH ₂	50.9, CH ₂	50.8, CH ₂	49.5, CH ₂	50.9, CH ₂	50.7, CH ₂
8	27.4, CH	27.3, CH	38.4, CH	38.2, CH	31.4, CH	30.2, CH	29.5, CH	27.1, CH	36.3, CH
9	29.2, CH ₂	28.4, CH ₂	30.6, CH ₂	30.5, CH ₂	31.6, CH ₂	31.0, CH ₂	32.1, CH ₂	32.1, CH ₂	39.2, CH ₂
10	36.3, CH ₂	36.4, CH ₂	29.4, CH ₂	29.2, CH ₂	47.8, CH ₂	50.5, CH ₂	36.7, CH ₂	38.3, CH ₂	33.1, CH ₂
11	214.4, qC	214.5, qC	75.0, CH	75.1, CH	214.7, qC	214.7, qC	214.4, qC	214.4, qC	70.4, CH
12	46.9, CH	46.9, CH	28.1, CH	28.2, CH	46.9, CH	47.3, CH	41.5, CH	42.6, CH	29.1, CH
13	31.2, CH ₂	30.6, CH ₂	29.0, CH ₂	29.0, CH ₂	29.5, CH ₂	29.6, CH ₂	47.4, CH ₂	46.7, CH ₂	30.4, CH ₂
14	29.5, CH ₂	29.8, CH ₂	27.2, CH ₂	27.1, CH ₂	30.2, CH ₂	29.7, CH ₂	46.4, CH ₂	46.7, CH ₂	24.1, CH ₂
15	148.7, qC	149.0, qC	150.2, qC	149.9, qC	147.8, qC	148.3, qC	147.6, qC	147.5, qC	148.5, qC
16	20.5, CH ₃	20.8, CH ₃	21.1, CH ₃	21.3, CH ₃	20.4, CH ₃	20.6, CH ₃	20.1, CH ₃	20.3, CH ₃	23.3, CH ₃
17	109.9, CH ₂	110.2, CH ₂	109.0, CH ₂	109.3, CH ₂	110.0, CH ₂	110.0, CH ₂	110.6, CH ₂	110.6, CH ₂	110.4, CH ₂
18	13.2, CH ₃	14.2, CH ₃	13.4, CH ₃	13.6, CH ₃	21.0, CH ₃	21.1, CH ₃	16.4, CH ₃	16.5, CH ₃	13.6, CH ₃
19	21.0, CH ₃	21.2, CH ₃	20.9, CH ₃	21.1, CH ₃	20.3, CH ₃	21.0, CH ₃	21.5, CH ₃	22.0, CH ₃	24.5, CH ₃
20	15.9, CH ₃	15.5, CH ₃	16.1, CH ₃	16.2, CH ₃	16.6, CH ₃	15.9, CH ₃	17.3, CH ₃	17.2, CH ₃	16.0, CH ₃

^aDatos de RMN ^{13}C (125 MHz) en CD_2Cl_2 ; ^bLa completa asignación de fue realizada mediante el análisis de los resultados de los experimentos DEPT, COSY, gHMQC y gHMBC

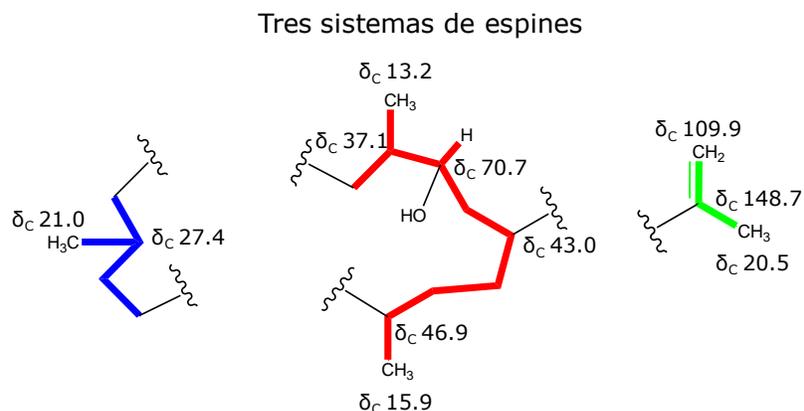


Figura 2.5. Sistemas de espines para el compuesto **1** establecidos mediante el experimento COSY.

Por lo tanto, con base en los resultados anteriores y mediante el uso de los experimentos COSY y gHMBC, la estructura plana de **1** fue establecida (Figura 2.6) y fue evidente que el compuesto **1** posee la misma estructura plana tipo cembrano que la plexaurolona previamente aislada del octocoral referido en la literatura como *Plexaura A.*^{23,24} Sin embargo los datos bibliográficos disponibles en la literatura no presentan una asignación inequívoca de las señales de RMN ni tampoco se reporta claramente su estereoquímica absoluta, como se puede apreciar en las contradicciones de los dos reportes, *8S* reportada por Ealick y colaboradores²³ y *8R* reportada por Chan *et al.*²⁴ El análisis de los espectros de RMN bidimensionales (COSY, gHMBC y gHMBC) de **1** permitió relacionar todos los carbonos con sus respectivos protones y asignar todas las señales de RMN (Tablas 2.2 y 2.3).

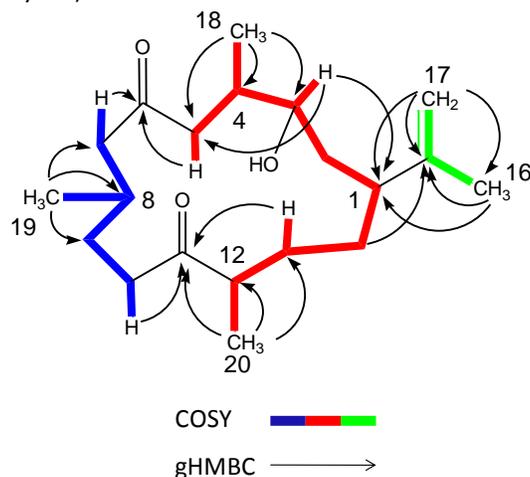


Figura 2.6. Principales correlaciones observadas en el experimento gHMBC para el compuesto **1**.

Adicionalmente, se realizó un estudio detallado de la configuración espacial de **1** usando experimentos NOESY, el método modificado de Mosher y el difractograma de Rayos-X. Algunas correlaciones clave NOE permitieron establecer la configuración relativa de **1** como *1R*,3R*,4R*,8S*,12R**, particularmente el entrecruzamiento de picos entre H-12 y H₃-19, H-3 y H-1/H₃-18 y el análisis del diagrama ORTEP tomado del monocristal mediante difracción de Rayos-X (Figura 2.7).

²³ Ealick, S. E.; Van der Helm, D.; Gross, R. A.; Weinheimer, A. J.; Ciereszko, L. S.; Middlebrook, R. E. **1980**, The structure and absolute configuration at low temperature of the acetate derivative of plexaurolone, a marine cembranoid. *Acta Cryst. B36*, 1901-1907.

²⁴ Chan, W. R.; Tinto, W. F.; Manchand, P. S.; Todaro, L. S.; Ciereszko, L. S. **1989**. New cembranoids from *Plexaura*. *Tetrahedron* **45**, 103-106.

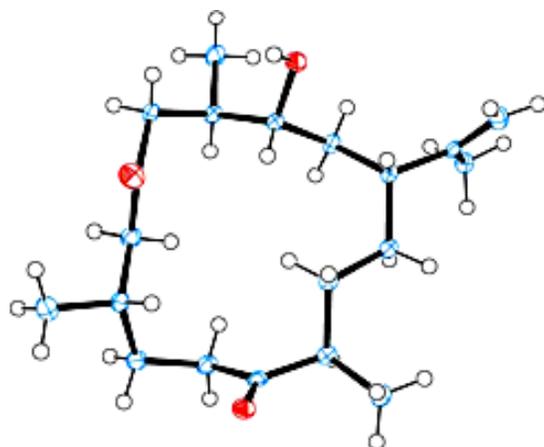


Figura 2.7. Diagrama ORTEP del compuesto **1**.

La configuración absoluta en C-3 del compuesto **1** fue establecida como *R* mediante la aplicación del método modificado de Mosher, usando MPA como reactivo de derivatización para el grupo hidroxilo presente en C-3.^{3,4} Los datos de las diferencias de los desplazamientos químicos ($\Delta\delta^{R^5}$) seleccionados para los ésteres (*R*)- y (*S*)- MPA **1a** y **1b**, respectivamente, se presentan en la Tabla 2.4. Así, el análisis global de toda la información permitió establecer la estructura de **1** como 1*R*,3*R*,4*R*,8*S*,12*R*-6,11-dicetocembra-15(17)-en-3-ol (8*S*-plexaurolona) (Figura 2.8). La estereoestructura del compuesto **1** es idéntica a la publicada por Ealick *et al.*²³ y está mal representada en el artículo publicado por Chan y colaboradores²⁴

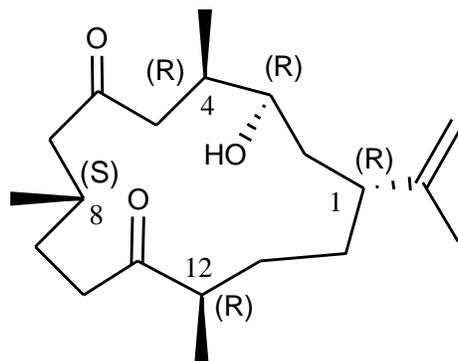


Figura 2.8. Estereoestructura del compuesto **1**.

Tabla 2.4. Datos espectroscópicos seleccionados de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) para los ésteres MPA en C-3 para **1a,b**, **2a,b** y en C-11 para **4a,b**, **241a,b** y sus respectivos valores de $\Delta\delta^{\text{RS}} = \delta^{\text{R}} - \delta^{\text{S}}$

No.	1a	1b	$\Delta\delta^{\text{RS}}$	2a	2b	$\Delta\delta^{\text{RS}}$	4a	4b	$\Delta\delta^{\text{RS}}$	49a	49b	$\Delta\delta^{\text{RS}}$
H-16	1.65, s	1.51, s	+0.140	1.63, s	1.60, s	+0.030	1.67, s	1.71, s	-0.040	1.67, s	1.71, s	-0.040
H-17a	4.68, br s	4.40, br s	+0.280	4.72, br s	4.32, br s	+0.400	4.64, br s	4.69, br s	-0.050	4.65, br s	4.68, br s	-0.030
H-17b	4.73, br s	4.58, br s	+0.160	4.76, br s	4.57, br s	+0.190	4.67, s	4.70, s	-0.030	4.67, s	4.70, s	-0.030
H-18	0.69, d, $J = 6.8 \text{ Hz}$	0.90, $J = 7.0 \text{ Hz}$	-0.210	0.97, d, $J = 6.8 \text{ Hz}$	1.27, $J = 7.0 \text{ Hz}$	-0.300	0.94, d, $J = 7.0 \text{ Hz}$	0.93, d, $J = 6.8 \text{ Hz}$	+0.010	0.94, d, $J = 7.3 \text{ Hz}$	0.93, d, $J = 6.9 \text{ Hz}$	+0.010
H-19	0.98, d, $J = 7.0 \text{ Hz}$	0.98, d, $J = 7.0 \text{ Hz}$	0.000	1.02, d, $J = 6.8 \text{ Hz}$	0.96, d, $J = 6.9 \text{ Hz}$	0.060	0.92, d, $J = 7.0 \text{ Hz}$	0.85, d, $J = 6.5 \text{ Hz}$	+0.070	0.92, d, $J = 7.2 \text{ Hz}$	0.85, d, $J = 6.6 \text{ Hz}$	+0.070
H-20	1.02, d, $J = 6.9 \text{ Hz}$	1.02, d, $J = 6.9 \text{ Hz}$	0.000	1.12, d, $J = 6.9 \text{ Hz}$	0.98, d, $J = 6.6 \text{ Hz}$	0.140	0.52, d, $J = 6.6 \text{ Hz}$	0.66, d, $J = 6.7 \text{ Hz}$	-0.140	0.52, d, $J = 6.7 \text{ Hz}$	0.65, d, $J = 6.7 \text{ Hz}$	-0.130
H-3	4.76, s	4.76, s	0.000	4.77, s	4.77, s	0.000	2.76, dd, $J = 16.0,$ 10.8 Hz	2.71, dd, $J =$ 15.9, 10.8 Hz	+0.050	2.76, dd, $J =$ 16.0, 10.7 Hz	2.70, dd, $J =$ 16.0, 10.7 Hz	+0.060
H-4	2.12, m	2.40, m	-0.280	2.01, m	2.31, m	-0.300	---	---	---	2.27, m	2.27, m	0.000
H-5	2.58, m	2.65, m	-0.070	2.43, dd, J $= 15.5, 7.1 \text{ Hz}$	2.62, dd, $J = 14.4,$ 11.9 Hz	-0.190	2.42, m, $J = 14.6,$ 3.1 Hz	2.31, dd, $J =$ 14.7, 2.9 Hz	+0.050	2.04, m	2.04, m	0.000

El compuesto **2**, fue obtenido como cristales blancos con una fórmula molecular $C_{20}H_{34}O_3$ asignada usando RMN ^{13}C y el ión aducto en m/z 345.2386 $[M+Na]^+$ observado en su espectro de masas de alta resolución en modo electrospray y cuatro grados de insaturación. Su espectro IR reveló la presencia de bandas correspondientes a grupos hidroxilo, carbonilo y olefinas en 3417 cm^{-1} ; 1697 cm^{-1} ; 1643 cm^{-1} y 879 cm^{-1} , respectivamente. Las características espectroscópicas de RMN del compuesto **2** fueron muy similares a las del compuesto **1** (Tablas 2.2 y 2.3) *i.e.* los datos también revelaron la presencia de 20 señales de carbonos para un diterpeno tipo cembrano, incluyendo la presencia de tres grupos metilos (δ_H 1.02, d, $J = 6.9\text{ Hz}$,/ δ_C 15.5; δ_H 0.98, d, $J = 7.0\text{ Hz}$ / δ_C 21.2; δ_H 0.94, d, $J = 6.6\text{ Hz}$ / δ_C 14.2), un grupo isopropenilo (δ_H 4.74, br s, 4.70, br s, δ_C 110.2, CH_2 ; δ_H 1.69, s, δ_C 20.8, CH_3 ; δ_C 149.0, qC), un hidroximetino (δ_H 3.34, d, $J = 10.4\text{ Hz}$, δ_C 72.0, CH) y dos grupos cetona (δ_C 214.5, qC and δ_C 211.6, qC). El análisis de los experimentos COSY y gHMBC permitieron asignar las señales de RMN para el compuesto **2** (Tablas 2.2 y 2.3) y establecer que el compuesto **2** tiene la misma estructura plana que el compuesto **1** (Figura 2.6). Sin embargo, unas leves diferencias en los datos de RMN de estos dos compuestos, particularmente las señales asignadas a CH_2 -5 (δ_H 2.37, m, 2.23, m, δ_C 48.2, en **1**; δ_H 2.74, m, 2.65, m, δ_C 47.7, en **2**), CH_2 -7 (δ_H 2.53, m, 2.30, m, δ_C 48.3, en **1**; δ_H 2.64, m, 2.52, m, δ_C 47.7, en **2**) y CH_2 -9 (δ_H 1.48, m, 1.24, m, δ_C 29.2, en **1**; δ_H 1.53, m, 1.36, m, δ_C 28.4, en **2**) indicaron que **2** es un estereo-isómero de **1**. Además, las correlaciones claves en el experimento NOESY, particularmente el entrecruzamiento de picos entre H-12 y H-8, H-3 y H-1/ H_3 -18 y los resultados de los análisis de difracción de Rayos-X tomados del mono-cristal (Figura 2.9) claramente establecieron la configuración relativa de **2** como $1R^*,3R^*,4R^*,8R^*,12R^*$.

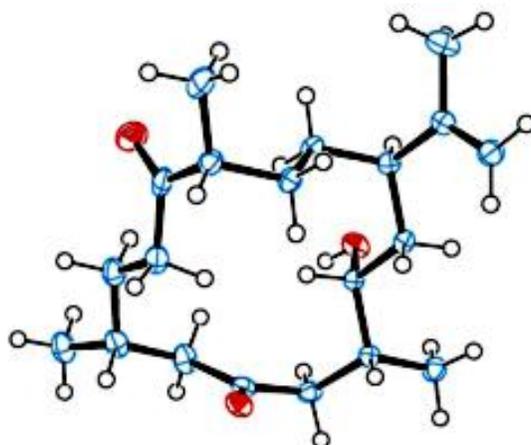


Figura 2.9. Diagrama ORTEP del compuesto **2**.

Finalmente, la configuración absoluta en C-3 del compuesto **2** fue establecida como *R* mediante la aplicación del método modificado de Mosher usando (*R*)- y (*S*)-MPA como reactivos de derivatización, como se describió para el compuesto **1**.^{3,4} Los datos selectos de las diferencias en los desplazamientos químicos ($\Delta\delta^{RS}$) para los ésteres (*R*)- y (*S*)-MPA en C-3, **2a** y **2b** respectivamente, son presentados en la Tabla 2.4. Así, la estructura de **2** fue establecida como $1R,3R,4R,8R,12R$ -6,11-diketocembra-15(17)-en-3-ol (8R-plexaurólona) (Figura 2.10). Este compuesto es un epímero en el C-8 del compuesto **1** y es la primera vez que **2** es reportado en la literatura química.

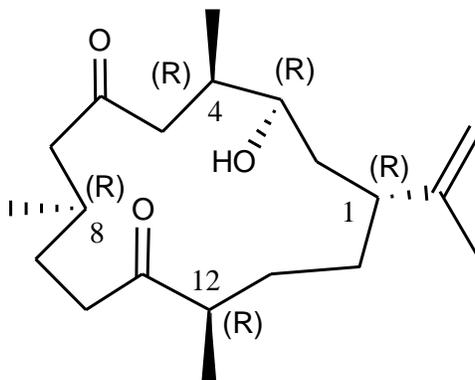


Figura 2.10. Estereoestructura del compuesto 2.

El compuesto **3**, fue aislado como un cristal incoloro ópticamente activo, el cual presentó una fórmula molecular $C_{20}H_{36}O_3$ con tres grados de insaturación asignada con base en el ión aducto observado en el espectro de masas de alta resolución en modo electro spray m/z 347.2568 $[M+Na]^+$ y en el espectro de RMN ^{13}C . Su espectro IR reveló la presencia de grupos carbonilo (1689 cm^{-1}), hidroxilo (3433 cm^{-1}) y olefina (887 cm^{-1}). Los datos de RMN (Tablas 2.2 y 2.3) del compuesto **3** (in CD_2Cl_2) mostraron características espectrales para un diterpeno tipo cembrano,^{20,21,22,24} por ejemplo la presencia de tres grupos metilos como sustituyentes alifáticos (δ_H 1.01, d, $J = 6.9$, δ_C 20.9; δ_H 0.98, d, $J = 6.6$, δ_C 16.1; δ_H 0.96, d, $J = 6.8$, δ_C 13.4) y un grupo isopropenilo (δ_H 1.75, s, δ_C 21.1, CH_3 ; δ_H 4.75, br s, 4.69, br s, δ_C 109.0, CH_2 ; δ_C 150.2, qC). También fueron observadas otras señales asociadas a dos grupos hidroximetinos (δ_H 3.45, ddd, $J = 9.0, 6.4, 2.7\text{ Hz}$, δ_C 70.1; δ_H 3.32, d, $J = 10.9\text{ Hz}$, δ_C 75.0) y a un grupo ceto (δ_C 211.3, qC). En el espectro COSY, fue posible identificar un único sistema de espines, desde H_2 -5 pasando a través de H-1 hasta H_2 -7, el cual fue acoplado con el grupo carbonilo en C-6 mediante la asistencia del experimento gHMBC (H_2 -5 y H_2 -7 con C-6) (Figura 2.11). Análisis detallados de los datos obtenidos de los espectros COSY, gHMBC y gHMBC permitieron asignar todas las señales de RMN y establecer la estructura plana de este compuesto (Tablas 2.2 y 2.3, Figura 2.11). La configuración relativa de este cembrano pudo ser establecida como $1R^*,3R^*,4R^*,8S^*,11R^*,12R^*$ mediante el análisis de la difracción de Rayos-X del diagrama ORTEP (Figura 2.12).

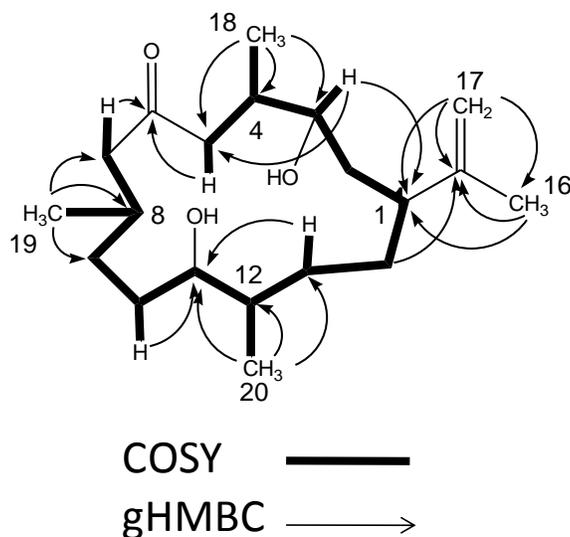


Figura 2.11. Correlaciones COSY y gHMBC para el compuesto 3

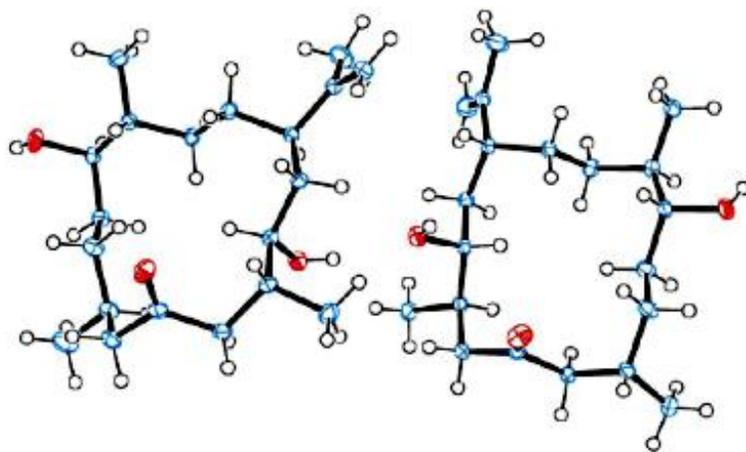


Figura 2.12. Diagrama ORTEP del compuesto **3**

Por otra parte, cuando el espectro de RMN del compuesto **3** fue tomado en CDCl_3 , pudo ser observada una conversión de este compuesto en el hemiacetal cíclico **49** (δ_c 109.7 para C-6 y δ_H 3.95, ddd, $J = 12.6, 7.0$ y 2.4 Hz, δ_c 79.0 para C-3), probablemente debido a una adición nucleofílica intramolecular del grupo hidroxilo ubicado en C-3 al grupo carbonilo en C-6 (Figura 2.13).

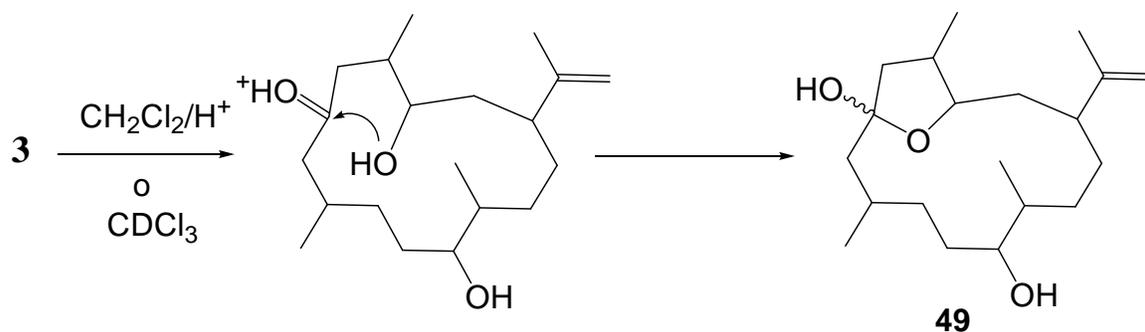


Figura 2.13. Interconversión química del compuesto **3** en **49**

Análisis detallados de los experimentos COSY, gHMBC y gHMBC permitieron asignar la estructura plana completa para el compuesto **49** (Tablas 2.2, 2.3 y Figura 2.14). Adicionalmente, cuando el compuesto **3** fue solubilizado en CDCl_3 y rápidamente fue registrado su espectro de RMN ^1H , se pudo observar una mezcla entre los compuestos **3** y **49**, es decir la conversión del compuesto **3** en el hemiacetal cíclico **49**.

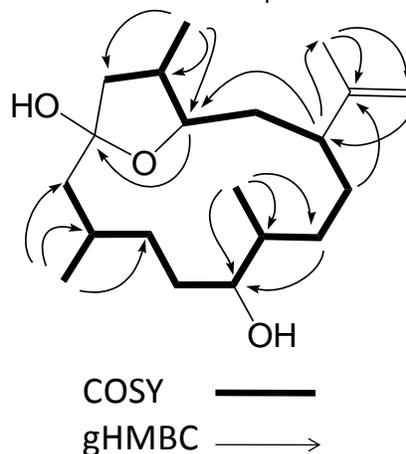


Figura 2.14. Correlaciones COSY y gHMBC para el compuesto **49**

Para establecer la configuración absoluta del compuesto **3**, éste fue completamente convertido en el compuesto **49** *in situ*, disolviéndolo en CH₂Cl₂ acidificado. Entonces, se procedió a realizar la esterificación del grupo hidroxilo localizado en C-11 en el compuesto **49** con los agentes derivatizantes (R)- and (S)-MPA^{3,4,5} para obtener de este modo el par de diastereoisómeros, **49a** y **49b** respectivamente, los cuales fueron analizados para establecer sus principales diferencias en los desplazamientos químicos en sus respectivos espectros de RMN ¹H. Las principales diferencias en los desplazamientos químicos ($\Delta\delta^{RS}$) para los compuestos **49a** y **49b** están presentadas en la Tabla 2.6. Estos datos claramente permitieron establecer la configuración C-11R para el compuesto **49**. Por lo tanto, la configuración absoluta del centro quiral C-11 en el compuesto natural **3** fue determinada como R y de este modo se estableció su configuración absoluta como 1R,3R,4R,8S,11R,12R-6-cetocembra-15(17)-en-3,11-diol (8S-dihidroplexaurologona) (Figura 2.15).

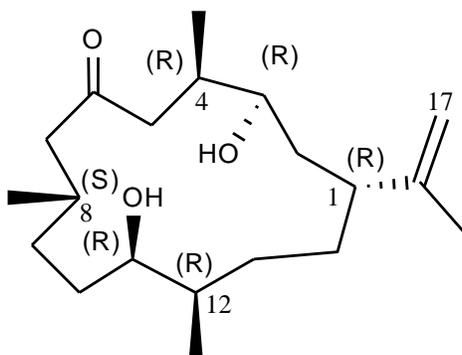


Figura 2.15. Estereoestructura del compuesto **3**

Aunque los desplazamientos químicos y las asignaciones de RMN del compuesto **3** son coincidentes con los publicados para la dihidroplexaurologona por Chan y colaboradores,²⁴ las estructuras reportadas en su figura y en su diagrama ORTEP son contradictorias con lo hallado en el presente trabajo en lo relacionado con la estereoquímica relativa en C-8 y C-11.

El compuesto **4**, tiene una fórmula molecular C₂₀H₃₆O₃ (tres grados de insaturación) asignada con base en el ión aducto en *m/z* 347.2563 [M+Na]⁺ observado en su espectro de masas de alta resolución en modo electrospray y en los datos del espectro de RMN ¹³C. Su espectro IR reveló la presencia de un grupo carbonilo (1689 cm⁻¹) y un grupo hidroxilo (3433 cm⁻¹). Los datos de RMN del compuesto **4** (Tabla 2.2 y 2.3) también presentaron características espectrales de un diterpeno tipo cembrano. *i.e.* 20 señales de carbonos, incluyendo tres grupos metilos (δ_H 0.98, d, *J* = 6.9, δ_C 21.1; δ_H 0.96, d, *J* = 6.6, δ_C 16.2; δ_H 0.94, d, *J* = 6.8, δ_C 13.6) y un grupo isopropenilo (δ_H 1.70 s, δ_C 21.3, CH₃; δ_H 4.70, br s, 4.64, br s, δ_C 109.3, CH₂; δ_C 149.9, qC). También, se pudieron observar las señales correspondientes a un grupo cetona (δ_C 211.8, qC) y a dos grupos hidroximetinos (δ_H 3.31, ddd, *J* = 9.0, 6.4, 2.7 Hz, δ_C 75.1, CH; δ_H 3.43, d, *J* = 10.9 Hz, δ_C 70.1, CH). En el experimento COSY, el acoplamiento a larga distancia entre H₃-16 y H₂-17 comprobó la presencia de un grupo isopropenilo y su posición fue establecida mediante las correlaciones observadas entre H₂-17 con C-1 y C-16, así como también entre H-1 con C-16 y C-17 en el experimento de gHMBC, permitiendo fijar su posición en C-1 (Figura 2.16). Fue posible también identificar un único sistema de espines, desde H₂-5 pasando a través de H-1 hasta H₂-7, el cual fue unido al carbono carbonílico localizado en C-6 mediante las correlaciones observadas en el experimento gHMBC (H₂-5 y H₂-7 con C-6) (Figura 2.16).

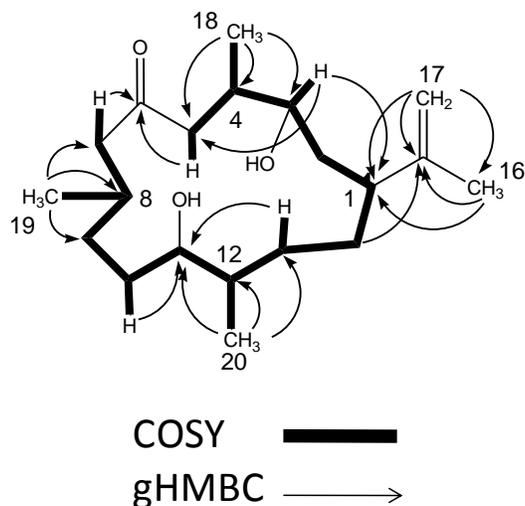


Figura 2.16. Correlaciones COSY y gHMBC para el compuesto **4**

La posición de los otros sustituyentes fueron fijadas mediante el análisis detallado de los datos obtenidos de los experimentos COSY, gHMBC y gHMBC, permitiendo asignar la estructura plana de este compuesto (Tablas 2.2 y 2.3, Figura 2.16), y estableciendo que este compuesto es un estereoisómero de **3**. La configuración relativa del cembrano **4** pudo ser establecida como $1R^*,3R^*,4R^*,8R^*,11R^*,12R^*$ a partir del análisis detallado del experimento NOESY, particularmente por el entrecruzamiento de picos entre H-11 con H-8; y H-3 con H-1/H₃-18. La configuración absoluta de **4** fue asignada aplicando el método modificado de Mosher. Así, el tratamiento de éste compuesto con los reactivos de derivatización,^{4,5} produjo el C-11(*R*)- (**4a**) y el C-11(*S*)- MPA (**4b**) éster de **4**. Los datos seleccionados de las diferencias en los desplazamientos químicos ($\Delta\delta^{RS}$) se encuentran resumidos en la Tabla 2.4, y éstos permitieron establecer la estereoestructura como $1R,3R,4R,8R,11R,12R$ -6-cetocembrano-15(17)-en-3,11-diol ($8R$ -dihidroxocembrano) para el compuesto **4** (Figura 2.17). Este compuesto es un epímero en el C-8 del compuesto **3** y es la primera vez que se reporta en la literatura química. Cabe resaltar, que el compuesto **4** en $CDCl_3$ no produjo el correspondiente hemiacetal cíclico como sí ocurrió con el compuesto **3**, indicando la importancia de la estereoquímica en el C-8 en la reacción de adición nucleofílica intramolecular propuesta.

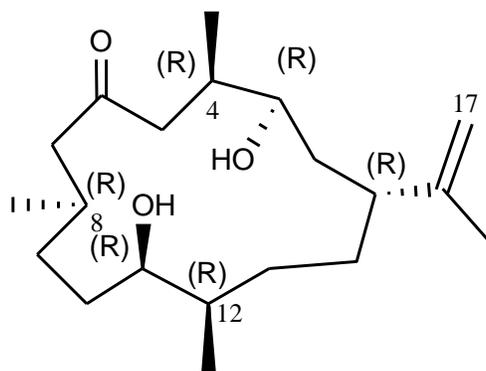
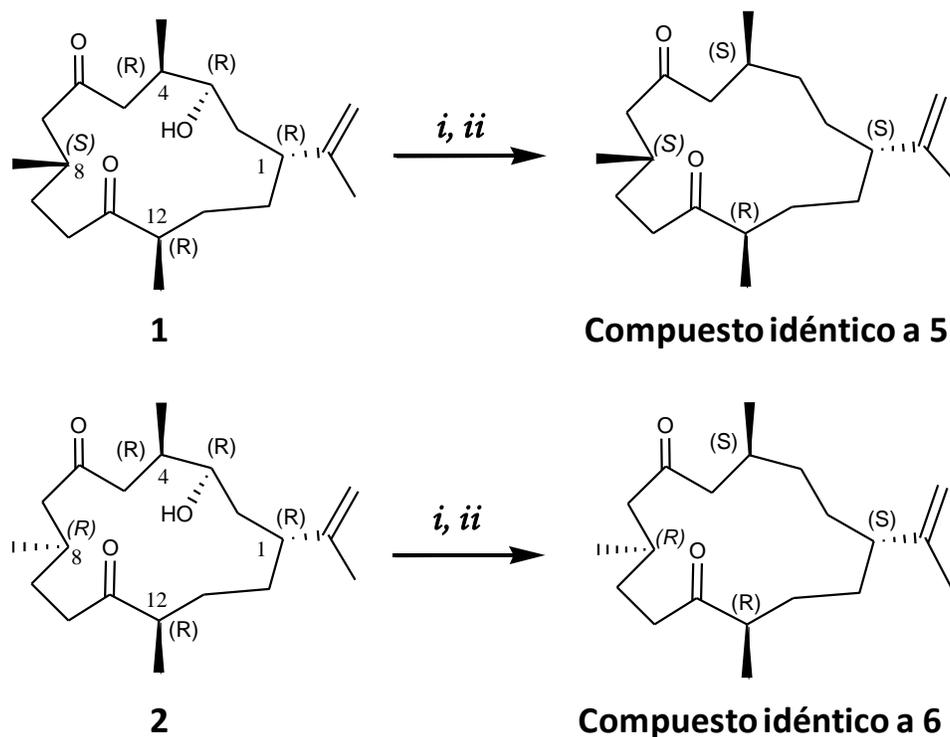


Figura 2.17. Estereoestructura del compuesto **4**

Los compuestos **5** y **6** poseen la misma fórmula molecular $C_{20}H_{34}O_2$ con cuatro grados de insaturación establecida con base en el ión aducto en m/z 329.2456 $[M+Na]^+$ para **5** y en m/z 329.2454 $[M+Na]^+$ para **6**. Sus respectivos espectros IR revelaron la presencia de grupos carbonilo (1705 cm^{-1}) y olefina (1651 cm^{-1}), pero no se observó ninguna banda asociada a función hidroxilo. Los datos de RMN del compuesto **5** presentaron características espectrales para un diterpeno tipo cembrano,^{20,21,23} i.e. 20 señales de carbonos,

La configuración absoluta del compuesto **5** fue establecida mediante la conversión química de **1** en un compuesto idéntico a **5**. De este modo, la derivatización del grupo hidroxilo localizado en el C-2 en el compuesto **1** con cloruro de mesilo seguido de la eliminación reductiva con LiAlH_4 en THF (Figura 2.20), produjo un compuesto semi-sintético el cual presentó datos espectroscópicos y propiedades quirópticas idénticas al compuesto natural **5**. Por lo tanto, se pudo asignar la estructura de **5** como 1*S*,4*S*,8*S*,12*R*-6,11-dicetocembra-15(17)-ene (8*S*-dehidroxiplexaurolona) (Figura 2.21).



i. MsCl/Pyr ; *ii.* $\text{LiAlH}_4/\text{THF}$

Figura 2.20. Conversión de los compuestos **1** y **2** en **5** y **6**, respectivamente

Siguiendo el mismo procedimiento descrito para el compuesto **5**, se procedió a realizar la transformación química del compuesto **2** (Figura 2.20) en un derivado semi-sintético el cual presentó datos espectroscópicos y propiedades quirópticas iguales a las presentadas por el compuesto natural **6**, lo que permitió establecer su estereoquímica absoluta como 1*S*,4*S*,8*R*,12*R*-6,11-dicetocembra-15(17)-ene (8*R*-dehidroxiplexaurolona) (Figura 2.21). Los datos de RMN del compuesto **5** son coincidentes con aquellos presentados por el cembranoide aislado del octocoral *Eunicea mammosa* por Rodríguez y colaboradores,²⁵ pero ninguna especificación estereoquímica fue establecida en la publicación, ni tampoco la asignación completa de los datos de RMN para la estructura tentativa reportada por Rodríguez. Por otra parte, el compuesto **6** es reportado en la literatura química por primera vez.

²⁵ Rodríguez, A. D.; Li, Y.; Dhasmana, H. 1993. New marine cembrane diterpenoids isolated from the caribbean gorgonian *Eunicea mammosa*. *J. Nat. Prod.* 56, 1101-1113.

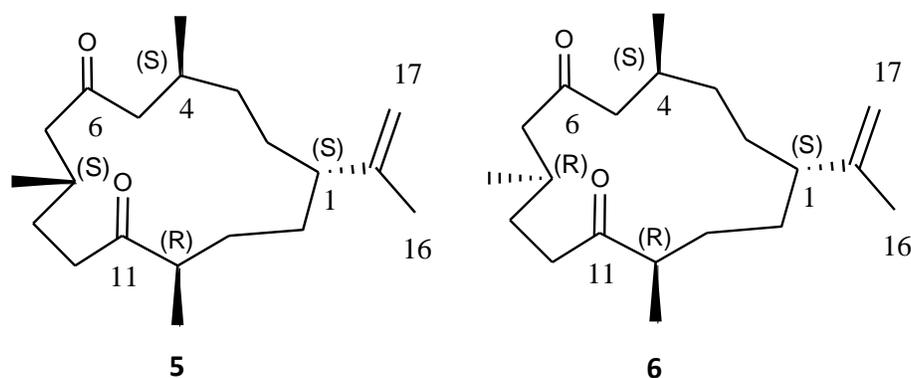


Figura 2.21. Estereoestructuras de los compuestos 5 y 6

Los compuestos **7** y **8** fueron aislados como agujas blancas y un polvo incoloro, respectivamente. Ambos compuestos presentaron la misma fórmula molecular $C_{20}H_{32}O_3$ (cinco grados de insaturación) con base en los iones aductos en m/z 343.2246 $[M+Na]^+$ para **7** y en m/z 343.2248 $[M+Na]^+$ para **8**. Sus espectros IR revelaron la presencia de grupos carbonilo (1705 cm^{-1}) y olefinicos (1643 cm^{-1}), pero no presentaron bandas correspondientes a grupos hidroxilo. Los datos de RMN del compuesto **7** (Tabla 2.2 y 2.3) fueron consistentes para un diterpeno con estructura tipo cembrano,^{20,21,23} así se pudieron apreciar tres señales para grupos metilo, un grupo isopropenilo y tres grupos carbonilo de cetonas (δ_C 215.6, qC; 214.4, qC; 210.4, qC). El análisis del espectro COSY permitió establecer tres sistemas de espines: El primero que comprende $H_2-5/ H-4/ H_3-18$, el segundo desde H_2-7 hasta H_2-10 incluyendo H_3-19 y el último desde $H-12$ hasta $H_2-14/H-1$ hasta H_2-2 incluyendo H_3-20 , los cuales fueron conectados con los grupos carbonilos C-6, C-11 y C-13. El análisis de las correlaciones claves en el experimento gHMBC: H_3-18 con C-3, H_2-7 y H_2-5 con C-6 y finalmente H_3-20 , H_2-13 y H_2-10 con C-11, condujeron a fijar estas posiciones y establecer la estructura plana de **7** (Figura 2.22).

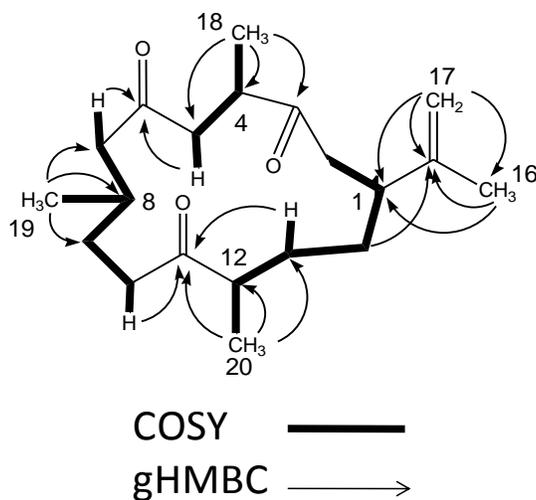


Figura 2.22. Correlaciones COSY y gHMBC para los compuestos 7 y 8

De una forma similar, el análisis de los experimentos bidimensionales (COSY, gHMBC, gHMQC) correspondientes al compuesto **8** mostraron que este compuesto es un estereoisómero del compuesto **7**. Los datos de RMN en dos dimensiones de estos dos compuestos permitieron relacionar todos los carbonos con sus respectivos protones y de este modo completar su asignación en RMN (Tablas 2.2 y 2.3).

Las principales diferencias entre los datos de los compuestos **7** y **8** fueron las señales asignadas a CH_2-7 (δ_H 2.08, m; 2.01, m, δ_C 49.5, en **7**; δ_H 2.53, m, 2.27, m, δ_C 50.9, en **8**), CH_2-10 (δ_H 2.94, m, 2.47, m, δ_C 36.7, en **7**; δ_H 2.41, m, 2.32, m, δ_C 38.3, en **8**) y CH_3-19 (δ_H 1.04, d, $J = 6.6\text{ Hz}$, δ_C 21.5, en **7**; δ_H 0.91, d, $J = 7.0\text{ Hz}$, δ_C 22.0,

en **8**), indicando que el compuesto **8** debe ser un estereoisómero de **7** (Figura 2.22). El análisis detallado de los experimentos NOESY de los compuestos **7** y **8** junto con la difracción de Rayos-X del cristal obtenido del compuesto **7** (Figura 2.23) permitieron determinar la configuración relativa de estos dos compuestos como $1R^*,4R^*,8S^*,12R^*$ -dehidroplexauroolona (**7**) y $1R^*,4R^*,8R^*,12R^*$ -dehidroplexauroolona (**8**), siendo este último un epímero en C-8 del compuesto **7**.

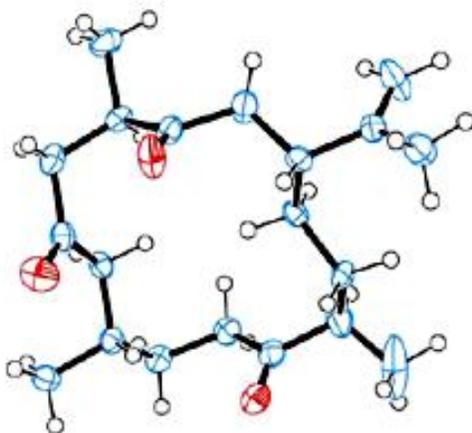


Figura 2.23. Diagrama ORTEP del compuesto **7**

La configuración absoluta de los compuestos **7** y **8** fue establecida a partir de sus datos espectroscópicos y sus propiedades quirópticas, ya que estas fueron idénticas a los productos obtenidos de la oxidación con PCC de los compuestos $8S$ -plexauroolona (**1**) y $8R$ -plexauroolona (**2**), respectivamente (Figura 2.24). Entonces, se pudo asignar la estereoestructura de **7** como $1R,4R,8S,12R$ -3,6,11-tricetocembra-15(17)-ene ($8S$ -dehidroplexauroolona) y como $1R,4R,8R,12R$ -3,6,11-tricetocembra-15(17)-ene ($8R$ -dehidroplexauroolona) (Figura 2.24) para el compuesto **8**.

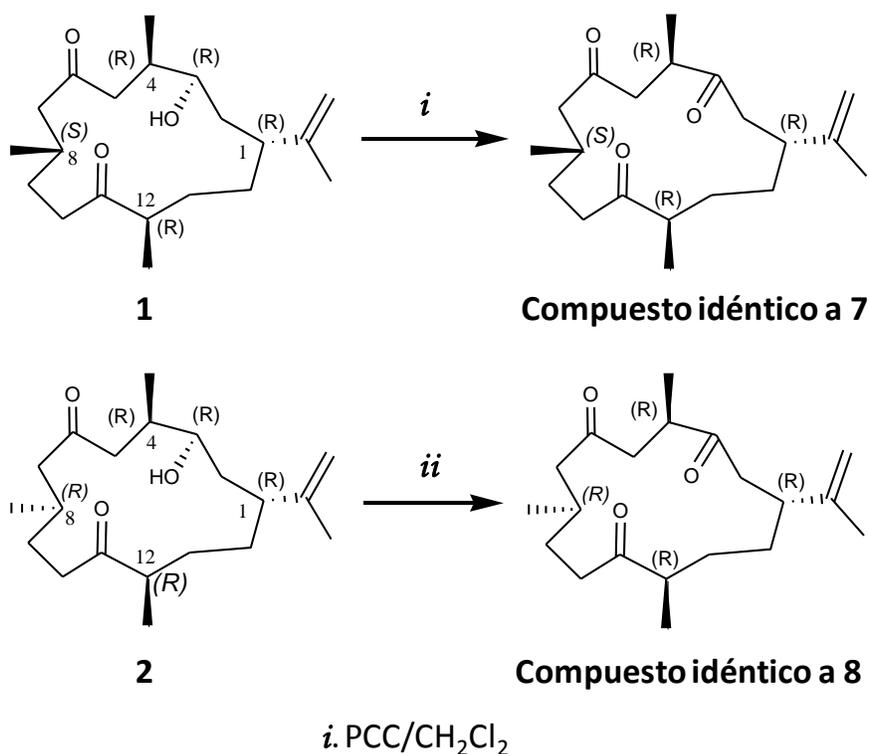


Figura 2.24. Conversión de los compuestos **1** y **2** en **7** y **8**, respectivamente

Los datos de RMN del compuesto **7** fueron coincidentes con los de la dehidroplexaurolona publicada por Chan y colaboradores,²⁴ pero su estereoquímica en C-8, así como sus datos de RMN de ¹³C fueron corregidos por nosotros. Por otra parte, los datos de RMN del compuesto **8** fueron coincidentes con los de una segunda dehidroplexaurolona publicada por los autores anteriormente mencionados,²⁴ pero sin configuración absoluta en las posiciones C-4 y C-12. A diferencia de ello, en este trabajo se pudo establecer inequívocamente la configuración absoluta de los centros asimétricos, así como también corregir la configuración absoluta en C-8, y la asignación de los datos de RMN ¹³C, los cuales estaban mal asignados.

En resumen, fueron aislados ocho compuestos (cuatro pares de epímeros) con una estructura tipo cembrano (**1-8**, Figura 2.25), entre estos compuestos, **2**, **4** y **6** son reportados aquí por primera vez en la literatura química. Adicionalmente, se hizo la revisión de la estereoquímica relativa y absoluta, así como la completa asignación de los datos de RMN ¹H y ¹³C para los compuestos **1**, **3**, **5**, **7** y **8**. Además, estos compuestos fueron evaluados en ensayos *antifouling* como se describe más adelante en el numeral 2.10.4. y 2.10.5.

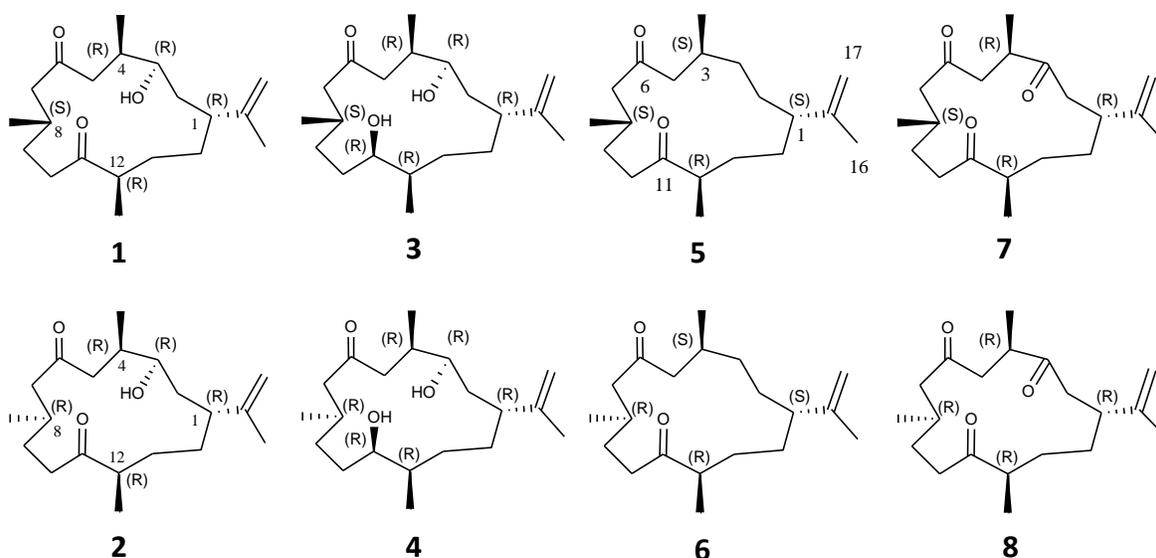


Figura 2.25. Estructuras de los compuestos **1-8** aislados de *P. flagellosa*

2.10.2. Compuestos aislados del octocoral *E. knighti*²

El octocoral *Eunicea knighti*, el cual posee su superficie libre de *macrofouling*, fue colectado en la Bahía de Santa Marta, en el Caribe Colombiano. El octocoral fue cortado en trozos pequeños y posteriormente extraído exhaustivamente con CH₂Cl₂-MeOH (50:50 v/v), el solvente fue eliminado y el extracto obtenido fue sometido a una partición L-L usando CH₂Cl₂-MeOH (50:50 v/v), las fase fueron separadas y las fracciones orgánicas agrupadas y concentradas hasta obtener un extracto verde aceitoso, el cual fue denominado extracto crudo. El extracto crudo activo en el ensayo de inhibición de QS, fue sometido sucesivas cromatografías en columna sobre sílica gel y finalmente a CLAE-fase reversa logrando obtener los compuestos puros **9-16**.²

El compuesto **9** fue aislado como un aceite incoloro, su fórmula molecular asignada como C₂₀H₃₂O (cinco grados de insaturación) con base en su ion aducto en *m/z* 311.2321 [M+Na]⁺ obtenido del espectro de masas de alta resolución en modo electrospray y en el espectro de RMN ¹³C. Su espectro IR reveló la presencia de bandas intensas debidas a la presencia de grupos epóxido (1228 cm⁻¹) y olefinas (1643 cm⁻¹ y 879 cm⁻¹). El espectro de RMN ¹³C del compuesto **9** (Tabla 2.5) muestra la presencia de 20 señales de átomos

de carbono, las cuales fueron asignadas de acuerdo a su desplazamiento y al experimento DEPT a cuatro metilos, ocho metilenos, cuatro metinos y cuatro carbonos cuaternarios. Sus desplazamientos químicos indicaron la presencia de un grupo epóxido δ 62.3, CH, (C-7) y δ 60.4, qC, (C-8); dos olefinas trisustituidas δ 134.9, qC, (C-4) y δ 124.4, CH, (C-3); δ 135.4, qC, (C-12) y δ 122.3, CH, (C-11); y finalmente, grupo isopropenilo δ 149.1, qC, (C-15); δ 110.1, CH₂, (C-17) y δ 19.7, CH₃, (C-16), sugiriendo un diterpeno con estructura tipo cembrano.²⁰⁻²² Los datos de RMN ¹H (Tabla 2.5) mostraron la presencia de cuatro grupos metilos singletes (δ 1.70; δ 1.68; δ 1.56; and δ 1.29), los primeros tres fueron asignados como sustituyentes de olefinas y el último como sustituyente de un epóxido (asignado con base en la correlación observada en el experimento gHMBC con la señal del carbono en δ 60.4).

Además, el espectro de RMN ¹H reveló la presencia de dos protones olefínicos en δ 5.25 (br t, J = 7.6 Hz) y δ 5.13 (br t, J = 8.0 Hz) correspondientes a dos dobles enlaces trisustituidos; una señal de un protón en δ 2.82 (m), la cual correlaciona con el carbono en δ 62.3 (qC) en el experimento gHMBC que permite confirmar la presencia del grupo epóxido trisustituido; finalmente dos singletes anchos correspondientes a los protones del grupo metileno del grupo isopropenilo los cuales tienen un desplazamiento químico en δ 4.74 y en δ 4.69. Los datos anteriores cuentan para cuatro de los cinco grados de insaturación establecidos, por lo cual la última insaturación es atribuida a la estructura cíclica de un cembrano.^{20,21}

En el experimento COSY, el acoplamiento a larga distancia entre H₃-16 y H₂-17 corrobora la presencia del grupo isopropenilo, y la correlación observada en el experimento gHMBC, particularmente la de H₂-17 con C-1 y C-16, así como también la de H-1 con C-16 y C-17, permitieron fijar la posición del grupo isopropenilo en C-1. También fue evidente la presencia de tres sistemas de espines, el más largo desde H-3 pasando a través de H-1 hasta H-13; el segundo desde H₂-5 hasta H-7 y el último desde H₂-9 hasta H-11 (Figura 2.26). Los tres sistemas de espines anteriormente mencionados pudieron ser conectados con base en las siguientes correlaciones observadas en el experimento gHMBC: H-3, H₃-16 y H₂-17 con C-1; H₃-18 con C-3, C-4 y C-5; H₃-19 con C-7, C-8 y C-9; H₃-20 con C-11, C-12 y C-13; y finalmente H-11 con C-13. Por lo tanto y con base en lo anteriormente descrito, la estructura plana de **9** fue establecida (Figura 2.26).

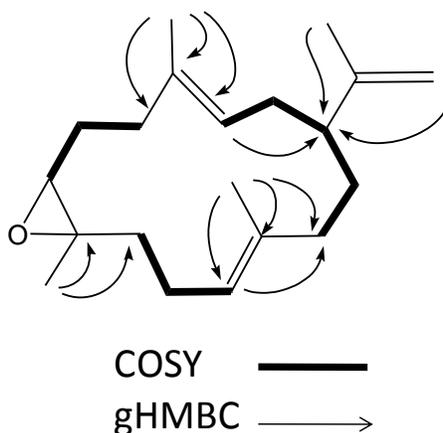


Figura 2.26. Correlaciones COSY y gHMBC para el compuesto **9**

Tabla 2.5. RMN ^1H (400 MHz en CDCl_3) y ^{13}C (100 MHz en CDCl_3) para los compuestos **9-11**

Compuestos	9		10		11	
Posición ^a	δ_{C} , mult. ^b	δ_{H} , (J in Hz)	δ_{C} , mult. ^b	δ_{H} , (J in Hz)	δ_{C} , mult. ^b	δ_{H} , (J in Hz)
1	46.0, CH	2.05, m	45.4, CH	2.04, m	45.9, CH	1.92, m
2a	32.2, CH ₂	2.05, m	32.8, CH ₂	2.69, m	31.4, CH ₂	2.31, m
2b				2.23, m		
3	124.4, CH	5.25, t (7.6)	155.7, CH	6.55, dd (11.5, 3.8)	131.2, CH	5.52, dd (10.4, 3.2)
4	134.9, C	----	141.1, C	----	131.8, C	----
5a	36.2, CH ₂	2.25, m	21.5, CH ₂	2.55, m	24.6, CH ₂	2.56, m
5b				2.41, m		
6a	26.7, CH ₂	1.79, m	25.2, CH ₂	1.91, m	24.2, CH ₂	1.67, m
6b				1.75, m		
7	62.3, CH	2.82, m	61.7, CH	2.46, m	62.0, CH	2.55, t (6.1)
8	60.4, C	----	61.9, C	----	62.3, C	----
9a	38.4, CH ₂	2.04, m	32.6, CH ₂	1.62, m	33.1, CH ₂	1.69, m
9b				1.28, m		
10a	22.7, CH ₂	2.20, m	24.6, CH ₂	1.85, m	25.9, CH ₂	1.87, m
10b				1.97, m		
11	122.3, CH	5.13, t (8.0)	84.9, CH	4.64, br t (8.0)	86.1, CH	4.47, br t (5.6)
12	135.4, C	----	144.6, C	----	145.3, C	----
13a	35.2, CH ₂	1.83, m	31.6, CH ₂	2.25, m	30.8, CH ₂	1.99, m
13b				1.76, m		
14a	28.6, CH ₂	1.47, m	30.5, CH ₂	1.63, m	30.5, CH ₂	1.46, m
14b						
15	149.1, C	----	145.3, C	----	146.4, C	----
16	19.7, CH ₃	1.70, s	18.2, CH ₃	1.73, s	18.6, CH ₃	1.67, s
17a	110.1, CH ₂	4.74, br s	113.4, CH ₂	4.92, br s	111.8, CH ₂	4.81, br s
17b				4.69, br s		
18a	17.4, CH ₃	1.68, s	195.4, CH	9.38, br s	67.4, CH ₂	4.58, d (12.3)
18b						
19	16.4, CH ₃	1.29, s	17.2, CH ₃	1.25, s	17.0, CH ₃	1.27, s
20a	17.2, CH ₃	1.56, s	115.5, CH ₂	5.07, br s	115.4, CH ₂	5.03, br s
20b						5.06, br s
21	----	----	----	----	171.1, C	----
22	----	----	----	----	20.8, CH ₃	2.05, s

^aLa asignación inequívoca de las señales fue realizada mediante los experimentos DEPT, gHMQC y gHMBC

^bLa multiplicidad fue deducida del experimento DEPT

Los desplazamientos químicos en δ 17.4 y en δ 36.2 para C-18 y C-5, respectivamente, basados en el efecto de compresión estérica^{26,27} (para la configuración Z: δ 25.3 C-18 y δ 26.5 C-5; para la configuración E: δ 17.3 C-18 y δ 38.7 C-5)^{7,22,28,29} y en la correlación NOE observada en el experimento NOESY entre las señales δ 5.25, asignada a H-3 y la señal en δ 2.25, adscrita a H₂-5 y la ausencia del entrecruzamiento de picos entre H₃-18 y H-3, claramente estuvieron a favor de una configuración E para el doble enlace trisustituido localizado en C-3,4. De una manera similar, las señales en δ 17.2 para C-20, y en δ 35.2 para C-13, sugirieron una configuración E para el doble enlace trisustituido localizado en C-11,12. En adición, la configuración relativa S*, R*, R* para C-1, C-7 y C-8, respectivamente, fue determinada con base en las correlaciones NOE observadas en el experimento NOESY como sigue: el entrecruzamiento de picos entre H₃-19 y H₂-6 y entre H-7 y H₂-9 permitió establecer una relación *trans* entre H₃-19 y H-7 (Figura 2.27), indicando una configuración R* para C-7 y C-8.

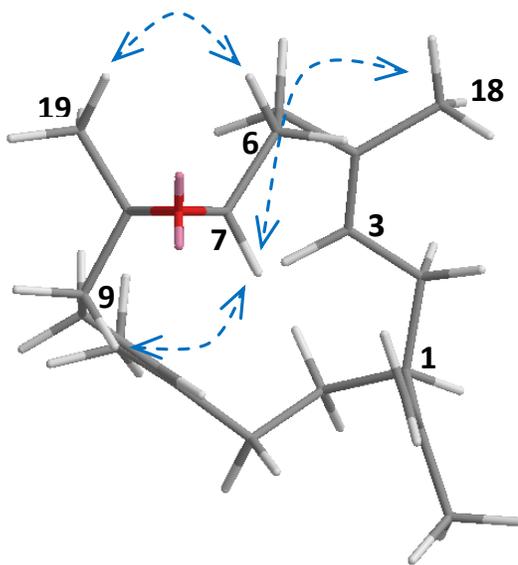


Figura 2.27. Correlaciones clave NOE para el compuesto **9**

La configuración de C-1 habría podido ser asignada por la correlación NOE entre los protones H-3 y H-1 (Figura 2.27), pero los desplazamientos químicos de los protones H₂-2 fueron coincidentes con los de H-1 (δ 2.05), por lo tanto el experimento NOE en este caso no fue concluyente en este aspecto. Sin embargo, como en estudios previos⁷ de algunos cembranos relacionados y aislados del mismo organismo, nosotros pudimos establecer sin ambigüedad la configuración de C-1 como S y con base en el razonamiento biosintético se asignó la misma configuración a este carbono en el compuesto **9**. Para establecer la estereoquímica absoluta del compuesto **9**, se realizó la apertura del anillo epóxido en medio ácido (CDCl₃-I₂-HCl) durante 24 h (Figura 2.28). Este tipo de reacciones procede con retención de la configuración de C-7 para producir un grupo hidroxilo en C-7 y el respectivo sustituyente halogenado (Cl) en C-8 como fue reportado previamente, en Tello, *et al.* 2009.^{7,30} La reacción fue detenida, el solvente evaporado y la mezcla de reacción obtenida fue

²⁶ Eliel, E.; Wilen, S.H. Stereochemistry of alkenes. En stereochemistry of organic compounds, Eliel, E. and Wilen, S.H. Eds. John Wiley and Sons. Inc. Singapore, 2005, pp 571-572.

²⁷ Crews, P.; Rodríguez, J.; Jaspars, M. Interpretation and use of proton and carbon chemical shifts. En organic structure analysis, Crews, P.; Rodríguez, J.; Jaspars, M. Eds. Oxford university press. California, 1998, pp 78-79.

²⁸ Shi-Yie, C.; Zhi-Hong, W.; Shang-Kwei, W.; Shu-Fen, C.; Chi-Hsin, H.; Chang-Feng, D.; Chiang, M. Y.; Chang-Yih, D. **2009**. Unprecedented hemiketal cembranolides with anti-inflammatory activity from the Soft Coral *Lobophytum durum*. *J. Nat. Prod.* **72**, 152–155.

²⁹ Kato, T.; Suzuki, M.; Kobayashi, T. **1980**. Synthesis and Pheromone Activities of Optically Active Neocembrene and Their Geometrical Isomers, (E,Z,E)- and (E,E,Z)-Neocembrene. *J. Org. Chem.* **45**, 1126–1130.

³⁰ Nosotros probamos en estudios previos que la configuración de C-7 en los compuestos tipo cembrano no cambia cuando ellos son tratados con ácidos para promover la apertura del anillo epóxido. Esta transformación ocurre de manera regioselectiva introduciendo

sometida a cromatografía en columna sobre sílica gel y CLAE en fase reversa para producir el compuesto mayoritario **51** (41.0 %) (Figura 2.28). Posteriormente, **51** fue sometido a un proceso de esterificación en el grupo hidroxilo localizado en C-7, con los agentes derivatizantes (*R*)- y (*S*)-MPA lográndose obtener los correspondientes diastereoisómeros **51a** y **51b**, respectivamente.³⁻⁵ Los espectros de RMN ¹H de los ésteres fueron registrados y las diferencias en sus desplazamientos químicos analizadas, los datos seleccionados de $\Delta\delta^{RS}$ para los compuestos **51a** y **51b** se encuentran resumidos en la Tabla 2.6.

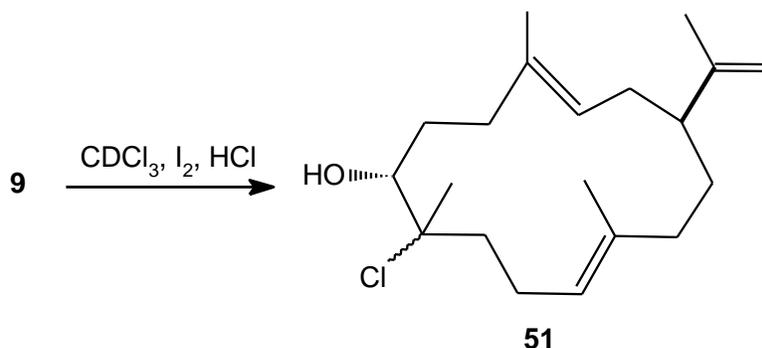


Figura 2.28. Interconversión química del compuesto **9** en **51**

Estos datos claramente permitieron establecer la configuración *7R* en el compuesto **51**, lo cual implica la misma configuración del centro asimétrico C-7 en el compuesto **9**. Entonces, la estructura final y la configuración absoluta de **9** fue determinada como (1*S*,7*R*,8*R*,3*E*,11*E*)-7,8-epoxicembra-3,11,15(17)-trieno (Figura 2.29). El nombre trivial de knightina fue asignado a este compuesto, el cual es reportado por primera vez en la literatura química, cabe resaltar que este compuesto es un 7,8-epóxido enantiómero del reportado cembreno A.²⁹

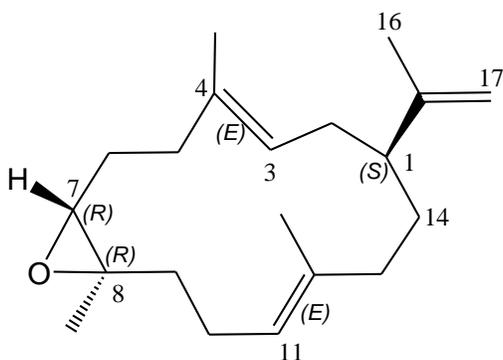


Figura 2.29. Estereoestructura del compuesto **9**

un anión cloruro en C-8 y produciendo un grupo hidroxilo en C-7. La presumible configuración C-8*R** no pudo ser establecida debido a la poca cantidad obtenida de este compuesto, sin embargo esta asignación no es necesaria para los propósitos de este trabajo.

Tabla 2.6. Datos espectroscópicos seleccionados de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) para los ésteres MPA en C-11 para **51a,b** y **51a,b** y en C-7 **51a,b** y sus respectivos valores de $\Delta\delta^{\text{RS}} = \delta^{\text{R}} - \delta^{\text{S}}$

No.	9a	9b	$\Delta\delta^{\text{RS}} (\delta^{\text{R}} - \delta^{\text{S}})$	11a	11b	$\Delta\delta^{\text{RS}} (\delta^{\text{R}} - \delta^{\text{S}})$	51a	51b	$\Delta\delta^{\text{RS}} (\delta^{\text{R}} - \delta^{\text{S}})$
H-16	1.72, s	1.76, s	-0.040	1.65, s	1.67, s	-0.020	1.70, s	1.70, s	0.000
H-17a	4.90, brs	4.92, brs	-0.020	4.84, brs	4.92, brs	-0.080	4.74, brs	4.74, brs	0.000
H-17b	4.75, brs	4.80, brs	-0.050	4.67, brs	4.70, brs	-0.030	4.68, brs	4.68, brs	0.000
H-20a	4.71, brs	5.11, brs	-0.400	4.86, brs	5.09, brs	-0.230	1.58, s	1.58, s	0.000
H-20b	4.71, brs	5.11, brs	-0.400	4.83, brs	5.07, brs	-0.240			
H-3	6.55, dd, J =11.3, 3.6 Hz	6.55, dd, J =11.3, 3.6 Hz	0.000	5.54, dd, J =10.3, 3.2 Hz	5.54, dd, J =10.3, 3.2 Hz	0.000	5.40, t, J =7.5 Hz	5.26, t, J =7.6 Hz	+0.140
H-6a	1.91, m	1.91, m	0.000	1.67, m	1.67, m	0.000	2.00, m	1.84, m	+0.160
H-6b	1.58, m	1.58, m	0.000				2.01, m	1.77, m	+0.240
H-7	2.58, t, J =6.0 Hz	2.49, m	+0.090	2.58, t, m	2.52, t, J =6.4 Hz	+0.060	5.09, dd, J =9.2, 3.3 Hz	5.09, dd, J =9.4, 3.0 Hz	0.000
H-9a	1.65, m	1.58, m	+0.070	1.69, m	1.68, m	+0.010	2.09, m	2.16, m	-0.050
H-9b	1.55, m	1.44, m	+0.110	1.44, m	1.30, m	+0.140	1.22, m	1.28, m	-0.060
H-10	1.99, m	1.81, m	+0.180	1.97, m	1.86, m	+0.110	1.59, m	1.61, m	-0.020
H-18a	9.66, brs	9.66, brs	0.000	4.56, d, J =12.3 Hz	4.56, d, J =12.2 Hz	0.000	1.64, s	1.50, s	+0.140
H-18b				4.40, d, J =12.3 Hz	4.40, d, J =12.3 Hz	0.000			
H-19	1.42, s	1.27, s	+0.150	1.66, s	1.49, s	+0.170	1.02, s	1.31, s	-0.290

El compuesto **10** fue aislado como un aceite incoloro con una fórmula molecular de $C_{20}H_{30}O_3$ asignada con base en el ion aducto en m/z 341.2075 $[M+Na]^+$ obtenido de su espectro de masas de alta resolución en modo electrospray, la cual mostró completa concordancia con lo deducido de los datos espectroscópicos de RMN ^{13}C . Además, se le determinó un índice de deficiencia de hidrógenos de seis. La absorción UV en 222 nm con un coeficiente de extinción de 3.26, indicó la presencia de un grupo carbonilo α - β insaturado en el compuesto **10**. El espectro IR presentó bandas de absorción diagnóstico de grupo carbonilo en 1715 cm^{-1} , de epóxido en 1205 cm^{-1} , bandas olefínicas en 3036 cm^{-1} y de grupo hidroxilo en 3455 cm^{-1} . Las características espectrales de RMN de **10** fueron similares a las de **9** (Tabla 2.5) indicando un diterpeno tipo cembrano con una función epóxido en C-7,8. Las principales diferencias de **10**, fueron la presencia de solamente dos grupos metilos (δ_H 1.25, s/δ_C 17.2, C-19; δ_H 1.73, s/δ_C 18.2, C-16), un grupo hidroxilo metino (δ_H 4.64, br t, $J = 8.0\text{ Hz}/\delta_C$ 84.9, C-11), un grupo aldehído α - β insaturado (δ_H 9.38, br s/δ_C 195.4, C-18), y un grupo exometileno (δ_H 5.07, br s, 5.06, br s/δ_C 115.5, C-20; δ_C 144.6, C-12). Los desplazamientos químicos en δ 195.4 y en δ 21.5 para C-18 y C-5, respectivamente, son característicos de dobles enlaces trisustituídos con una configuración *E*, en este caso localizado en C-3,4.⁷ Por lo tanto, con base en los resultados anteriores y mediante el uso de los experimentos COSY y gHMBC se pudo establecer la estructura de **10** como se describe en la Figura 2.30.

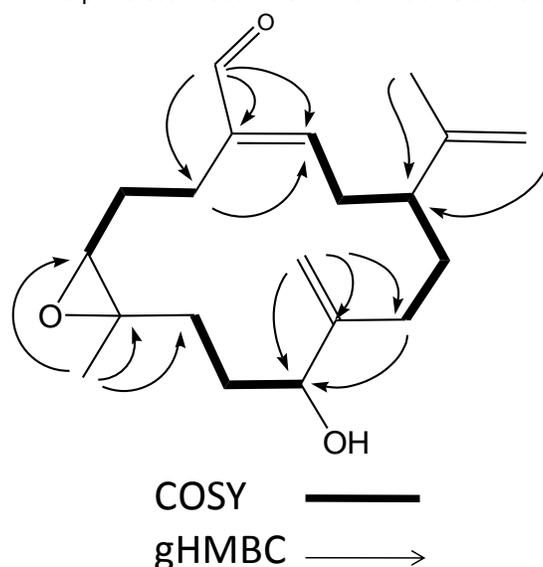


Figura 2.30. Correlaciones COSY y gHMBC para el compuesto **10**

La estereoquímica relativa de este compuesto fue establecida como $1S^*$, $7R^*$, $8R^*$, $11R^*$ a partir del análisis detallado de su experimento NOESY. Las correlaciones NOE entre H_3 -19/ H_2 -6 y H -7/ H_2 -9 fueron consistentes con una relación *trans* entre H_3 -19 y H -7 e indicando una configuración $7R^*$ y $8R^*$. La configuración relativa de C-1 fue asignada, con base en las correlaciones observadas en el espectro NOESY, el cual permitió establecer que los protones H -3 y H -1 estaban distribuidos de una forma cofacial. Como previamente se había establecido una configuración *E* para el doble enlace localizado en C-3,4, y debido al entrecruzamiento de picos observado entre H -18 y H -7 se pudo establecer una configuración 5^* para C-1. Finalmente, el entrecruzamiento de picos observado en el experimento NOESY entre H -7 y H -11 indicaron una relación *syn* permitiendo finalmente establecer la configuración relativa para C-11 como R^* .

La configuración absoluta en C-11 del compuesto **10** fue establecida como *R* usando la metodología modificada de Mosher, con (*R*)- y (*S*)-MPA como reactivos derivatizantes del grupo hidroxilo presente en C-11.³⁻⁵ Los datos seleccionados de las diferencias en los desplazamientos químicos ($\Delta\delta^{RS}$) de los ésteres de **10** en C-11 en **10a** (*R*-MPA) y **10b** (*S*-MPA) se encuentran presentados en la Tabla 2.6. El análisis de todos los datos permitió establecer la estructura del compuesto **10** como (1*S*,7*R*,8*R*,11*R*,3*E*)-7,8-epoxicembra-11-hidroxi-3,12(20),15(17)-trien-18-al y el nombre trivial de 11(*R*)-hidroxi-12(20)-en-knightal fue asignado para este compuesto (Figura 2.31). Es importante mencionar que el compuesto **10** tiene un inusual rearrreglo

funcional (un hidroxil-exometileno alílico) para los compuestos tipo cebrano hasta ahora encontrados en la naturaleza.

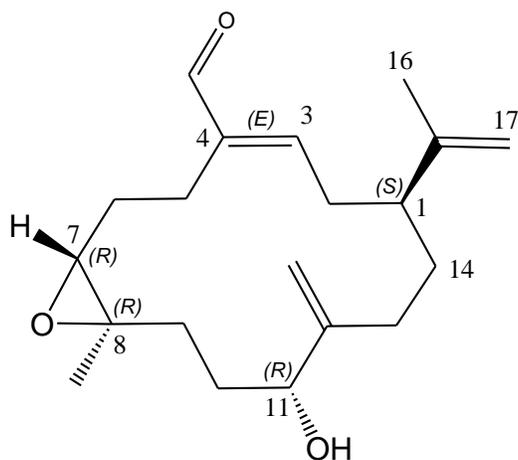


Figura 2.31. Estereoestructura del compuesto **10**

El compuesto **11** fue aislado como un aceite incoloro con una fórmula molecular $C_{22}H_{34}O_4$ (deficiencia de hidrógenos: 7), asignada de su ion aducto en $385.2342 [M+Na]^+$ en el espectro de masas de alta resolución en modo electrospray y de su espectro de RMN ^{13}C . Al comparar los espectros IR de los compuestos **10** y **11** se pudo establecer una banda adicional correspondiente a un grupo carboxilo (1742 cm^{-1}) en el compuesto **10**. Las características espectrales de RMN del compuesto **11** fueron muy similares a las del compuesto **10** (Tabla 2.5), adicionalmente, el análisis de los experimentos COSY y gHMBC permitieron establecer que este compuesto tiene una estructura similar al compuesto **10** (Figura 2.32). Las principales diferencias entre estos dos compuestos fueron las señales adscritas a C-3, C-4 y C-18, las cuales en el compuesto **11** tienen un desplazamiento químico en δ_C 131.2, 131.8, y 67.4, respectivamente, mientras que para el compuesto **10**, las señales correspondientes a estos mismos carbonos aparecen desplazadas a campo bajo en δ_C 155.7, 141.1, y 195.4. Estas señales permitieron concluir la presencia en **11** de un grupo hidroximetilo acetilado (δ_H 4.58, d, $J = 12.3\text{ Hz}$, δ_H 4.41, d, $J = 12.3\text{ Hz}$, δ_C 67.4, CH_2 ; δ_C 171.1 C; δ_H 2.05, s/ δ_C 20.8, CH_3) en lugar del grupo aldehído presente en el compuesto **10**.

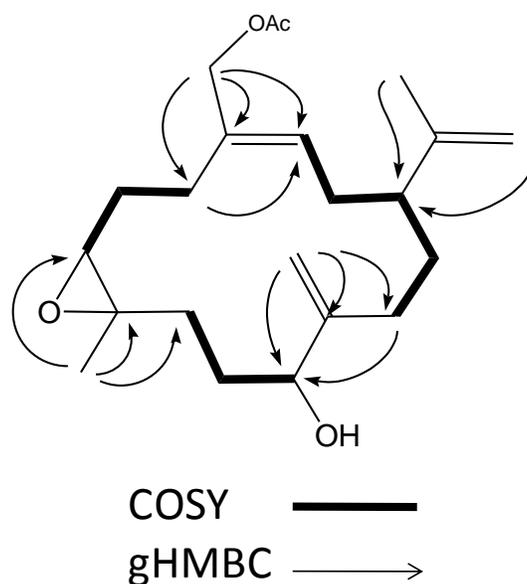


Figura 2.32. Correlaciones COSY y gHMBC para el compuesto **11**

Algunas correlaciones claves observadas en el experimento NOESY permitieron asignar la configuración relativa de **11** como $1S^*$, $7R^*$, $8R^*$, $11R^*$ usando el mismo razonamiento descrito para **10**. Finalmente, empleando el método modificado de Mosher para obtener los respectivos ésteres **11a** y **11b** usando (*R*)- y (*S*)-MPA como reactivos derivatizantes,³⁻⁵ se pudo establecer la configuración absoluta en C-11 para el compuesto **11** como *R* de acuerdo a los datos de las diferencias de $\Delta\delta^{RS}$ que se encuentran reportados en la tabla 2.6. Entonces, la estructura de **11** fue establecida como (1*S*,7*R*,8*R*,11*R*,3*E*)-18-acetoxi-7,8-epoxicembra-3,12(20),15(17)-trien-11-ol y fue nombrado como acetato de 11(*R*)-hidroxi-12(20)-en knightol (Figura 2.33).

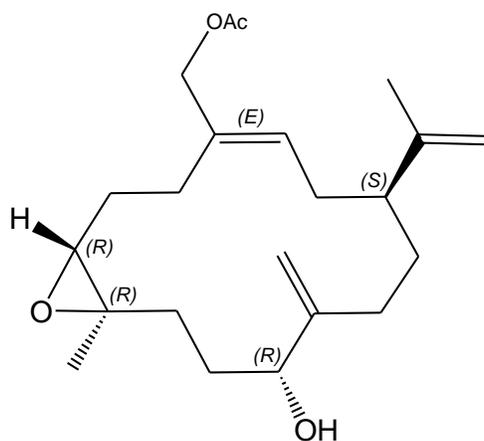


Figura 2.33. Estereoestructura del compuesto **11**

Los compuestos mayoritarios también tipo cembrano (**12-16**, Figura 2.34) aislados de este mismo octocoral fueron identificados de la misma manera como se reportó en Tello, *et al.* 2009.⁷ Las estereoestructuras de los compuestos minoritarios **9-11** son consistentes con las exhibidas por los compuestos mayoritarios **12-16**, como era de esperarse. Sin embargo, la orientación espacial del doble enlace trisustituido en C-3,4 en el compuesto **9** es diferente a las exhibidas por los cembranos co-aislados, también los compuestos **10** y **11** presentan un patrón inusual de oxidación para el núcleo tipo cembrano en las posiciones C-11 y C-12.

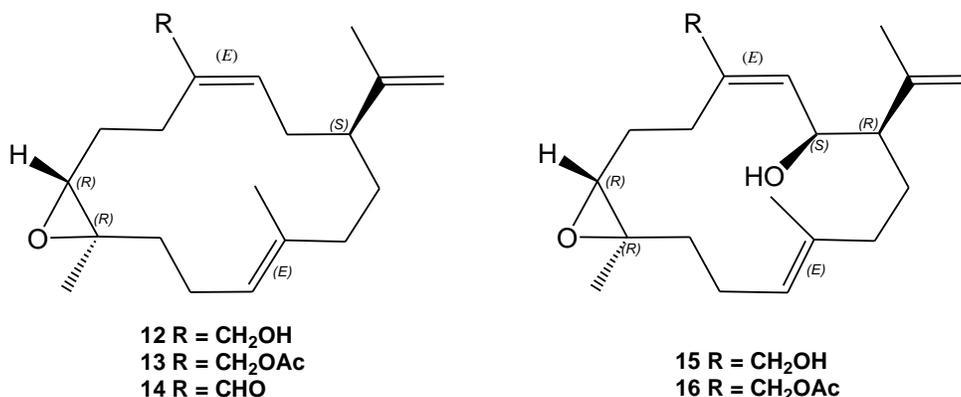


Figura 2.34. Estereoestructuras de los compuestos **12-16**

2.10.3. Evaluación de la actividad *antifouling* de los compuestos aislados de los octocorales *P. flagellosa*¹ Y *E. knighti*²

Las propiedades *antifouling* de los compuestos naturales (**1-16**) se evaluaron usando los bioensayos de inhibición de *quorum sensing* e inhibición de la biopelícula bacteriana. El QS bacteriano está implicado en la

regulación de eventos patológicos relevantes como el desarrollo del biofilm, virulencia bacteriana y la resistencia a medicamentos.^{2,10-12} Los inhibidores de *quorum sensing* bacteriano, también pueden ser útiles como terapéuticos y como controladores del *fouling*.

2.10.4. Actividad Inhibitoria de Quorum Sensing en los compuestos 1-16¹

Para la actividad IQS, se empleó el biosensor *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532. Los resultados (Tabla 2.7) mostraron que los compuestos **3**, **6**, **10** y **14** (a 7.5 µg/disk) tienen un efecto inhibitorio significativo en la producción del pigmento violeta (el cual es regulado por los sistemas de QS) en *C. violaceum* sin interferir con su crecimiento, así mismo, los compuestos **7** (30.0 µg/disco) y **11** (15.0 µg/disk) mostraron una actividad moderada. Es importante mencionar, que los compuestos **12** y **14** (100 µg/disco) mostraron una actividad IQS en un estudio previo realizado por nosotros utilizando *Escherichia coli* como biosensor;⁷ sin embargo, tan solo el compuesto **14** mostró esta actividad cuando se empleó el biosensor *C. violaceum*. Los compuestos restantes no presentaron actividad IQS utilizando *C. violaceum* como biosensor, inclusive a la más alta cantidad ensayada 30.0 µg/disco. Como controles positivos se usaron el ácido kójico y el conocido agente *antifouling* comercial Cu₂O (controles positivos usados en este ensayo, cuya mínima concentración de inhibición fue de 90.0 y 40.0 µg/disco, respectivamente) a las concentraciones que mejor expresaron la inhibición de QS. En general, los resultados mostraron que los compuestos naturales **3**, **6**, **7**, **10**, **11** y **14** son mejores inhibidores de QS que los controles positivos usados en este ensayo y como además el crecimiento bacteriano no fue inhibido por estos compuestos, se puede asumir que la inhibición de la producción del pigmento violaceina (expresión del fenotipo) es causado por la interrupción del sistema de comunicación bacteriano (QS). De este modo se evita un efecto bactericida, lo cual representa un resultado importante, ya que no hay una presión selectiva en las bacterias a desarrollar resistencia a este tipo de compuestos.

Al comparar los resultados obtenidos de IQS de los cembranos más activos con los datos reportados en la literatura para diferentes tipos de compuestos, se pudo establecer que los cembranos presentan mejores propiedades inhibitorias de QS en la cepa biosensora *C. violaceum*, así como en otros biosensores; tal es el caso del estudio desarrollado por Schmitt-Kopplin y colaboradores en el 2013,³¹ en el cual realizaron un screening de macro-algas marinas como inhibidoras de QS en *C. violaceum*, utilizando como control positivo cinamaldehído a 50 µg/disco, cantidad óptima a la cual se presentaba la máxima inhibición de QS en esta cepa biosensora. Otros ejemplos pero en ensayos de microdilución, lo representan los compuestos 10-metilundecan-5-olido el cual interfirió en los sistemas de QS en *E. coli* a una concentración de 312 µg/mL,³² los depsipéptidos solonamidas A y B, las cuales inhibieron el QS en *Staphylococcus aureus* a una concentración de 5000 µg/mL,³³ y finalmente el ácido lyngbyoico el cual fue establecido como un disruptor de los sistemas de QS a 212 µg/mL en la bacteria Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa*.³⁴ Hasta nuestro conocimiento, no hay reportes de otros compuestos con núcleo cembrano como inhibidores de QS con los cuales hacer una comparación directa a nivel de estructura.

Otra consideración que se debe tener en cuenta, es una posible relación estructura-actividad de los compuestos en este bioensayo, ya que si bien todas los compuestos naturales aislados son tipo cembrano, no todos presentaron dicha actividad, por lo cual es importante resaltar que aspectos estructurales (grupos funcionales, posible conformación, átomos electronegativos, resonancia, etc...) podrían estar directamente relacionados con la IQS. Por ejemplo, respecto a los compuestos activos se puede decir que **3**, **6**, **7**, **10** y **11** presentan un átomo electronegativo en C-11, en este caso los grupos funcionales hidroxilo y cetona;

³¹ Jha, B.; Kavita, k.; Westphal, J.; Hartmann, A.; Schmitt-Kopplin, P. **2013**. Quorum sensing inhibition by *Asparagopsis taxiformis*, a marine macro alga: separation of the compound that interrupts bacterial communication *Mar. Drugs* **11**, 253-265.

³² Schulz S.; Dickschat, J. S.; Kunze, B.; Wagner-Dobler, I.; Diestel, R.; Sasse, F. **2010**. Biological activity of volatiles from marine and terrestrial bacteria. *Mar. Drugs* **8**, 2976-2987.

³³ Mansson, M.; Nielsen, A.; Kjærulff, L.; Gotfredsen, C. H.; Wietz, M.; Ingmer, H.; Gram, L.; Larsen, T.O. **2011**. Inhibition of virulence gene expression in *Staphylococcus aureus* by novel depsipeptides from a marine *Photobacterium*. *Mar. Drugs* **9**, 2537-2552.

³⁴ Kwan, J. C.; Meickle, T.; Ladwa, D.; Teplitski, M.; Paul, V.; Luesch, H. **2011**. Lyngbyoic acid, a "tagged" fatty acid from a marine cyanobacterium, disrupts quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. BioSyst.* **7**, 1205-1216.

también, todos los compuestos activos presentan un sustituyente sobre C-4, principalmente grupos alquilo, aldehído y éster; así mismo, todos presentan un grupo metilo sobre C-8 con una configuración *R* sobre este carbono, a excepción de los compuestos **3** y **7**, los cuales tienen configuración *8S*; los compuestos **3**, **6**, **7** y **14** presentan un grupo metilo sobre C-12 y los compuestos **10** y **11** un metileno olefínico sobre esta misma posición. En forma particular, los cembranos aislados a partir de *P. flagellosa* presentaron un grupo ceto sobre C-6 y los aislados de *E. knighti* presentaron una oxidación en forma de epóxido entre C-7 y C-8. En general, la ubicación espacial del grupo isopropilideno soportado por C-1 en todas las moléculas no parece afectar la actividad, así mismo, algunas variaciones en los patrones de oxidación de los cembranos al parecer no presentan mayor relevancia en la inducción de la actividad IQS.

Tabla 2.7. Inhibición de quorum sensing y del biofilm bacteriano de los compuestos **1-16**

Ensayo	Inhibición de <i>Quorum sensing</i> ^a (cantidad en µg/disco) ^b		Inhibición del biofilm IC ₅₀ (ppm) ^c	
	<i>Chromobacterium violaceum</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Vibrio harveyi</i>
1	-	4.0	10.1	17.1
2	-	4.5	10.0	69.7
3	7.5	11.5	>100	11.0
4	-	17.2	>100	>100
5	-	9.2	20.9	0.3
6	7.5	6.4	1.0	>100
7	30.0	12.2	5.7	9.5
8	-	6.8	1.4	53.8
9	-	10.1	2.0	0.3
10	7.5	50.0	1.3	9.8
11	15.0	8.3	3.2	1.0
12	-	4.1	0.01	>100
13	-	12.8	0.3	>100
14	7.5	9.3	0.8	>100
15	-	14.7	0.5	>100
16	-	5.0	0.01	80.2
Ácido kójico	90.0	17.2	24.7	>100
Cu ₂ O	40.0	ND	ND	ND
Solvente	-	NI	NI	NI

^a La actividad fue medida teniendo en cuenta la inhibición del pigmento violeta. ^b Mínima cantidad requerida en µg por disco del compuesto para inhibir la producción del pigmento violeta. – No hay zona de inhibición inclusive a 30 µg/disco.

^c Concentración que inhibe el 50% del biofilm. ND No determinado. NI No hay inhibición del biofilm.

2.10.5. Ensayo de inhibición de biofilm bacteriano en los compuestos naturales 1-16¹

Los biofilm bacterianos han sido reconocidos como señales fundamentales en el asentamiento de muchas larvas de invertebrados marinos que colonizan diversas superficies, como esponjas, cnidarios, moluscos, cirripedios briozoos y ascidias.³⁵ Este proceso es complejo y es el resultado de las interacciones entre el biofilm y las comunidades de colonizadores.³⁶ Este tipo de interacciones que se presentan con un tipo

³⁵ Fusetani, N. **2011**. Antifouling marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 28, 400-410.

³⁶ Joint, I.; Tait, K.; Wheeler, G. **2007**. Cross-kingdom signalling: exploitation of bacterial quorum sensing molecules by the green seaweed *Ulva*. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 362, 1223-1233.

específico de biofilm, determinan finalmente la composición de diferentes poblaciones de organismos, así como el establecimiento de un ambiente específico, lo cual subsecuentemente genera un patrón de relaciones químicas, que crean señales específicas para la posterior colonización de otros organismos.

Para los ensayos de inhibición del biofilm bacteriano, se usaron como bacterias modelo: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (Gram negativa), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Gram positiva) y *Vibrio harveyi* PHY-2A (Gram negativa), los compuestos fueron evaluados a las concentraciones: 0.5, 1.0, 2.5, 10.0 y 100.0 ppm. Se establecieron para todos los compuestos los valores IC₅₀, los cuales son presentados en la Tabla 2.7. El análisis de los datos permitió establecer que todos los compuestos (**1-16**) inhibieron el desarrollo del biofilm bacteriano en *P. aeruginosa* a valores de IC₅₀ menores que el control positivo empleado ácido kójico (IC₅₀ 17.2 ppm), excepto el compuesto **10** (50.0 ppm); principalmente, los compuestos **1, 2, 6, 8, 12 y 16** son tres y cuatro veces más activos que el control positivo. En el caso de la bacteria *S. aureus*, los resultados mostraron que todos los compuestos (**1-16**) poseen valores de IC₅₀ menores que el encontrado para el ácido kójico (control positivo, 24.7 ppm), con excepción de los epímeros **3 y 4**; en forma particular, los compuestos **12-16** presentaron valores muy superiores de inhibición al presentado por el control positivo, siendo los compuestos **12 y 16** los más potentes de este grupo en la inhibición del biofilm bacteriano, ya que mostraron los valores de IC₅₀ más bajos (0.01 ppm en los dos casos). También, los compuestos **6-8 y 9-11** presentaron excelentes valores de IC₅₀, destacándose los compuestos **6, 8, 10 y 11** que son entre doce a veinticuatro veces más activos que el control positivo empleado. Finalmente, la formación del biofilm en *V. harveyi* fue inhibida por los compuestos **1-3, 5, 7-11 y 16**, los cuales a su vez, también mostraron valores de IC₅₀ inferiores al ácido kójico. Es importante mencionar que los epímeros 85 (aislados de *P. flagellosa*) mostraron una mayor y notable actividad contra el biofilm bacteriano producido por *V. harveyi*, indicando una marcada selectividad contra la producción de este biofilm; principalmente, el epímero **5** inhibió el desarrollo del biofilm a un valor de IC₅₀ de 0.3 ppm, un valor muy inferior al presentado por el control positivo. Los compuestos **9** (0.3 ppm) y **11** (1.0 ppm) aislados de *E. knighti* también presentaron valores de IC₅₀ inferiores que el control positivo ácido kójico. Los demás compuestos (**5, 7, 12-15**) junto con el control positivo, mostraron valores de IC₅₀ superiores a 100 ppm en la inhibición del biofilm bacteriano producido por *V. harveyi*. Cabe resaltar, que en todos los casos la inhibición del biofilm se logró sin interrumpir el crecimiento bacteriano, aún a concentraciones del orden de 100 ppm.

La comparación de los resultados de IC₅₀ obtenidos en el bioensayo de inhibición del biofilm bacteriano, con los reportados en la literatura para diversos tipos de compuestos naturales permitió establecer algunas consideraciones, la primera que los compuestos tipo cembrano presentan una excelente actividad y baja toxicidad comparados con otros productos naturales, la segunda que la inhibición del biofilm bacteriano está siendo altamente reconocida por jugar un papel importante en el proceso del *fouling*,³⁵ y la tercera que los compuestos inhibidores de la formación biofilm (inhibidores de QS) son a menudo potentes agentes *antifouling*. Entre los compuestos reportados en la literatura como inhibidores de la formación del biofilm se encuentran la oroidina, la cual mostró un IC₅₀ de 0.26 ppm en la inhibición del biofilm en la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* y un IC₅₀ de 35 ppm contra la formación del biofilm en *Acinetobacter baumannii*.³⁷ El dictiol C, el cual presentó inhibición del biofilm contra la cepa bacteriana *Pseudoalteromonas* sp. D41 a 9.2 ppm,³⁸ la oxima de la agelasina D, la cual inhibió la producción del biofilm en *Staphylococcus epidermis* con una CMI de 0.027 ppm.³⁹

Adicionalmente, se deben tener en cuenta algunas consideraciones de relación estructura-actividad para estos compuestos con base en los resultados de actividad obtenidos. Al igual que en el ensayo anterior se

³⁷ Richards, J. J.; Melander, C. **2009**. Controlling Bacterial Biofilms. *ChemBioChem*, *10*, 2287–2294.

³⁸ Viano, Y.; Bonhomme, D.; Camps, M.; Briand, J. F.; Ortalo-Magné, A.; Blache, Y.; Piovetti, L.; Culioli, G. **2009**. Diterpenoids from the Mediterranean brown alga *Dictyota* sp. evaluated as antifouling substances against a marine bacterial biofilm. *J. Nat. Prod.* *72*, 1299–1304.

³⁹ Hertiani, T.; Edrada-Ebel, R.; Ortlepp, S.; Van Soest, R. W. M.; De Voogd, N. J.; Wray, V.; Hentschel, U.; Kozytska, S.; Muller, W. E. G.; Proksch, P. **2010**. From anti-fouling to biofilm inhibition: New cytotoxic secondary metabolites from two Indonesian Agelas sponges. *Bioorg. Med. Chem.* *18*, 1297–1311.

observaron relaciones de estructura-actividad similares, sin embargo, también pudieron apreciarse algunas otras correlaciones, por ejemplo, los epímeros **1**, **2** y **5**, **6** presentaron mejor actividad inhibitoria en general que sus congéneres y en un análisis de sus estructuras se pudo evidenciar la presencia de dos grupos ceto uno en C-6 y otro en C-11 en todos ellos. Los compuestos **11** y **16** los cuales presentaron los mejores valores de IC₅₀ contra *S. aureus* presentan en su estructura un éster sobre C-18, los compuestos **1**, **2** y **12** que resultaron ser los más activos contra *P. aeruginosa* presentan funcionalidades sobre C-3,4 y C-11,12. Finalmente, los compuestos **5** y **9** que fueron los más activos contra *V. harveyi* presentan algunas similitudes estructurales como un grupo metilo sobre C-4, C-8 y C-12 y algún grado de oxidación en C-11 (en el caso de **5** un grupo ceto y en **9** un doble enlace).

Debido a que no se presentó inhibición del crecimiento en las cepas bacterianas *C. violaceum* (IQS), *P. aeruginosa*, *S. aureus*, y *V. harveyi* (inhibición de biofilm) a las concentraciones evaluadas, se pudo establecer la no toxicidad de los compuestos **1-16** contra estas bacterias, es decir se evitó un efecto bactericida o bacteriostático y así mismo una posible resistencia bacteriana. También, es importante resaltar el hecho de que los compuestos **3**, **6**, **7**, **10**, **11** y **14** presentan inhibición de QS e inhibición del biofilm bacteriano, sugiere que estos compuestos están interfiriendo en la comunicación bacteriana, evitando el desarrollo del biofilm, así como el desarrollo sucesivo de comunidades microbianas. Estas acciones, podrían consecutivamente afectar la asociación de otras especies a la superficie, evitando probablemente los pasos posteriores en el proceso del *fouling*.^{16,17}

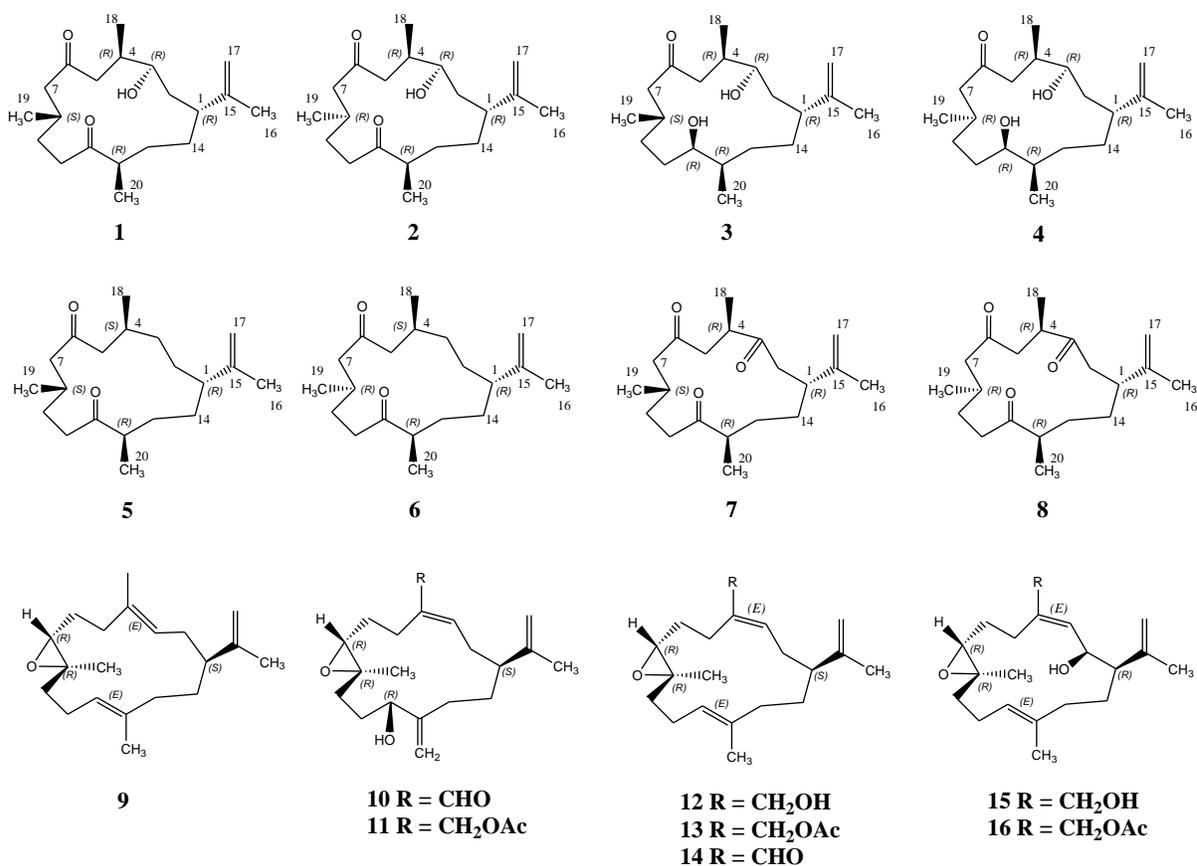


Figura 2.35. Estructuras de los compuestos aislados (**1-16**)

En conclusión, a partir del octocoral *P. flagellosa* se aislaron ocho compuestos con actividad *antifouling* (**1-8**) (Figura 2.35) con un esqueleto tipo cembrano, y entre estos, los compuestos **2**, **4** y **6** se reportan por

primera vez en la literatura. Adicionalmente, se reportaron o se revisaron la estereoquímica relativa y absoluta de los compuestos **1, 3, 5, 7 y 8** con la completa asignación de sus datos de RMN. Para el octocoral *E. knighti* se reportan ocho compuestos (**9-16**), de los cuales tres (**9-11**) son cembranos reportados por primera vez en la literatura. La elucidación de las estructuras se estableció mediante el análisis detallado de los datos espectroscópicos obtenidos, las configuraciones absolutas obtenidas de los experimentos NOESY y mediante el uso del método modificado de Mosher. Adicionalmente, todos los compuestos (**1-16**) fueron evaluados en los ensayos de IQS e inhibición del biofilm bacteriano, encontrándose que los compuestos **3, 6, 7, 10, 11 y 14** fueron los compuestos más activos en los dos bioensayos, lo que los hace excelentes agentes *antifouling* y a su vez pueden ser considerados como potenciales aditivos ambientalmente amigables en las pinturas comerciales *antifouling*, debido a que no son tóxicos. Actualmente se sabe, que cada bacteria es capaz de colonizar superficies completas que están recubiertas con biocidas comerciales, afectando su rendimiento.^{13,14,18,35} Cabe resaltar, que algunos compuestos tipo cembrano reportados en este trabajo presentan mejores valores de inhibición de QS y de biofilm bacteriano que los reportados para la mayoría de los compuestos aislados previamente de organismos marinos, como fue revisado por Fusetani en el 2011.³⁵

3. SÍNTESIS DE ANÁLOGOS TIPO CEMBRANO A PARTIR DE COMPUESTOS NATURALES AISLADOS, EVALUACIÓN DE SUS PROPIEDADES ANTIFOULING Y ALGUNAS APROXIMACIONES A LA RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD

Con base en los resultados de actividad *antifouling* obtenidos en los numerales 2.10.4. y 2.10.5., capítulo 2, se procedió a realizar algunas modificaciones estructurales con el objetivo de potenciar la acción *antifouling* observada. Así, se realizaron modificaciones estructurales en algunos de los compuestos tipo cembrano naturales aislados de los octocorales *P. flagellosa*¹ y *E. knighti*², seleccionándolos de acuerdo a la alta actividad que presentaron en alguno o en los dos ensayos contra el *microfouling*, a su alta concentración en la cual se encontraron en los gorgónidos, así como a la presencia de grupos funcionales reactivos presentes en sus estructuras.³ Con los análogos sintéticos obtenidos se realizaron pruebas de actividad *antifouling* (ensayo de IQS e inhibición de *biofilm*) y los resultados permitieron establecer la importancia de la presencia de ciertos grupos funcionales, así como la de algunos rearrreglos estructurales, basados en su capacidad de inducir o potenciar esta actividad (Figura 3.1.). Así mismo, estos datos permitieron hacer una aproximación a la relación estructura-actividad *antifouling* y seleccionar el mejor agente (el más potente y estructuralmente menos complejo) para evaluar sus propiedades *antifouling* en condiciones naturales en el océano (datos mostrados en el capítulo 4) y con base en la estructura de este cembrano, se desarrolló una estrategia sintética que permitiera obtener este tipo de compuestos para evaluar las ventajas de su obtención mediante la síntesis (datos mostrados en el capítulo 5).

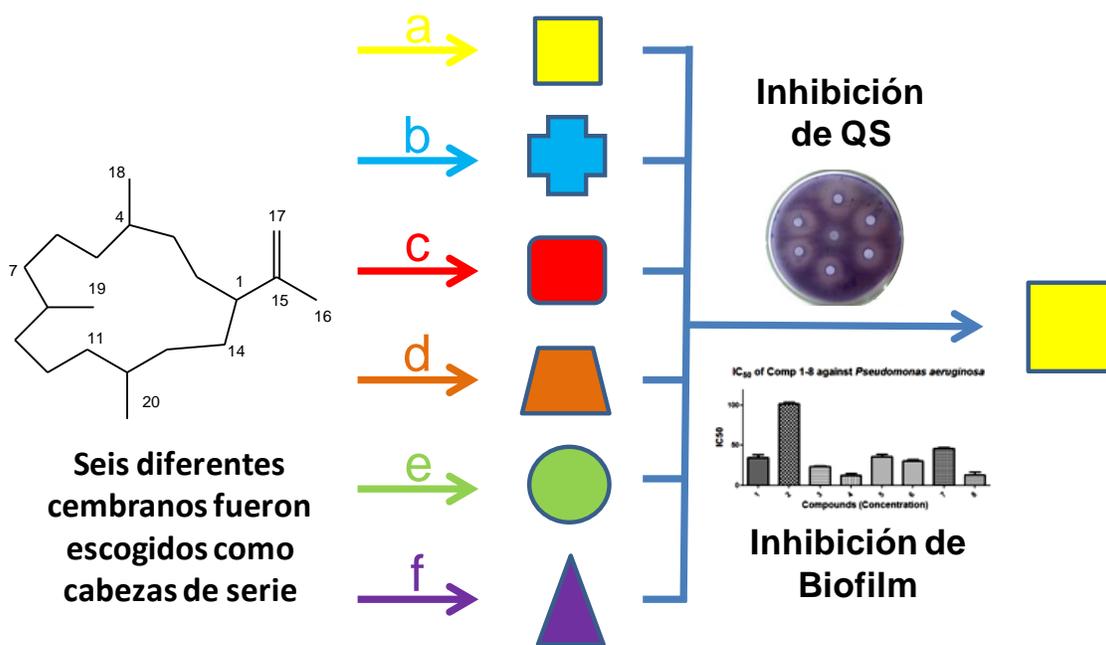


Figura 3.1. Esquema de obtención de diversos análogos bajo diferentes tipos de reacciones químicas, para su posterior evaluación de actividad biológica y estudios de relación estructura-actividad *antifouling*

¹ Tello, E.; Castellanos, L.; Arevalo-Ferro, C.; Rodríguez, J.; Jiménez, C.; Duque, C. **2011**. Absolute stereochemistry of antifouling cembranoid epimers at C-8 from the Caribbean octocoral *Pseudoplexaura flagellosa*. Revised structures of plexaurolones. *Tetrahedron* **67**, 9112-9121.

² Tello, E.; Castellanos, L.; Arevalo-Ferro, C.; Duque, C. **2012**. Disruption in quorum sensing systems and biofilm inhibition of bacteria by cembranoid diterpenes isolated from the octocoral *Eunicea knighti*. *J. Nat. Prod.* **75**, 1637-1642.

³ Tello, E.; Castellanos, L.; Duque, C. **2013**. Synthesis of cembranoid analogues and evaluation of their potential as quorum sensing inhibitors. *Bioorg. & Med. Chem.* **21**, 242-256. DOI 10.1016/j.bmc.2012.10.022.

3.1. METODOLOGÍA

3.1.1. Generalidades

Todas las reacciones fueron monitoreadas mediante cromatografía en capa delgada (CCD) usando placas de aluminio cubiertas con gel de sílice 60F₂₅₄ de Merck, visualizadas con luz ultravioleta ($\lambda_{\text{max}} = 254 \text{ nm}$), y luego reveladas con soluciones de sulfato cérico amónico ácido, permanganato de potasio básico o ácido fosfomolibdico, a no ser que se indique el uso de otro revelador en el texto.

Las reacciones que requirieron condiciones anhidras fueron conducidas bajo atmósfera inerte de nitrógeno o argón, todo el material de vidrio utilizado fue previamente flameado o secado en estufa. Los solventes orgánicos fueron rutinariamente almacenados bajo atmósfera de nitrógeno y/o secados sobre sodio. Diclorometano, trietilamina y piridina fueron destilados sobre hidruro de calcio. El tetrahidrofurano fue secado mediante destilación sobre sodio y benzofenona. Los solventes fueron removidos en vacío a aprox. 20 mmHg usando un rotaevaporador Buchi.

Para la cromatografía en columna (CC) de compuestos de baja y mediana polaridad se empleó como adsorbente gel de sílice (63-200 μm) de Merck y para CC al vacío se utilizó también gel de sílice pero de menor tamaño de partícula (40-63 μm) suministrado por Merck.

Los análisis por cromatografía de gases de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (CGAR-EM) se llevaron a cabo en un cromatógrafo de gases Shimadzu GC-17A conectado a un espectrómetro de masas QP5050A como detector y un Bruker MicroTOF system, usando la técnica electrospray (ESI). Los análisis se realizaron empleando una columna DB-1 de sílica fundida (25 m x 0.25 mm d.i., película 1 μm) y usando helio (1 mL/min) como gas de arrastre. La fuente de ionización se mantuvo en 70 eV.

Los análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) preparativa fueron hechos en un cromatógrafo Merck-Hitachi con un detector UV/Vis L-4250 a 210 nm usando una columna LichroCART RP-18 (250 x 10 mm d.i.; 5 μm), como eluyente se utilizó una mezcla de MeOH-H₂O 80:20 a un flujo de 3 mL/min.

Los espectros UV de cada compuesto se obtuvieron en un cromatógrafo líquido Merck-Hitachi con detector de arreglo de diodos, equipado con una columna Shimpack CLC-ODS (150 x 6 mm d.i., 5 μm), utilizando como fase móvil un gradiente de MeOH-H₂O de 50% a 100% de MeOH en 30 min, el flujo se fijó en 1.0 mL/min.

Los espectros de resonancia magnética nuclear RMN fueron obtenidos en los equipos Bruker AVANCE 400 (400 MHz para ¹H y 100 MHz para ¹³C) y en un Bruker Avance 500 (500 MHz para ¹H y 125 MHz para ¹³C) como soluciones diluidas (~ 10 mg/0.4 mL) en un solvente deuterado. Los desplazamientos químicos fueron reportados en partes por millón (ppm) relativos al pico del solvente residual y la multiplicidad de cada señal fue designada por las siguientes abreviaciones: s (singlete), d (doblete), t (triplete), q (cuarteto), br (ancho), m (multiplete). Todas las constantes de acoplamiento fueron reportadas en hertz (Hz) y las asignaciones fueron hechas de acuerdo a los desplazamientos químicos y al análisis de los experimentos bidimensionales. Los solventes deuterados utilizados fueron CDCl₃ (99.8%), CD₂Cl₂ (99.9%) y MeOD (99.8%).

La actividad óptica fue medida en un polarímetro Polartronic ADP440+, Bellinghan+stanley polarimeter, las concentraciones se expresan como g/100 mL y el disolvente usado se indica en cada caso. Los espectros IR fueron tomados en un espectrofotómetro Perkin-Elmer-FT-IR Paragon 500, series 1000.

Los solventes utilizados fueron de grado R.A. y usados directamente del proveedor a no ser que se dé otra indicación en el texto.

3.2. SÍNTESIS DE ANÁLOGOS A PARTIR DE ALGUNOS CEMBRANOS NATURALES AISLADOS¹⁻³

Los compuestos seleccionados como cabezas de serie para esta parte del trabajo, fueron escogidos de acuerdo a la actividad que presentaron en los ensayos contra el *microfouling*, a la alta concentración en la cual se encontraron en los gorgónidos y a la presencia de grupos funcionales reactivos en sus estructuras. Estos cembranos, fueron sometidos a diversas transformaciones químicas con el fin de potenciar la acción biológica observada y también para obtener una gran diversidad química de análogos tipo cembrano, para ser evaluados en los ensayos *antifouling*.

3.2.1. Reacción de acetato de asperdiol (16) con CDCl₃ acidificado³

El compuesto **16** (130 mg, 0.36 mmol) fue disuelto en CDCl₃ (6 mL) y un cristal de yodo fue posteriormente adicionado. Luego, 250 µL de CDCl₃ acidificado (HCl_(g)) fue burbujeado en 5 mL de CDCl₃ durante 30 segundos) fueron adicionados a la mezcla de reacción.^{3,4,5} Después de 36 h, la reacción fue detenida y los productos purificados mediante cromatografía en columna en sílica gel, eluyendo con hexano–AcOEt (90:10 v/v) para producir un mezcla de **17** y **18** (27 mg, 20.7%) y los compuestos puros **19** (isómero *Z*) (12 mg, 0.033 mmol, 9.2%), **20** (18 mg, 0.045 mmol, 12.6%) y **21** (8 mg, 0.021 mmol, 5.8%). La mezcla de los compuestos **17** y **18** fue sometida a CLAE en fase reversa, usando MeOH–H₂O (50:50 v/v), para obtener los compuestos puros **17** (*exo*-metileno) (8 mg, 0.022 mmol, 6.1%) y **18** (isómero *E*) (18 mg, 0.050 mmol, 13.8%).

(-)-(1R,2S,7R,3E,11E)-18-acetoxicembra-3,8(19),11,15(17)-tetraen-2,7-diol 17. Aceite incoloro; $[\alpha]_D^{25}$ -61.5 (c 0.13, CHCl₃); IR (CH₂Cl₂) ν_{\max} 3436, 1732, 1024, 736 cm⁻¹; RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz), δ 2.07 (m, 1H, H-1), 4.52 (dd, *J* = 8.6, 3.6 Hz, 1H, H-2), 5.40 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H-3), 2.30 (m, 1H, H-5a), 1.85 (m, 1H, H-5b), 1.76 (m, 1H, H-6a), 1.48 (m, 1H, H-6b), 4.14 (dd, *J* = 8.7, 4.9 Hz, 1H, H-7), 1.95 (m, 1H, H-9a), 1.89 (m, 1H, H-9b), 2.43 (dt, *J* = 15.3, 7.7 Hz, 1H, H-10a), 2.22 (m, 1H, H-10b), 5.36 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H, H-11), 2.11 (m, 2H, H-13), 2.20 (m, 1H, H-14a), 1.95 (m, 1H, H-14b), 1.73 (s, 3H, H-16), 4.86 (br s, 1H, H-17a), 4.69 (br s, 1H, H-17b), 4.56 (d, *J* = 12.7 Hz, 1H, H-18a), 4.44 (d, *J* = 12.7 Hz, 1H, H-18b), 5.02 (br s, 1H, H-19a), 5.00 (br s, 1H, H-19b), 1.61 (s, 3H, H-20), 2.07 (s, 3H, H-22); RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz), δ 48.8 (d, C-1), 67.2 (d, C-2), 132.6 (d, C-3), 134.6 (s, C-4), 25.7 (t, C-5), 33.6 (t, C-6), 77.0 (d, C-7), 146.1 (s, C-8), 26.9 (t, C-9), 24.1 (t, C-10), 125.0 (d, C-11), 133.8 (s, C-12), 36.0 (t, C-13), 30.4 (t, C-14), 149.0 (s, C-15), 23.9 (q, C-16), 112.9 (t, C-17), 67.4 (t, C-18), 110.8 (t, C-19), 15.1 (q, C-20), 170.8 (s, C-21), 21.0 (q, C-22); HRESIMS *m/z* 385.2350 [M+Na]⁺ (Calculado para C₂₂H₃₄O₄Na, 385.2354).

(-)-(1R,2S,7R,3E,8E,11E)-18-acetoxicembra-3,8,11,15(17)-tetraen-2,7-diol 18. Aceite incoloro; $[\alpha]_D^{25}$ -42.0 (c 0.29, CHCl₃); IR (CH₂Cl₂) ν_{\max} 3455, 1739, 1234, 736 cm⁻¹; RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz), δ 1.97 (m, 1H, H-1), 4.49 (m, 1H, H-2), 5.56 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-3), 1.93 (m, 1H, H-5a), 1.90 (m, 1H, H-5b), 1.81 (m, 1H, H-6a), 1.74 (m, 1H, H-6b), 4.02 (dd, *J* = 10.1, 2.9 Hz, 1H, H-7), 5.15 (dd, *J* = 10.0, 5.2 Hz, 1H, H-9), 2.96 (m, 1H, H-10a), 2.58 (td, *J* = 12.6, 6.2 Hz, 1H, H-10b), 5.32 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, H-11), 2.20 (m, 1H, H-13a), 2.11 (m, 1H, H-13b), 1.95 (m, 2H, H-14), 1.71 (s, 3H, H-16), 4.79 (br s, 1H, H-17a), 4.63 (br s, 1H, H-17b), 4.53 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H, H-18a), 4.43 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H, H-18b), 1.61 (s, 3H, H-19), 1.69 (s, 3H, H-20), 2.06 (s, 3H, H-22); RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz), δ 47.9 (d, C-1), 68.1 (d, C-2), 132.7 (d, C-3), 136.4 (s, C-4), 24.3 (t, C-5), 32.3 (t, C-6), 77.1 (d, C-7), 132.2 (s, C-8), 123.6 (d, C-9), 26.4 (t, C-10), 125.8 (d, C-11), 133.3 (s, C-12), 36.3 (t, C-13), 26.9 (t, C-14), 146.2 (s, C-15), 23.8 (q, C-16), 112.6 (t, C-17), 67.2 (t, C-18), 11.4 (q, C-19), 15.2 (q, C-20), 170.7 (s, C-21), 21.0 (q, C-22); HRESIMS *m/z* 385.2345 [M+Na]⁺ (Calculado para C₂₂H₃₄O₄Na, 385.2349).

⁴ Greenland, J. G.; Bowden, B. F. **1994**. Cembranoid diterpenes related to sarcophytol A from the soft coral *Sarcophyton trocheliophorum* (*Alcyonacea*). *Aust. J. Chem.* **47**, 2013-2021.

⁵ Nii, K.; Tagami, K.; Matsuoka, K.; Munakata, T.; Ooi, T.; Kusumi, T. **2006**. Unusual transannular cyclization products of sarcophytoxide, a 14-membered marine cembranoid: anomalous stereochemistry of epoxide-ketone rearrangement. *Org. Lett.* **8**, 2957-2960.

(-)-(1R,2S,7R,3E,8Z,11E)-18-acetoxicembra-3,8,11,15(17)-tetraen-2,7-diol 19. Aceite incoloro; $[\alpha]_D^{25}$ -63.8 (c 0.04, CHCl₃); IR (CH₂Cl₂) ν_{\max} 3436, 1730, 1025, 736 cm⁻¹; RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz), δ 2.11 (m, 1H, H-1), 4.45 (m, 1H, H-2), 5.43 (d, J = 7.1 Hz, 1H, H-3), 1.74 (m, 2H, H-5), 1.32 (m, 2H, H-6), 4.46 (m, 1H, H-7), 5.04 (d, J = 8.9 Hz, 1H, H-9), 2.98 (m, 1H, H-10a), 2.53 (m, 1H, H-10b), 5.52 (t, J = 7.6 Hz, 1H, H-11), 2.18 (m, 1H, H-13a), 2.08 (m, 1H, H-13b), 1.72 (m, H, H-14a), 1.36 (m, H, H-14b), 1.74 (s, 3H, H-16), 4.91 (br s, 1H, H-17a), 4.69 (br s, 1H, H-17b), 4.53 (d, J = 12.7 Hz, 1H, H-18a), 4.44 (d, J = 12.3 Hz, 1H, H-18b), 1.64 (s, 3H, H-19), 1.70 (s, 3H, H-20), 2.07 (s, 3H, H-22); RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz), δ 49.3 (d, C-1), 70.8 (d, C-2), 133.0 (d, C-3), 139.7 (s, C-4), 27.1 (t, C-5), 35.2 (t, C-6), 71.6 (d, C-7), 133.5 (s, C-8), 124.3 (d, C-9), 26.2 (t, C-10), 125.5 (d, C-11), 134.6 (s, C-12), 36.5 (t, C-13), 27.8 (t, C-14), 145.1 (s, C-15), 23.9 (q, C-16), 113.7 (t, C-17), 67.5 (t, C-18), 17.2 (q, C-19), 15.8 (q, C-20), 170.9 (s, C-21), 21.0 (q, C-22); HRESIMS m/z C₂₂H₃₄O₄Na, 385.2346 [M+Na]⁺ (Calculado para C₂₂H₃₄O₄Na, 385.2349).

(-)-(1R,2S,7R,8R,3E,11E)-8-cloro-18-acetoxicembra-3,11,15(17)-trien-2,7-diol 20. Aceite incoloro; $[\alpha]_D^{25}$ -66.2 (c 0.10, CHCl₃); IR (CH₂Cl₂) ν_{\max} 3457, 1730, 1372, 1235, 737 cm⁻¹; RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz), δ 2.00 (m, 1H, H-1), 4.56 (dd, J = 8.7, 3.4 Hz, 1H, H-2), 5.46 (d, J = 8.8 Hz, 1H, H-3), 2.36 (m, 2H, H-5), 1.70 (m, 2H, H-6), 3.79 (d, J = 10.6 Hz, 1H, H-7), 2.31 (m, 2H, H-9), 2.22 (m, 2H, H-10), 5.34 (t, J = 7.9 Hz, 1H, H-11), 2.22 (m, 1H, H-13a), 2.00 (m, 1H, H-13b), 1.98 (m, 2H, H-14), 1.77 (s, 3H, H-16), 4.93 (br s, 1 H, H-17a), 4.74 (br s, 1H, H-17b), 4.51 (d, J = 13.0 Hz, 1H, H-18a), 4.48 (d, J = 13.0 Hz, 1H, H-18b), 1.52 (br s, 3H, H-19), 1.61 (br s, 3H, H-20), 2.08 (s, 3H, H-22); RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz), δ 49.1 (d, C-1), 66.9 (d, C-2), 132.0 (d, C-3), 136.2 (s, C-4), 23.1 (t, C-5), 30.5 (t, C-6), 75.5 (d, C-7), 83.1 (s, C-8), 42.2 (t, C-9), 26.7 (t, C-10), 125.9 (d, C-11), 134.8 (s, C-12), 35.8 (t, C-13), 27.2 (t, C-14), 146.0 (s, C-15), 24.0 (q, C-16), 113.1 (t, C-17), 67.3 (t, C-18), 25.2 (q, C-19), 15.3 (q, C-20), 170.8 (s, C-21), 21.0 (q, C-22); HRESIMS m/z 423.2125/421.2128 [M+Na]⁺ (Calculado para C₂₂H₃₅ClO₄Na, 421.2121).

(-)-(1R,2S,7R,8R,3E,11E)-18-acetoxicembra-3,11,15(17)-trien-2,7,8-triol 21. Aceite incoloro; $[\alpha]_D^{25}$ -4.4 (c 0.59, CHCl₃); IR (CH₂Cl₂) ν_{\max} 3457, 1730, 1372, 1235, 737 cm⁻¹; RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz), δ 2.05 (m, 1H, H-1), 4.52 (dd, J = 8.8, 4.0 Hz, 1H, H-2), 5.48 (d, J = 8.6 Hz, 1H, H-3), 2.38 (m, 1H, H-5a), 2.35 (m, 1H, H-5b), 1.68 (m, 2H, H-6), 3.45 (m, 1H, H-7), 2.27 (m, 2H, H-9), 2.24 (m, 2H, H-10), 5.23 (t, J = 7.6 Hz, 1H, H-11), 2.17 (m, 1H, H-13a), 1.99 (m, 1H, H-13b), 1.96 (m, 1H, H-14a), 1.69 (m, 1H, H-14b), 1.78 (s, 3H, H-16), 4.95 (br s, 1 H, H-17a), 4.76 (br s, 1H, H-17b), 4.58 (d, J = 12.7 Hz, 1H, H-18a), 4.47 (d, J = 12.7 Hz, 1H, H-18b), 1.59 (s, 3H, H-19), 1.71 (s, 3H, H-20), 2.08 (s, 3H, H-22); RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz), δ 49.4 (d, C-1), 67.1 (d, C-2), 133.7 (d, C-3), 135.1 (s, C-4), 25.8 (t, C-5), 27.4 (t, C-6), 76.2 (d, C-7), 80.2 (s, C-8), 42.8 (t, C-9), 25.8 (t, C-10), 132.4 (d, C-11), 133.6 (s, C-12), 35.9 (t, C-13), 32.1 (t, C-14), 145.8 (s, C-15), 23.7 (q, C-16), 113.3 (t, C-17), 67.6 (t, C-18), 27.3 (q, C-19), 15.2 (q, C-20), 170.8 (s, C-21), 21.0 (q, C-22); HRESIMS m/z 403.2460 [M+Na]⁺ (Calculado para C₂₂H₃₆O₅Na, 403.2460).

3.2.2. Reacción de acetato de knightol (13) con CDCl₃ acidificado³

El compuesto **13** (200 mg, 0.58 mmol) fue tratado de igual forma que el compuesto **16**. Luego de 24 h, la reacción fue detenida y los productos sometidos a cromatografía en sílica gel, eluyendo con hexano–AcOEt (90:10 v/v) para producir los compuestos **22** (36 mg, 0.10 mmol, 17.2%), **23** (40 mg, 0.11 mmol, 19.0%), **24** (37 mg, 0.08 mmol, 14.0%) y **25** (42 mg, 0.11 mmol, 19.0%)

(-)-(1S,7R,3E,11E)-18-acetoxicembra-3,8(19),11,15(17)-tetraen-7-ol 22. Aceite incoloro; $[\alpha]_D^{25}$ -26.7 (c 0.16, CHCl₃); IR (CH₂Cl₂) ν_{\max} 3457, 1730, 1372, 1235, 737 cm⁻¹; RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz), δ 2.00 (m, 1H, H-1), 2.38 (m, 1H, H-2a), 1.82 (m, 1H, H-2a), 5.56 (d, J = 7.9 Hz, 1H, H-3), 2.36 (m, 2H, H-5), 1.70 (m, 2H, H-6), 4.17 (d, J = 10.6 Hz, 1H, H-7), 2.31 (m, 2H, H-9), 2.22 (m, 2H, H-10), 5.34 (t, J = 7.9 Hz, 1H, H-11), 2.22 (m, 1H, H-13a), 2.00 (m, 1H, H-13b), 1.98 (m, 2H, H-14), 1.77 (s, 3H, H-16), 4.93 (br s, 1 H, H-17a), 4.74 (br s, 1H, H-17b), 4.51 (d, J = 13.0 Hz, 1H, H-18a), 4.48 (d, J = 13.0 Hz, 1H, H-18b), 5.06 (br s, 1H, H-19a), 5.03 (br s, 1H, H-19b), 1.61 (br s, 3H, H-20), 2.08 (s, 3H, H-22); RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz), δ 45.1 (d, C-1), 29.7 (t, C-2), 129.2 (d, C-3),

136.2 (s, C-4), 23.1 (t, C-5), 30.5 (t, C-6), 77.0 (d, C-7), 145.2 (s, C-8), 42.2 (t, C-9), 26.7 (t, C-10), 125.9 (d, C-11), 134.8 (s, C-12), 35.8 (t, C-13), 27.2 (t, C-14), 146.0 (s, C-15), 24.0 (q, C-16), 113.1 (t, C-17), 67.3 (t, C-18), 111.0 (t, C-19), 15.3 (q, C-20), 170.8 (s, C-21), 21.0 (q, C-22); HRESIMS m/z 369.2486 $[M+Na]^+$ (Calculado para $C_{22}H_{34}O_3Na$, 369.2405).

(-)-(1S,7R,3E,8E,11E)-18-acetoxicembra-3,8,11,15(17)-tetraen-7-ol 23. Aceite incoloro; $[a]_D^{25}$ -7.4 (c 0.34, $CHCl_3$); IR (CH_2Cl_2) ν_{max} 3457, 1730, 1372, 1235, 737 cm^{-1} ; RMN 1H ($CDCl_3$, 400 MHz), δ 2.00 (m, 1H, H-1), 2.38 (m, 1H, H-2a), 1.82 (m, 1H, H-2a), 5.56 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-3), 2.36 (m, 2H, H-5), 1.70 (m, 2H, H-6), 4.04 (dd, $J = 10.0, 2.9$ Hz, 1H, H-7), 5.20 (m, 1H, H-9), 2.22 (m, 2H, H-10), 5.34 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-11), 2.22 (m, 1H, H-13a), 2.00 (m, 1H, H-13b), 1.98 (m, 2H, H-14), 1.77 (s, 3H, H-16), 4.93 (br s, 1 H, H-17a), 4.74 (br s, 1H, H-17b), 4.51 (d, $J = 13.0$ Hz, 1H, H-18a), 4.48 (d, $J = 13.0$ Hz, 1H, H-18b), 1.64 (s, 3H, H-19), 1.61 (br s, 3H, H-20), 2.08 (s, 3H, H-22); RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz), δ 45.1 (d, C-1), 29.7 (t, C-2), 129.2 (d, C-3), 136.2 (s, C-4), 23.1 (t, C-5), 30.5 (t, C-6), 77.0 (d, C-7), 131.6 (s, C-8), 124.6 (t, C-9), 26.7 (t, C-10), 125.9 (d, C-11), 134.8 (s, C-12), 35.8 (t, C-13), 27.2 (t, C-14), 146.0 (s, C-15), 24.0 (q, C-16), 113.1 (t, C-17), 67.3 (t, C-18), 11.6 (q, C-19), 15.3 (q, C-20), 170.8 (s, C-21), 21.0 (q, C-22); HRESIMS m/z 369.2477 $[M+Na]^+$ (Calculado para $C_{22}H_{34}O_3Na$, 369.2405).

(-)-(1S,7R,3E,8Z,11E)-18-acetoxicembra-3,8,11,15(17)-tetraen-7-ol 24. Aceite incoloro; $[a]_D^{25}$ -6.2 (c 0.12, $CHCl_3$); IR (CH_2Cl_2) ν_{max} 3457, 1730, 1372, 1235, 737 cm^{-1} ; RMN 1H ($CDCl_3$, 400 MHz), δ 2.00 (m, 1H, H-1), 2.38 (m, 1H, H-2a), 1.82 (m, 1H, H-2a), 5.56 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-3), 2.36 (m, 2H, H-5), 1.70 (m, 2H, H-6), 4.50 (m, 1H, H-7), 5.09 (dd, $J = 8.3, 2.4$ Hz, 1H, H-9), 2.98 (m, 1H, H-10a), 2.55 (m, 1H, H-10b), 5.34 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-11), 2.22 (m, 1H, H-13a), 2.00 (m, 1H, H-13b), 1.98 (m, 2H, H-14), 1.77 (s, 3H, H-16), 4.93 (br s, 1 H, H-17a), 4.74 (br s, 1H, H-17b), 4.51 (d, $J = 13.0$ Hz, 1H, H-18a), 4.48 (d, $J = 13.0$ Hz, 1H, H-18b), 1.64 (s, 3H, H-19), 1.61 (br s, 3H, H-20), 2.08 (s, 3H, H-22); RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz), δ 45.1 (d, C-1), 29.7 (t, C-2), 129.2 (d, C-3), 136.2 (s, C-4), 23.1 (t, C-5), 30.5 (t, C-6), 73.7 (d, C-7), 133.5 (s, C-8), 124.3 (t, C-9), 26.7 (t, C-10), 125.9 (d, C-11), 134.8 (s, C-12), 35.8 (t, C-13), 27.2 (t, C-14), 146.0 (s, C-15), 24.0 (q, C-16), 113.1 (t, C-17), 67.3 (t, C-18), 17.4 (q, C-19), 15.3 (q, C-20), 170.8 (s, C-21), 21.0 (q, C-22); HRESIMS m/z 369.2415 $[M+Na]^+$ (Calculado para $C_{22}H_{34}O_3Na$, 369.2405).

(+)-(1S,7R,8R,3E,11E)-8-cloro-18-acetoxicembra-3,11,15(17)-trien-7-ol 25. Aceite incoloro; $[a]_D^{25}$ +5.3 (c 0.17, $CHCl_3$); IR (CH_2Cl_2) ν_{max} 3457, 1730, 1372, 1235, 737 cm^{-1} ; RMN 1H ($CDCl_3$, 400 MHz), δ 2.00 (m, 1H, H-1), 2.38 (m, 1H, H-2a), 1.82 (m, 1H, H-2a), 5.56 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-3), 2.36 (m, 2H, H-5), 1.70 (m, 2H, H-6), 3.79 (d, $J = 10.6$ Hz, 1H, H-7), 2.31 (m, 2H, H-9), 2.22 (m, 2H, H-10), 5.34 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-11), 2.22 (m, 1H, H-13a), 2.00 (m, 1H, H-13b), 1.98 (m, 2H, H-14), 1.77 (s, 3H, H-16), 4.93 (br s, 1 H, H-17a), 4.74 (br s, 1H, H-17b), 4.51 (d, $J = 13.0$ Hz, 1H, H-18a), 4.48 (d, $J = 13.0$ Hz, 1H, H-18b), 1.52 (br s, 3H, H-19), 1.61 (br s, 3H, H-20), 2.08 (s, 3H, H-22); RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz), δ 45.1 (d, C-1), 29.7 (t, C-2), 129.2 (d, C-3), 136.2 (s, C-4), 23.1 (t, C-5), 30.5 (t, C-6), 75.5 (d, C-7), 83.1 (s, C-8), 42.2 (t, C-9), 26.7 (t, C-10), 125.9 (d, C-11), 134.8 (s, C-12), 35.8 (t, C-13), 27.2 (t, C-14), 146.0 (s, C-15), 24.0 (q, C-16), 113.1 (t, C-17), 67.3 (t, C-18), 25.2 (q, C-19), 15.3 (q, C-20), 170.8 (s, C-21), 21.0 (q, C-22); HRESIMS m/z 405.2184 $[M+Na]^+$ (Calculado para $C_{22}H_{35}ClO_3Na$, 405.2172).

3.2.3. Reacción del compuesto asperdiol (15) con anhídrido acético^{3,6}

El compuesto asperdiol (15) (150 mg, 0.47 mmol) fue tratado con anhídrido acético (1 mL) en piridina seca (2 mL) durante 24 h, bajo agitación y a temperatura ambiente. El producto fue purificado por cromatografía en columna en sílica gel (hexano–AcOEt 90:10 v/v) para obtener un aceite incoloro correspondiente al compuesto puro diacetilado 26 (180 mg, 0.44 mmol, 94.8%).

⁶ Tello, E.; Castellanos, L.; Arévalo, C.; Duque, C. 2009. New cembranoid diterpenes from the caribbean sea whip *Eunicea knighti*. *J. Nat. Prod.* 72, 1595-1602.

(-)-diacetato de asperdiol 26. Aceite incoloro; $[a]_D^{25}$ -80.0 (c 0.40, CHCl₃); IR (CH₂Cl₂) ν_{\max} 3069, 1739, 1232, 736 cm⁻¹; RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz), δ 2.19 (m, 1H, H-1), 5.71 (dd, *J* = 8.4, 4.3 Hz, 1H, H-2), 5.38 (br d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H-3), 2.48 (m, 1H, H-5a), 2.30 (m, 1H, H-5b), 1.86 (m, 1H, H-6a), 1.48 (m, 1H, H-6b), 2.74 (dd, *J* = 6.2, 4.7 Hz, 1H, H-7), 1.94 (m, 1H, H-9a), 1.45 (m, 1H, H-9b), 2.20 (m, 2H, H-10), 5.17 (br t, *J* = 6.6 Hz, 1H, H-11), 2.15 (m, 1H, H-13a), 2.01 (m, 1H, H-13b), 1.60 (m, 2H, H-14), 1.74 (s, 3H, H-16), 4.84 (br s, 1H, H-17a), 4.63 (br s, 1H, H-17b), 4.51 (d, *J* = 13.0 Hz, 1H, H-18a), 4.46 (d, *J* = 13.0 Hz, 1H, H-18b), 1.19 (s, 3H, H-19), 1.60 (s, 3H, H-20), 2.06 (s, 3H, H-22), 2.06 (s, 3H, H-24); RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz), δ 48.0 (d, C-1), 71.0 (d, C-2), 127.8 (d, C-3), 135.8 (s, C-4), 25.9 (t, C-5), 26.3 (t, C-6), 64.4 (d, C-7), 60.5 (s, C-8), 37.0 (t, C-9), 24.0 (t, C-10), 125.7 (d, C-11), 134.6 (s, C-12), 35.7 (t, C-13), 27.0 (t, C-14), 144.9 (s, C-15), 21.4 (q, C-16), 114.1 (t, C-17), 66.7 (t, C-18), 16.9 (q, C-19), 15.5 (q, C-20), 170.6 (s, C-21), 21.2 (q, C-22), 170.3 (s, C-23), 21.0 (q, C-24); EIMS *m/z* 404 [M]⁺ (1), 386 (1), 362 (1), 300 (6), 271 (14), 177 (5), 152 (1), 121 (24), 109 (33), 95 (55), 81 (100) 67 (87); HRESIMS *m/z* 427.2467 [M + Na]⁺ (Calculado para C₂₄H₃₆O₅Na, 427.2460).

3.2.4. Reacción del diacetato de asperdiol (26) con CDCl₃ acidificado^{3,6}

El compuesto **26** (174 mg, 0.43 mmol) fue tratado de la misma manera que el compuesto **16**. Luego de 36 h, la reacción fue detenida y los productos purificados mediante cromatografía en columna en sílica gel, eluyendo con hexano-AcOEt (90:10 v/v) para producir los compuestos **27** (11 mg, 0.027 mmol, 6.3%), **30** (71 mg, 0.16 mmol, 37.5%) y una mezcla de **28** and **29** (29 mg, 16.6%). La mezcla de los compuestos **28** y **29** fue sometida a CLAE en fase reversa, usando MeOH-H₂O (50:50 v/v) como eluente, para obtener los compuestos puros **28** (isómero *E*) (19 mg, 0.047, 10.9%) y **29** (isómero *Z*) (7 mg, 0.017, 4.0%).

(-)-(1R,2S,7R,3E,11E)-2,18-diacetoxicembra-3,8(19),11,15(17)-tetraen-7-ol 27. Aceite incoloro; $[a]_D^{25}$ -61.5 (c 0.13, CHCl₃); IR (CH₂Cl₂) ν_{\max} 3436, 1732, 1024, 736 cm⁻¹; RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz), δ 2.07 (m, 1H, H-1), 5.64 (dd, *J* = 8.8, 3.7 Hz, 1H, H-2), 5.30 (br d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H-3), 2.34 (m, 1H, H-5a), 1.87 (m, 1H, H-5b), 1.77 (m, 1H, H-6a), 1.48 (m, 1H, H-6b), 4.17 (dd, *J* = 8.7, 4.7 Hz, 1H, H-7), 1.69 (m, 1H, H-9a), 1.57 (m, 1H, H-9b), 2.43 (m, 1H, H-10a), 2.22 (m, 1H, H-10b), 5.44 (br t, *J* = 6.8 Hz, 1H, H-11), 2.06 (m, 2H, H-13), 2.30 (m, 1H, H-14a), 2.11 (m, 1H, H-14b), 1.73 (s, 3H, H-16), 4.80 (br s, 1H, H-17a), 4.65 (br s, 1H, H-17b), 4.53 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H, H-18a), 4.44 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H, H-18b), 5.06 (br s, 1H, H-19a), 5.03 (br s, 1H, H-19b), 1.58 (s, 3H, H-20), 2.05 (s, 3H, H-22), 2.06 (s, 3H, H-24); RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz), δ 47.9 (d, C-1), 69.9 (d, C-2), 127.6 (d, C-3), 135.9 (s, C-4), 25.6 (t, C-5), 33.8 (t, C-6), 77.0 (d, C-7), 145.2 (s, C-8), 26.6 (t, C-9), 24.1 (t, C-10), 125.5 (d, C-11), 134.1 (s, C-12), 35.6 (t, C-13), 30.4 (t, C-14), 148.7 (s, C-15), 21.8 (q, C-16), 113.9 (t, C-17), 67.1 (t, C-18), 111.0 (t, C-19), 14.9 (q, C-20), 170.4 (s, C-21), 21.0 (q, C-22), 170.7 (s, C-23), 21.2 (q, C-24); HRESIMS *m/z* 427.2456 [M+Na]⁺ (Calculado para C₂₄H₃₆O₅Na, 427.2454).

(-)-(1R,2S,7R,3E,8E,11E)-2,18-diacetoxicembra-3,8,11,15(17)-tetraen-7-ol 28. Aceite incoloro; $[a]_D^{25}$ -160.0 (c 0.10, CHCl₃); IR (CH₂Cl₂) ν_{\max} 3455, 1739, 1234, 736 cm⁻¹; RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz), δ 2.08 (m, 1H, H-1), 5.60 (m, 1H, H-2), 5.18 (m, 1H, H-3), 2.00 (m, 2H, H-5), 1.83 (m, 1H, H-6a), 1.41 (m, 1H, H-6b), 4.04 (dd, *J* = 10.0, 2.9 Hz, 1H, H-7), 5.20 (m, 1H, H-9), 2.95 (m, 1H, H-10a), 2.57 (m, 1H, H-10b), 5.62 (m, 1H, H-11), 2.04 (m, 2H, H-13), 1.71 (m, 1H, H-14a), 1.59 (m, 1H, H-14b), 1.71 (br s, 3H, H-16), 4.77 (br s, 1H, H-17a), 4.60 (br s, 1H, H-17b), 4.50 (d, *J* = 12.5 Hz, 1H, H-18a), 4.41 (d, *J* = 12.5 Hz, 1H, H-18b), 1.64 (br s, 3H, H-19), 1.66 (br s, 3H, H-20), 2.07 (s, 3H, H-22), 2.05 (s, 3H, H-24); RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz), δ 47.2 (d, C-1), 70.9 (d, C-2), 128.2 (d, C-3), 136.4 (s, C-4), 24.2 (t, C-5), 32.3 (t, C-6), 77.0 (d, C-7), 131.6 (s, C-8), 124.2 (d, C-9), 26.4 (t, C-10), 125.7 (d, C-11), 134.8 (s, C-12), 35.8 (t, C-13), 26.7 (t, C-14), 145.2 (s, C-15), 21.8 (q, C-16), 113.8 (t, C-17), 66.9 (t, C-18), 11.6 (q, C-19), 15.1 (q, C-20), 170.7 (s, C-21), 21.2 (q, C-22), 170.3 (s, C-23), 21.0 (q, C-24); HRESIMS *m/z* 427.2459 [M+Na]⁺ (Calculado para C₂₄H₃₆O₅Na, 427.2454).

(-)-(1R,2S,7R,3E,8Z,11E)-2,18-diacetoxicembra-3,8,11,15(17)-tetraen-7-ol 29. Aceite incoloro; $[a]_D^{25}$ -55.9 (c 0.14, CHCl₃); IR (CH₂Cl₂) ν_{\max} 3436, 1730, 1025, 736 cm⁻¹; RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz), δ 2.18 (m, 1H, H-1), 5.60 (dd, *J* = 7.7, 3.4 Hz, 1H, H-2), 5.32 (br d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H-3), 2.22 (m, 2H, H-5), 1.90 (m, 2H, H-6), 4.50 (m, 1H, H-7), 5.09 (dd, *J* = 8.3, 2.4 Hz, 1H, H-9), 2.98 (m, 1H, H-10a), 2.55 (m, 1H, H-10b), 5.52 (br t, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-

11), 2.08 (m, 2H, H-13), 1.61 (m, 2H, H-14), 1.75 (br s, 3H, H-16), 4.83 (br s, 1H, H-17a), 4.62 (br s, 1H, H-17b), 4.50 (d, $J = 13.2$ Hz, 1H, H-18a), 4.45 (d, $J = 13.2$ Hz, 1H, H-18b), 1.64 (br s, 3H, H-19), 1.72 (br s, 3H, H-20), 2.08 (s, 3H, H-22), 2.07 (s, 3H, H-24); RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz), δ 48.4 (d, C-1), 70.9 (d, C-2), 128.0 (d, C-3), 139.7 (s, C-4), 27.1 (t, C-5), 35.4 (t, C-6), 73.7 (d, C-7), 133.5 (s, C-8), 124.3 (d, C-9), 26.2 (t, C-10), 125.7 (d, C-11), 136.3 (s, C-12), 36.3 (t, C-13), 26.7 (t, C-14), 144.1 (s, C-15), 21.6 (q, C-16), 114.8 (t, C-17), 67.1 (t, C-18), 17.4 (q, C-19), 15.7 (q, C-20), 170.7 (s, C-21), 21.2 (q, C-22), 170.5 (s, C-23), 21.0 (q, C-24); HRESIMS m/z 427.2457 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (Calculado para $\text{C}_{24}\text{H}_{36}\text{O}_5\text{Na}$, 427.2454).

(-)-(1R,2S,7R,8R,3E,11E)-8-cloro-2,18-diacetoxicembra-3,11,15(17)-trien-7-ol 30. Aceite incoloro; $[a]_D^{25} -66.2$ (c 0.27, CHCl_3); IR (CH_2Cl_2) ν_{max} 3457, 1730, 1372, 1235, 737 cm^{-1} ; RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz), δ 1.99 (m, 1H, H-1), 5.70 (dd, $J = 9.3, 3.3$ Hz, 1H, H-2), 5.41 (br d, $J = 9.4$ Hz, 1H, H-3), 2.38 (m, 1H, H-5a), 1.85 (m, 1H, H-5b), 1.64 (m, 2H, H-6), 3.50 (dd, $J = 9.4, 3.3$ Hz, 1H, H-7), 2.24 (m, 1H, H-9a), 1.97 (m, 1H, H-9b), 2.53 (m, 1H, H-10a), 2.39 (m, 1H, H-10a), 5.33 (br t, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-11), 2.16 (m, 1H, H-13a), 2.03 (m, 1H, H-13b), 1.58 (m, 2H, H-14), 1.76 (s, 3H, H-16), 4.84 (br s, 1 H, H-17a), 4.69 (br s, 1H, H-17b), 4.51 (d, $J = 13.2$ Hz, 1H, H-18a), 4.46 (d, $J = 13.2$ Hz, 1H, H-18b), 1.56 (br s, 3H, H-19), 1.71 (br s, 3H, H-20), 2.04 (s, 3H, H-22), 2.05 (s, 3H, H-24); RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz), δ 48.1 (d, C-1), 69.0 (d, C-2), 127.1 (d, C-3), 137.4 (s, C-4), 23.5 (t, C-5), 32.8 (t, C-6), 76.0 (d, C-7), 80.4 (s, C-8), 43.0 (t, C-9), 25.6 (t, C-10), 125.5 (d, C-11), 136.4 (s, C-12), 35.7 (t, C-13), 27.0 (t, C-14), 145.1 (s, C-15), 21.8 (q, C-16), 114.0 (t, C-17), 67.4 (t, C-18), 14.7 (q, C-19), 27.4 (q, C-20), 170.7 (s, C-21), 21.2 (q, C-22), 170.3 (s, C-23), 21.0 (q, C-24); HRESIMS m/z 465.2205/463.2218 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (Calculado para $\text{C}_{24}\text{H}_{37}\text{ClO}_5\text{Na}$, 463.2221).

3.2.5. Reacción de asperdiol (15) con CDCl_3 acidificado³

El compuesto **15** (175 mg, 0.55 mmol) fue tratado de la misma forma que los compuestos **13**, **16** y **26**. Después de 24 h, la mezcla de reacción fue finalizada y purificada mediante cromatografía en columna sobre sílica gel, eluyendo con hexano–AcOEt (90:10 v/v) obteniendo los compuestos puros **31** (50 mg, 0.15 mmol, 27.2%), **32** (60 mg, 0.18 mmol, 32.7%), **33** (40 mg, 0.12 mmol, 21.8%) y **34** (19 mg, 0.056 mmol, 10.2%).

(-)-(1R,2S,7R,8R,3E,11E)-2,8-oxa-cembra-7,18-diol 31. Aceite incoloro; $[a]_D^{25} -3.3$ (c 0.13, CHCl_3); IR (CH_2Cl_2) ν_{max} 3069, 1739, 1232, 736 cm^{-1} ; RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz), δ 1.99 (m, 1H, H-1), 4.51 (dd, $J = 8.7, 4.4$ Hz, 1H, H-2), 5.40 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H-3), 1.85 (m, 1H, H-5a), 1.69 (m, 1H, H-5b), 1.48 (m, 2H, H-6), 3.36 (dd, $J = 10.1, 2.1$ Hz, 1H, H-7), 2.13 (m, 1H, H-9a), 1.77 (m, 1H, H-9b), 2.28 (m, 1H, H-10a), 1.52 (m, 1H, H-10b), 5.25 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H, H-11), 1.34 (m, 1H, H-13a), 1.29 (m, 1H, H-13b), 1.34 (m, 1H, H-14a), 1.27 (m, 1H, H-14b), 1.77 (s, 3H, H-16), 4.91 (br s, 1H, H-17a), 4.75 (br s, 1H, H-17b), 4.07 (d, $J = 13.4$ Hz, 1H, H-18a), 4.02 (d, $J = 13.4$ Hz, 1H, H-18b), 1.58 (s, 3H, H-19), 1.29 (s, 3H, H-20); RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz), δ 49.3 (d, C-1), 67.4 (d, C-2), 128.5 (d, C-3), 140.8 (s, C-4), 27.6 (t, C-5), 30.8 (t, C-6), 76.8 (d, C-7), 79.8 (s, C-8), 36.0 (t, C-9), 26.0 (t, C-10), 125.9 (d, C-11), 135.6 (s, C-12), 34.2 (t, C-13), 22.5 (t, C-14), 146.2 (s, C-15), 23.4 (q, C-16), 113.2 (t, C-17), 66.3 (t, C-18), 15.3 (q, C-19), 19.4 (q, C-20); HRESIMS m/z 359.2238 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (Calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_4\text{Na}$, 359.2198).

(-)-(1R,2S,7R,8R,3E,11E)-7,8-dihidroxi-asperdiol 32. Aceite incoloro; $[a]_D^{25} -15.5$ (c 0.10, CHCl_3); IR (CH_2Cl_2) ν_{max} 3069, 1739, 1232, 736 cm^{-1} ; RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz), δ 1.99 (m, 1H, H-1), 4.52 (dd, $J = 8.6, 3.2$ Hz, 1H, H-2), 5.38 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, H-3), 2.15 (m, 1H, H-5a), 1.56 (m, 1H, H-5b), 1.64 (m, 1H, H-6a), 1.50 (m, 1H, H-6b), 3.39 (d, $J = 10.5$ Hz, 1H, H-7), 1.76 (m, 1H, H-9a), 1.53 (m, 1H, H-9b), 2.34 (m, 1H, H-10a), 2.29 (m, 1H, H-10b), 5.22 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H, H-11), 2.15 (m, 1H, H-13a), 2.04 (m, 1H, H-13b), 2.00 (m, 1H, H-14a), 1.52 (m, 1H, H-14b), 1.76 (s, 3H, H-16), 4.90 (br s, 1H, H-17a), 4.73 (br s, 1H, H-17b), 4.09 (d, $J = 13.1$ Hz, 1H, H-18a), 3.97 (d, $J = 13.1$ Hz, 1H, H-18b), 1.31 (s, 3H, H-19), 1.57 (s, 3H, H-20); RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz), δ 49.3 (d, C-1), 67.1 (d, C-2), 129.4 (d, C-3), 140.1 (s, C-4), 25.5 (t, C-5), 30.4 (t, C-6), 76.2 (d, C-7), 76.0 (s, C-8), 39.6 (t, C-9), 22.9 (t, C-10), 125.7 (d, C-11), 135.6 (s, C-12), 36.0 (t, C-13), 27.4 (t, C-14), 146.2 (s, C-15), 23.7 (q, C-16), 113.0 (t, C-17), 66.4 (t, C-18), 25.1 (q, C-19), 15.1 (q, C-20); HRESIMS m/z 361.2351 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (Calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}_4\text{Na}$, 361.2354).

(+)-(1R,2S,7R,8R,3E,11E)-7,18-oxa-cembra-2,8-diol 33. Aceite incoloro; $[a]_D^{25} +6.0$ (c 0.12, CHCl₃); IR (CH₂Cl₂) ν_{\max} 3069, 1739, 1232, 736 cm⁻¹; RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz), δ 1.97 (m, 1H, H-1), 4.19 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H, H-2), 5.28 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, H-3), 2.54 (dd, *J* = 11.0, 9.4 Hz, 1H, H-5a), 2.20 (m, 1H, H-5b), 1.99 (m, 1H, H-6a), 1.74 (m, 1H, H-6b), 3.44 (dd, *J* = 11.6, 3.5 Hz, 1H, H-7), 1.57 (m, 2H, H-9), 2.10 (m, 1H, H-10a), 1.64 (m, 1H, H-10b), 5.16 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H-11), 1.99 (m, 1H, H-13a), 1.74 (m, 1H, H-13b), 1.34 (m, 1H, H-14a), 1.24 (m, 1H, H-14b), 1.76 (s, 3H, H-16), 4.97 (br s, 1H, H-17a), 4.90 (br s, 1H, H-17b), 4.46 (d, *J* = 11.4 Hz, 1H, H-18a), 4.13 (d, *J* = 11.8 Hz, 1H, H-18b), 1.24 (s, 3H, H-19), 1.59 (s, 3H, H-20); RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz), δ 55.2 (d, C-1), 69.0 (d, C-2), 127.5 (d, C-3), 138.7 (s, C-4), 22.9 (t, C-5), 23.9 (t, C-6), 77.0 (d, C-7), 74.0 (s, C-8), 36.7 (t, C-9), 23.3 (t, C-10), 123.6 (d, C-11), 136.6 (s, C-12), 38.2 (t, C-13), 30.0 (t, C-14), 144.9 (s, C-15), 18.9 (q, C-16), 114.6 (t, C-17), 74.3 (t, C-18), 24.4 (q, C-19), 15.1 (q, C-20); HRESIMS *m/z* 359.2362 [M+Na]⁺ (Calculado para C₂₀H₃₂O₄Na, 359.2198).

(-)-(1R,2S,7R,8R,3E,11E)-8-cloro-7-hidroxi-asperdiol 34. Aceite incoloro; $[a]_D^{25} -18.3$ (c 0.05, CHCl₃); IR (CH₂Cl₂) ν_{\max} 3069, 1739, 1232, 736 cm⁻¹; RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz), δ 1.99 (m, 1H, H-1), 4.53 (dd, *J* = 8.6, 4.1 Hz, 1H, H-2), 5.43 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H-3), 2.15 (m, 1H, H-5a), 1.56 (m, 1H, H-5b), 1.64 (m, 1H, H-6a), 1.50 (m, 1H, H-6b), 3.39 (d, *J* = 11.3 Hz, 1H, H-7), 1.76 (m, 1H, H-9a), 1.53 (m, 1H, H-9b), 2.34 (m, 1H, H-10a), 2.29 (m, 1H, H-10b), 5.23 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H-11), 2.15 (m, 1H, H-13a), 2.04 (m, 1H, H-13b), 2.00 (m, 1H, H-14a), 1.52 (m, 1H, H-14b), 1.76 (s, 3H, H-16), 4.91 (br s, 1H, H-17a), 4.74 (br s, 1H, H-17b), 4.09 (d, *J* = 13.0 Hz, 1H, H-18a), 4.00 (d, *J* = 13.0 Hz, 1H, H-18b), 1.69 (s, 3H, H-19), 1.58 (s, 3H, H-20); RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz), δ 49.6 (d, C-1), 67.1 (d, C-2), 129.3 (d, C-3), 140.1 (s, C-4), 25.3 (t, C-5), 31.9 (t, C-6), 76.2 (d, C-7), 76.0 (s, C-8), 35.9 (t, C-9), 23.6 (t, C-10), 124.9 (d, C-11), 134.9 (s, C-12), 38.2 (t, C-13), 27.4 (t, C-14), 146.0 (s, C-15), 23.6 (q, C-16), 113.1 (t, C-17), 66.2 (t, C-18), 27.4 (q, C-19), 15.3 (q, C-20); HRESIMS *m/z* 361.1889 [M-H₂O+Na]⁺ (Calculado para C₂₀H₃₁O₂ClNa, 361.1910).

3.2.6. Reacción de acetato de asperdiol (16) con P₂O₅³

Una mezcla del compuesto **16** (120 mg, 0.33 mmol) y P₂O₅ (42 mg, 0.35 mmol) en CH₂Cl₂ seco (5 mL) fue puesta en reflujo durante 3.5 h. Posteriormente, la mezcla de reacción fue finalizada mediante la adición de NaHCO₃ (10 mL) saturado, luego extraída con CH₂Cl₂ (3x5 mL), concentrada y los productos purificados mediante CLAE en fase reversa, eluyendo con MeOH-H₂O (80:20 v/v) obteniendo los compuestos **35** (43.4 mg, 0.12 mmol, 34%) y **36** (27.1 mg, 0.075 mmol, 23%) como aceites incoloros puros.

(-)-(1R,2S,3E,11E)-18-acetoxicembra-2-hidroxi-3,11,15(17)-trien-8-al 35. Aceite incoloro; $[a]_D^{25} -6.3$ (c 0.12, CHCl₃); IR (CH₂Cl₂) ν_{\max} 3457, 1730, 1372, 1235, 737 cm⁻¹; RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz), δ 1.82 (m, 1H, H-1), 4.61 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-2), 5.41 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H-3), 1.81 (m, 1H, H-5a), 1.46 (m, 1H, H-5b), 1.83 (m, 1H, H-6a), 1.63 (m, 1H, H-6b), 9.37 (s, 1H, H-7), 1.25 (m, 2H, H-9), 2.33 (m, 1H, H-10a), 2.12 (m, 1H, H-10b), 5.36 (d, *J* = 10.3 Hz, 1H, H-11), 2.23 (m, 1H, H-13a), 2.16 (m, 1H, H-13b), 1.60 (m, 1H, H-14a), 1.46 (m, 1H, H-14b), 1.75 (s, 3H, H-16), 4.89 (br s, 1 H, H-17a), 4.72 (br s, 1H, H-17b), 4.54 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H, H-18a), 4.42 (d, *J* = 12.9 Hz, 1H, H-18b), 1.05 (s, 3H, H-19), 1.63 (s, 3H, H-20), 2.06 (s, 3H, H-22); RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz), δ 49.6 (d, C-1), 65.9 (d, C-2), 132.7 (d, C-3), 133.7 (s, C-4), 24.6 (t, C-5), 26.3 (t, C-6), 206.0 (d, C-7), 49.4 (s, C-8), 28.9 (t, C-9), 22.1 (t, C-10), 128.5 (d, C-11), 133.3 (s, C-12), 36.5 (t, C-13), 32.8 (t, C-14), 146.2 (s, C-15), 24.7 (q, C-16), 112.7 (t, C-17), 67.2 (t, C-18), 21.5 (q, C-19), 14.2 (q, C-20), 170.7 (s, C-21), 20.9 (q, C-22); HRESIMS *m/z* [M+Na]⁺ 385.2295 (Calculado para C₂₂H₃₄O₄Na, 385.2354).

(+)-(1R,2S,3E,11E)-18-acetoxicembra-7-ceto-3,11,15(17)-trien-2-ol 36. Aceite incoloro; $[a]_D^{25} +5.3$ (c 0.17, CHCl₃); IR (CH₂Cl₂) ν_{\max} 3457, 1730, 1372, 1235, 737 cm⁻¹; RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz), δ 2.09 (m, 1H, H-1), 4.49 (m, 1H, H-2), 5.48 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-3), 2.19 (m, 1H, H-5a), 2.07 (m, 1H, H-5b), 1.67 (m, 2H, H-6), 2.53 (m, 1H, H-8), 2.48 (m, 2H, H-9), 2.38 (m, 1H, H-10a), 2.20 (m, 1H, H-10b), 5.09 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H, H-11), 2.67 (m, 1H, H-13a), 1.99 (m, 1H, H-13b), 1.60 (m, 2H, H-14), 1.76 (s, 3H, H-16), 4.97 (br s, 1 H, H-17a), 4.77 (br s, 1H, H-17b), 4.51 (d, *J* = 12.1 Hz, 1H, H-18a), 4.45 (d, *J* = 12.2 Hz, 1H, H-18b), 1.10 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, H-19), 1.59 (s,

3H, H-20), 2.06 (s, 3H, H-22); RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz), δ 50.0 (d, C-1), 69.2 (d, C-2), 133.0 (d, C-3), 136.4 (s, C-4), 25.9 (t, C-5), 27.6 (t, C-6), 213.9 (s, C-7), 45.5 (d, C-8), 39.1 (t, C-9), 23.9 (t, C-10), 125.2 (d, C-11), 134.1 (s, C-12), 35.9 (t, C-13), 34.1 (t, C-14), 145.0 (s, C-15), 23.1 (q, C-16), 114.1 (t, C-17), 67.4 (t, C-18), 16.6 (q, C-19), 15.7 (q, C-20), 170.7 (s, C-21), 21.0 (q, C-22); HRESIMS *m/z* [M+Na]⁺ 385.2301 (Calculado para C₂₂H₃₄O₄Na, 385.2354).

3.2.7. Reacción de acetato de asperdiol (16) con SeO₂³

SeO₂ (3.66 mg, 0.033 mmol) fue adicionado a una mezcla de CH₂Cl₂ seco (5 mL) y ter-butilhidroperóxido (0.063 mL, 0.66 mmol) y la mezcla agitada durante 30 minutos a temperatura ambiente. El compuesto **16** (120 mg, 0.33 mmol) fue adicionado a esta solución y la mezcla de reacción agitada a temperatura ambiente durante 24 h. La mezcla fue luego particionada entre H₂O y AcOEt y las fases orgánicas reunidas, concentradas y purificadas mediante CLAE en fase reversa, usando MeOH–H₂O (50:50 v/v) como eluyente, hasta obtener el compuesto **37** como un aceite incoloro (39 mg, 0.116 mmol, 17.6%).

Acetato de (-)-(1R,2S,7R,8R,13S,3E,11E)-13-hidroxi-asperdiol 37. Aceite incoloro; [α]_D²⁵ -45.0 (c 0.35, CHCl₃); IR (CH₂Cl₂) ν_{max} 3457, 1730, 1372, 1235, 737 cm⁻¹; RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz), δ 2.20 (m, 1H, H-1), 4.54 (m, 1H, H-2), 5.52 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H-3), 1.80 (m, 1H, H-5a), 1.56 (m, 1H, H-5b), 2.25 (m, 1H, H-6a), 1.67 (m, 1H, H-6b), 2.61 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H, H-7), 1.83 (m, 1H, H-9a), 1.76 (m, 1H, H-9b), 2.30 (m, 1H, H-10a), 2.10 (m, 1H, H-10b), 5.36 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H, H-11), 4.03 (dd, *J* = 7.3, 4.4 Hz, 1H, H-13), 1.52 (m, 2H, H-14), 1.78 (s, 3H, H-16), 4.94 (br s, 1H, H-17a), 4.76 (br s, 1H, H-17b), 4.52 (m, 1H, H-18a), 4.49 (m, 1H, H-18b), 1.26 (s, 3H, H-19), 1.65 (s, 3H, H-20), 2.07 (s, 3H, H-22); RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz), δ 49.0 (d, C-1), 69.9 (d, C-2), 132.0 (d, C-3), 137.1 (s, C-4), 25.5 (t, C-5), 25.6 (t, C-6), 63.3 (d, C-7), 61.0 (s, C-8), 35.9 (t, C-9), 23.0 (t, C-10), 126.2 (d, C-11), 134.3 (s, C-12), 76.5 (d, C-13), 36.7 (t, C-14), 145.4 (s, C-15), 22.2 (q, C-16), 114.0 (t, C-17), 67.0 (t, C-18), 17.4 (q, C-19), 11.8 (q, C-20), 170.6 (s, C-21), 21.0 (q, C-22); HRESIMS *m/z* [M+Na]⁺ 401.2298 (Calculado para C₂₂H₃₄O₅Na, 401.2303).

3.2.8. Reacción del acetato de asperdiol (16) con ácido *m*-cloroperbenzoico³

Una mezcla del compuesto **16** (120 mg, 0.33 mmol) con *m*-CPBA (177 mg, 1.02 mmol) en CH₂Cl₂ (5 mL) fue vigorosamente agitada a temperatura ambiente durante 2 h y posteriormente concentrada para obtener un residuo, el cual fue sometido a cromatografía en columna sobre sílica gel y eluido con (hexano–AcOEt 50:50 v/v) obteniendo el tetraepóxido **38** (77 mg, 0.19 mmol, 56.9%) como un aceite incoloro.

Acetato de (-)-(1S,2R,7R,8R,15R)-3,4-11,12-15,17-triepoxi-asperdiol 38. Aceite incoloro; [α]_D²⁵ -1.5 (c 0.55, CHCl₃); IR (CH₂Cl₂) ν_{max} 3457, 1730, 1372, 1235, 737 cm⁻¹; RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz), δ 1.65 (m, 1H, H-1), 3.70 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-2), 3.08 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-3), 2.09 (m, 1H, H-5a), 2.02 (m, 1H, H-5b), 1.50 (m, 1H, H-6a), 1.39 (m, 1H, H-6b), 2.75 (dd, *J* = 7.9, 3.4 Hz, 1H, H-7), 2.00 (m, 1H, H-9a), 1.37 (m, 1H, H-9b), 1.65 (m, 2H, H-10), 2.66 (m, 1H, H-11), 2.08 (m, 1H, H-13a), 1.42 (m, 1H, H-13b), 1.95 (m, 1H, H-14a), 1.39 (m, 1H, H-14b), 1.34 (s, 3H, H-16), 2.60 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H, H-17a), 2.47 (d, *J* = 4.7 Hz, 1H, H-17b), 4.40 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H, H-18a), 3.89 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H, H-18b), 1.30 (s, 3H, H-19), 1.25 (s, 3H, H-20), 2.10 (s, 3H, H-22); RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz), δ 46.6 (d, C-1), 72.1 (d, C-2), 64.0 (d, C-3), 57.2 (s, C-4), 24.9 (t, C-5), 26.6 (t, C-6), 61.9 (d, C-7), 59.6 (s, C-8), 35.3 (t, C-9), 24.3 (t, C-10), 64.4 (d, C-11), 62.6 (s, C-12), 35.0 (t, C-13), 25.4 (t, C-14), 61.0 (s, C-15), 16.8 (q, C-16), 53.6 (t, C-17), 66.1 (t, C-18), 17.3 (q, C-19), 17.7 (q, C-20), 170.6 (s, C-21), 20.8 (q, C-22); HRESIMS *m/z* [M+Na]⁺ 433.2197 (Calculado para C₂₂H₃₄O₇Na, 433.2202).

3.2.9. Reacción del asperdiol (15) con PCC³

El compuesto **15** (100 mg, 0.31 mmol) fue tratado con PCC (120 mg) en CH₂Cl₂ seco (3 mL) durante 2 h y bajo agitación a temperatura ambiente. La reacción fue finalizada mediante la adición de H₂O (3 mL), extraída con CH₂Cl₂ y concentrada a sequedad. El residuo fue purificado por cromatografía en columna

(benceno–AcOEt 9:1 v/v), hasta obtener los compuestos puros **39** (22 mg, 0.07 mmol, 22.5%) y **40** (35 mg, 0.12 mmol, 38.7%) como aceites incoloros.

(-)-1R,2S,7R,8R-18-ceto-asperdiol 39. Aceite incoloro; $[a]_D^{25}$ -4.0 (c 0.73, CHCl₃); IR (CH₂Cl₂) ν_{\max} 3069, 1739, 1232, 736 cm⁻¹; RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz), δ 2.28 (m, 1H, H-1), 4.72 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H, H-2), 6.43 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-3), 1.98 (m, 1H, H-5a), 1.35 (m, 1H, H-5b), 2.24 (m, 2H, H-6), 2.61 (m, 1H, H-7), 1.86 (m, 1H, H-9a), 1.56 (m, 1H, H-9b), 2.19 (m, 1H, H-10a), 2.10 (m, 1H, H-10b), 5.16 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H, H-11), 1.86 (m, 1H, H-13a), 1.58 (m, 1H, H-13b), 2.61 (m, 1H, H-14a), 2.26 (m, 1H, H-14b), 1.80 (s, 3H, H-16), 5.02 (br s, 1 H, H-17a), 4.81 (br s, 1H, H-17b), 9.42 (s, 1H, H-18), 1.20 (s, 3H, H-19), 1.65 (s, 3H, H-20); RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz), δ 50.2 (d, C-1), 69.3 (d, C-2), 155.2 (d, C-3), 141.9 (s, C-4), 37.3 (t, C-5), 24.0 (t, C-6), 64.5 (d, C-7), 60.3 (s, C-8), 26.6 (t, C-9), 36.2 (t, C-10), 125.3 (d, C-11), 135.1 (s, C-12), 27.8 (t, C-13), 22.1 (t, C-14), 144.7 (s, C-15), 22.2 (q, C-16), 115.0 (t, C-17), 194.7 (d, C-18), 16.8 (q, C-19), 16.0 (q, C-20); HRESIMS *m/z* 341.2073 [M+Na]⁺ (Calculado para C₂₀H₃₀O₃Na, 341.2087).

(-)-1R,7R,8R-2,18-diceto-asperdiol 40. Aceite incoloro; $[a]_D^{25}$ -65,9 (c 0.20, CHCl₃); IR (CH₂Cl₂) ν_{\max} 3069, 1739, 1232, 736 cm⁻¹; RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz), δ 2.67 (dd, *J* = 9.9, 3.0 Hz, 1H, H-1), 6.80 (s, 1H, H-3), 1.75 (m, 1H, H-5a), 1.62 (m, 1H, H-5b), 2.26 (m, 1H, H-6a), 1.98 (m, 1H, H-6b), 3.20 (dd, *J* = 10.0, 2.8 Hz, 1H, H-7), 2.26 (m, 1H, H-9a), 1.71 (m, 1H, H-9b), 2.00 (m, 1H, H-10a), 1.84 (m, 1H, H-10b), 4.95 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H, H-11), 3.38 (ddd, *J* = 13.9, 11.5, 5.2 Hz, 1H, H-13a), 2.57 (ddd, *J* = 13.4, 10.9, 5.1 Hz, 1H, H-13b), 2.17 (m, 1H, H-14a), 1.64 (m, 1H, H-14b), 1.70 (s, 3H, H-16), 4.98 (br s, 1 H, H-17a), 4.89 (br s, 1H, H-17b), 9.45 (s, 1H, H-18), 1.57 (s, 3H, H-19), 1.05 (s, 3H, H-20); RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz), δ 60.8 (d, C-1), 199.9 (s, C-2), 141.3 (d, C-3), 143.0 (s, C-4), 36.6 (t, C-5), 38.0 (t, C-6), 61.0 (d, C-7), 60.5 (s, C-8), 25.9 (t, C-9), 21.5 (t, C-10), 127.2 (d, C-11), 134.3 (s, C-12), 21.1 (t, C-13), 26.2 (t, C-14), 149.9 (s, C-15), 20.4 (q, C-16), 115.5 (t, C-17), 195.0 (d, C-18), 15.3 (q, C-19), 18.1 (q, C-20); HRESIMS *m/z* 339.1921 [M+Na]⁺ (Calculado para C₂₀H₂₈O₃Na, 339.1931).

3.2.10. Reacción del acetato de asperdiol (16) con iodo³

Una solución de iodo (25 mg, 0.20 mmol) en CDCl₃ (2.0 mL) fue adicionada gota a gota (45 minutos) a una solución magnéticamente agitada de **16** (120 mg, 0.33 mmol) en CDCl₃ (4.0 mL). La mezcla fue agitada a 25°C durante 30 minutos y concentrada, el aceite resultante fue purificado sobre sílica gel, eluyendo con hexano–AcOEt (80:20 v/v) para obtener los compuestos puros **41** (22 mg, 0.045 mmol, 13.6%) y **42** (18 mg, 0.037 mmol, 11.1%) como aceites incoloros, el material de partida **16** y una mezcla que no se estudió de compuestos de mayor polaridad.

(-)-(1R,2S,7R,8S,3E,11E)-18-acetoxicembra-2,8-oxa-3,11,15(17)-trien-7-ol 41. Aceite incoloro; $[a]_D^{25}$ -26.7 (c 0.16, CHCl₃); IR (CH₂Cl₂) ν_{\max} 3457, 1730, 1372, 1235, 737 cm⁻¹; RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz), δ 2.03 (m, 1H, H-1), 4.53 (dd, *J* = 8.8, 3.9 Hz, 1H, H-2), 5.46 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H-3), 2.22 (m, 1H, H-5a), 1.80 (m, 1H, H-5b), 1.60 (m, 2H, H-6), 3.39 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-7), 1.79 (m, 1H, H-9a), 1.62 (m, 1H, H-9b), 2.37 (m, 1H, H-10a), 1.87 (m, 1H, H-10b), 5.23 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-11), 1.84 (m, 1H, H-13a), 1.77 (m, 1H, H-13b), 2.06 (m, 1H, H-14a), 1.62 (m, 1H, H-14b), 1.77 (s, 3H, H-16), 4.94 (br s, 1 H, H-17a), 4.75 (br s, 1H, H-17b), 4.57 (d, *J* = 12.9 Hz, 1H, H-18a), 4.45 (d, *J* = 12.9 Hz, 1H, H-18b), 1.59 (s, 3H, H-19), 1.34 (s, 3H, H-20), 2.08 (s, 3H, H-22); RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz), δ 49.3 (d, C-1), 67.1 (d, C-2), 133.7 (d, C-3), 135.7 (s, C-4), 26.1 (t, C-5), 27.5 (t, C-6), 76.0 (d, C-7), 75.8 (s, C-8), 39.9 (t, C-9), 23.0 (t, C-10), 125.9 (d, C-11), 135.4 (s, C-12), 35.9 (t, C-13), 30.6 (t, C-14), 146.0 (s, C-15), 23.7 (q, C-16), 113.3 (t, C-17), 67.4 (t, C-18), 24.9 (q, C-19), 15.1 (q, C-20), 171.0 (s, C-21), 21.0 (q, C-22); HRESIMS *m/z* [M+Na]⁺ 385.2333 (Calculado para C₂₂H₃₄O₄Na, 385.2354).

(-)-(1R,2S,7S,8R,11R,12R,3E)-18-acetoxicembra-7,12-diiodo-8,11-oxa-3,15(17)-dien-2-ol 42. Aceite incoloro; $[a]_D^{25}$ -7.4 (c 0.34, CHCl₃); IR (CH₂Cl₂) ν_{\max} 3457, 1730, 1372, 1235, 737 cm⁻¹; RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz), δ 2.02 (m, 1H, H-1), 4.50 (dd, *J* = 7.5, 3.6 Hz, 1H, H-2), 5.43 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, H-3), 1.57 (m, 2H, H-5), 2.74 (dt, *J* = 15.0, 4.6 Hz, 1H, H-6a), 1.76 (m, 1H, H-6b), 4.12 (dd, *J* = 9.4, 2.5 Hz, 1H, H-7), 1.69 (m, 1H, H-9a), 1.64 (m, 1H, H-9b), 2.23 (m, 1H, H-10a), 1.54 (m, 1H, H-10b), 3.37 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H, H-11), 2.25 (m, 2H, H-13), 1.78 (m,

2H, H-14), 1.76 (s, 3H, H-16), 4.96 (br s, 1 H, H-17a), 4.87 (br s, 1H, H-17b), 4.68 (d, $J = 13.5$ Hz, 1H, H-18a), 4.45 (d, $J = 13.5$ Hz, 1H, H-18b), 1.12 (s, 3H, H-19), 1.40 (s, 3H, H-20), 2.12 (s, 3H, H-22); RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz), δ 51.8 (d, C-1), 68.7 (d, C-2), 131.6 (d, C-3), 133.8 (s, C-4), 25.4 (t, C-5), 24.4 (t, C-6), 39.0 (d, C-7), 78.9 (s, C-8), 47.2 (t, C-9), 33.3 (t, C-10), 74.8 (d, C-11), 49.6 (s, C-12), 33.7 (t, C-13), 34.8 (t, C-14), 144.5 (s, C-15), 20.0 (q, C-16), 113.1 (t, C-17), 65.7 (t, C-18), 20.6 (q, C-19), 26.3 (q, C-20), 170.0 (s, C-21), 21.1 (q, C-22); HRESIMS m/z $[\text{M}^{\cdot+} + \text{K}]^+$ 529.1411 (Calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{35}\text{O}_4\text{K}$, 529.1217).

3.2.11. Fotólisis del acetato de asperdiol (16)³

Una solución del compuesto **16** (70 mg, 0.19 mmol) en isopropanol (3 mL) bajo agitación, fue dispuesta en un tubo pequeño Pyrex, el cual fue irradiado (254 nm; 50 W) durante 12 h a 25°C. Posteriormente se eliminó el solvente y el aceite resultante fue purificado mediante cromatografía en columna sobre sílica gel usando hexano–AcOEt (80:20 v/v) como fase móvil, logrando obtener los compuestos puros **43** (40 mg, 0.12 mmol, 62.6%) y **15** (10 mg, 0.033 mmol, 17.4%).

(+)-(1R,2S,7R,11R,12R,3E)-7,11-oxacembra-3,8(19),15(17)-trien-2,12,18-triol 43. Aceite incoloro; $[\alpha]_D^{25} +42.2$ (c 0.69, CHCl_3); IR (CH_2Cl_2) ν_{max} 3457, 1730, 1372, 1235, 737 cm^{-1} ; RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz), δ 2.22 (m, 1H, H-1), 4.48 (t, $J = 8.7$ Hz, 1H, H-2), 5.34 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H, H-3), 2.43 (m, 1H, H-5a), 2.25 (m, 1H, H-5b), 1.83 (m, 1H, H-6a), 1.70 (m, 1H, H-6b), 3.50 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H, H-7), 2.31 (m, 1H, H-9a), 2.21 (m, 1H, H-9b), 1.86 (m, 1H, H-10a), 1.79 (m, 1H, H-10b), 4.42 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H, H-11), 2.31 (m, 2H, H-13), 1.87 (m, 1H, H-14a), 1.70 (m, 1H, H-14b), 1.80 (s, 3H, H-16), 5.09 (br s, 1 H, H-17a), 4.87 (br s, 1H, H-17b), 4.10 (d, $J = 14.6$ Hz, 1H, H-18a), 4.06 (d, $J = 14.0$ Hz, 1H, H-18b), 5.05 (br s, 1H, H-19a), 4.90 (br s, 1H, H-19b), 1.19 (s, 3H, H-20); RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz), δ 52.3 (d, C-1), 67.8 (d, C-2), 125.7 (d, C-3), 144.2 (s, C-4), 26.7 (t, C-5), 26.8 (t, C-6), 84.5 (d, C-7), 145.2 (s, C-8), 29.7 (t, C-9), 31.3 (t, C-10), 80.1 (d, C-11), 84.7 (s, C-12), 36.4 (t, C-13), 29.8 (t, C-14), 145.2 (s, C-15), 22.1 (q, C-16), 114.0 (t, C-17), 66.8 (t, C-18), 115.4 (t, C-19), 20.4 (q, C-20); HRESIMS m/z $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 359.2189 (Calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_4\text{Na}$, 359.2193).

3.2.12. Reacción del asperdiol (15) con MeOTf³

El compuesto **15** (60 mg, 0.19 mmol) fue disuelto en CH_2Cl_2 seco (1 mL), posteriormente trietilamina (320 μL) y triflato de metilo (150 μL) fueron adicionados. La mezcla de reacción fue agitada a temperatura ambiente durante toda la noche y posteriormente se trató con una solución de NaHCO_3 saturada. La fase orgánica fue secada y concentrada sobre Na_2SO_4 y los productos resultantes fueron purificados mediante CLAE en fase reversa (MeOH– H_2O 70:30) para producir el asperdiol O-metilado **44** (35.0 mg, 0.10 mmol, 52.6%).

(+)-(1R,2S,3E,11E)-7-cetocembra-18-metoxi-2-ol 44. Aceite incoloro; $[\alpha]_D^{25} +8.3$ (c 0.15, CHCl_3); IR (CH_2Cl_2) ν_{max} 3069, 1739, 1232, 736 cm^{-1} ; RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz), δ 2.06 (m, 1H, H-1), 2.94 (dt, $J = 13.2, 4.9$ Hz, 1H, H-2), 4.97 (d, $J = 11.3$ Hz, 1H, H-3), 2.22 (m, 1H, H-5a), 1.99 (m, 1H, H-5b), 2.13 (m, 1H, H-6a), 1.94 (m, 1H, H-6b), 2.11 (m, 1H, H-8), 2.43 (dt, $J = 13.2, 5.4$ Hz, 1H, H-9a), 1.69 (m, 1H, H-9b), 1.98 (m, 2H, H-10), 3.26 (m, 1H, H-11), 2.18 (m, 1H, H-13a), 1.98 (m, 1H, H-13b), 2.68 (ddd, $J = 13.1, 5.1, 3.3$ Hz, 1H, H-14a), 1.70 (m, 1H, H-14b), 1.62 (s, 3H, H-16), 4.63 (m, 2H, H-17), 4.23 (d, $J = 12.3$ Hz, 1H, H-18a), 3.53 (d, $J = 12.4$ Hz, 1H, H-18b), 1.01 (d, $J = 7.6$ Hz, 3H, H-19), 1.62 (s, 3H, H-20), 3.16 (s, 3H, H-21); RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz), δ 44.1 (d, C-1), 49.4 (d, C-2), 134.0 (d, C-3), 131.8 (s, C-4), 33.3 (t, C-5), 38.9 (t, C-6), 216.0 (s, C-7), 40.8 (d, C-8), 32.6 (t, C-9), 28.6 (t, C-10), 134.0 (d, C-11), 128.6 (s, C-12), 26.7 (t, C-13), 22.8 (t, C-14), 149.0 (s, C-15), 19.5 (q, C-16), 110.5 (t, C-17), 75.0 (t, C-18), 19.5 (q, C-19), 19.5 (q, C-20), 56.7 (q, C-21); HRESIMS m/z $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (Calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{O}_2\text{Na}$, 339.2300).

3.2.13. Reacción de 8S-plexaurolona (1), 8S-dihidroplexaurolona (3) y 8R-dihidroplexaurolona (4) con ácido acético³

8S-plexaurolona (**1**) (100 mg, 0.31 mmol), 8S-dihidroplexaurolona (**3**) (100 mg, 0.31 mmol) y 8R-dihidroplexaurolona (**4**) (20 mg, 0.06 mmol) fueron cada uno tratados por separado con anhídrido acético (1.0 mL) en piridina seca (2.0 mL para **1** y **3**, y 0.5 mL para **4**) durante 8 h bajo agitación a temperatura ambiente. Los productos fueron purificados por cromatografía en columna sobre sílica gel, usando hexano–AcOEt (90:11 v/v) como eluyente, para obtener el compuesto acetilado **45** (110 mg, 0.30 mmol, 96.8%) y los compuestos diacetilados **46** (126 mg, 0.31 mmol, 97.6%) y **47** (24 mg, 0.06 mmol, 98%), respectivamente.

(-)-1R,3R,4R,8S,12R-3-acetoxi-plexaurolona 45. Cristales blancos; $[a]_D^{25}$ -7.7 (c 0.37, CHCl₃); IR (KBr), ν_{\max} 3425, 1710, 1636, 891 cm⁻¹; RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz), δ 1.99 (m, 1H, H-1), 1.55 (m, 1H, H-2a), 1.39 (m, 1H, H-2a), 4.62 (ddd, J = 8.6, 6.3, 2.3 Hz, 1H, H-3), 2.12 (m, 1H, H-4), 2.50 (m, 1H, H-5a), 2.38 (m, 1H, H-5b), 2.50 (m, 1H, H-7a), 2.04 (m, 1H, H-7b), 2.15 (m, 1H, H-8), 1.58 (m, 1H, H-9a), 1.24 (m, 1H, H-9b), 2.42 (m, 1H, H-10a), 2.09 (m, 1H, H-10b), 2.45 (m, 1H, H-12), 1.48 (m, 1H, H-13a), 1.41 (m, 1H, H-13b), 1.65 (m, 1H, H-14a), 1.13 (m, 1H, H-14b), 1.59 (s, 3H, H-16), 4.67 (br s, 1H, H-17a), 4.62 (br s, 1H, H-17b), 0.91 (d, J = 6.8 Hz, 3H, H-18), 0.96 (d, J = 6.7 Hz, 3H, H-19), 1.00 (d, J = 6.9 Hz, 3H, H-20), 2.00 (s, 3H, H-22); RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz), δ 44.3 (d, C-1), 37.8 (t, C-2), 75.7 (d, C-3), 37.5 (d, C-4), 47.6 (t, C-5), 210.4 (s, C-6), 48.4 (t, C-7), 29.0 (d, C-8), 29.5 (t, C-9), 35.3 (t, C-10), 215.0 (s, C-11), 47.1 (d, C-12), 31.8 (t, C-13), 30.4 (t, C-14), 147.5 (s, C-15), 20.8 (q, C-16), 110.5 (t, C-17), 13.9 (q, C-18), 19.6 (q, C-19), 16.8 (q, C-20), 170.9 (s, C-21), 20.9 (q, C-22); HRESIMS m/z 387.2508 [M+Na]⁺ (Calculado para C₂₂H₃₆O₄Na, 387.2506).

(+)-1R,3R,4R,8S,11R,12R-3,11-diacetoxi-dihidroplexaurolona 46. Cristales blancos; $[a]_D^{25}$ +19.8 (c 0.12, CHCl₃); IR (KBr), ν_{\max} 3425, 1710, 1636, 891 cm⁻¹; RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz), δ 1.89 (m, 1H, H-1), 1.64 (m, 1H, H-2a), 1.40 (m, 1H, H-2a), 4.67 (dd, J = 8.7, 4.1 Hz, 1H, H-3), 1.62 (m, 1H, H-4), 1.89 (m, 1H, H-5a), 1.45 (m, 1H, H-5b), 2.50 (m, 1H, H-7a), 2.23 (m, 1H, H-7b), 1.90 (m, 1H, H-8), 1.45 (m, 1H, H-9a), 1.18 (m, 1H, H-9b), 1.71 (m, 1H, H-10a), 1.46 (m, 1H, H-10b), 4.73 (dd, J = 9.8, 4.8 Hz, 1H, H-11), 2.32 (m, 1H, H-12), 2.63 (m, 1H, H-13a), 2.14 (m, 1H, H-13b), 1.71 (m, 1H, H-14a), 1.45 (m, 1H, H-14b), 1.64 (s, 3H, H-16), 4.63 (br s, 1H, H-17a), 4.58 (br s, 1H, H-17b), 0.80 (d, J = 6.5 Hz, 3H, H-18), 1.00 (d, J = 6.7 Hz, 3H, H-19), 0.88 (d, J = 7.1 Hz, 3H, H-20), 2.01 (s, 3H, H-22), 1.99 (s, 3H, H-24); RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz), δ 43.6 (d, C-1), 36.0 (t, C-2), 76.0 (d, C-3), 35.3 (d, C-4), 49.7 (t, C-5), 209.7 (s, C-6), 47.3 (t, C-7), 33.7 (d, C-8), 30.3 (t, C-9), 29.2 (t, C-10), 77.2 (d, C-11), 29.9 (d, C-12), 28.7 (t, C-13), 28.2 (t, C-14), 148.8 (s, C-15), 21.1 (q, C-16), 109.4 (t, C-17), 15.6 (q, C-18), 20.2 (q, C-19), 16.1 (q, C-20), 171.0 (s, C-21), 20.9 (q, C-22), 170.7 (s, C-23), 20.8 (q, C-24); HRESIMS m/z 431.2773 [M+Na]⁺ (Calculado para C₂₄H₄₀O₅Na, 431.2768).

(-)-1R,3R,4R,8R,11R,12R-3,11-diacetoxi-dihidroplexaurolona 47. Cristales blancos; $[a]_D^{25}$ -11.4 (c 0.58, CHCl₃); IR (KBr), ν_{\max} 3425, 1710, 1636, 891 cm⁻¹; RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz), δ 1.90 (m, 1H, H-1), 1.64 (m, 1H, H-2a), 1.40 (m, 1H, H-2a), 4.66 (dd, J = 8.7, 4.1 Hz, 1H, H-3), 1.62 (m, 1H, H-4), 1.86 (m, 1H, H-5a), 1.47 (m, 1H, H-5b), 2.44 (m, 1H, H-7a), 2.16 (m, 1H, H-7b), 1.97 (m, 1H, H-8), 1.45 (m, 1H, H-9a), 1.18 (m, 1H, H-9b), 1.71 (m, 1H, H-10a), 1.46 (m, 1H, H-10b), 4.72 (dd, J = 8.7, 5.1 Hz, 1H, H-11), 2.32 (m, 1H, H-12), 2.63 (m, 1H, H-13a), 2.14 (m, 1H, H-13b), 1.71 (m, 1H, H-14a), 1.45 (m, 1H, H-14b), 1.64 (s, 3H, H-16), 4.63 (br s, 1H, H-17a), 4.58 (br s, 1H, H-17b), 0.80 (d, J = 6.6 Hz, 3H, H-18), 1.00 (d, J = 6.7 Hz, 3H, H-19), 0.87 (d, J = 7.1 Hz, 3H, H-20), 2.00 (s, 3H, H-22), 1.98 (s, 3H, H-24); RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz), δ 43.7 (d, C-1), 36.1 (t, C-2), 76.0 (d, C-3), 35.4 (d, C-4), 49.8 (t, C-5), 209.7 (s, C-6), 47.4 (t, C-7), 33.8 (d, C-8), 30.4 (t, C-9), 29.3 (t, C-10), 77.2 (d, C-11), 30.0 (d, C-12), 28.8 (t, C-13), 28.3 (t, C-14), 148.8 (s, C-15), 21.2 (q, C-16), 109.4 (t, C-17), 15.7 (q, C-18), 20.2 (q, C-19), 16.1 (q, C-20), 171.0 (s, C-21), 21.0 (q, C-22), 170.7 (s, C-23), 20.9 (q, C-22); HRESIMS m/z 431.2768 [M+Na]⁺ (Calculado para C₂₄H₄₀O₅Na, 431.2768).

3.2.14. Reacción de 8S-plexaurolona (**1**) con CH₂Cl₂ acidificado³

El compuesto **1** (50 mg, 0.15 mmol) fue disuelto en CH₂Cl₂ acidificado (a 3 mL de CH₂Cl₂ se le adicionaron 100 μ L de ácido acético) y agitado vigorosamente a temperatura ambiente durante 2 h. Posteriormente fue tratado con NaHCO₃, saturado y luego extraído con CHCl₃ (3 x 5 mL). Las fases orgánicas fueron secadas

sobre Na₂SO₄ y concentradas obteniéndose un residuo, el cual fue purificado sobre sílica gel (hexano–AcOEt 90:10 v/v) para obtener el compuesto **48** (44 mg, 0.14 mmol, 93.3%) en forma de cristales blancos.

(-)-1R,3R,4R,8S,12R-3,6-oxa-cembra-15(17)-en-11-ceto-6-ol 48. Cristales blancos; $[\alpha]_D^{25}$ -6.6 (c 0.23, CHCl₃); IR (KBr), ν_{\max} 3425, 1710, 1636, 891 cm⁻¹; RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz), δ 2.16 (m, 1H, H-1), 2.12 (m, 1H, H-2a), 1.22 (m, 1H, H-2a), 3.68 (dd, J = 14.1, 7.9 Hz, 1H, H-3), 2.02 (m, 1H, H-4), 2.04 (m, 1H, H-5a), 1.79 (m, 1H, H-5b), 1.65 (m, 1H, H-7a), 1.40 (m, 1H, H-7b), 1.65 (m, 1H, H-8), 1.63 (m, 1H, H-9a), 1.45 (m, 1H, H-9b), 2.45 (m, 1H, H-10a), 2.35 (m, 1H, H-10b), 2.48 (m, 1H, H-12), 1.50 (m, 1H, H-13a), 1.26 (m, 1H, H-13b), 1.47 (m, 1H, H-14a), 1.16 (m, 1H, H-14b), 1.63 (s, 3H, H-16), 4.73 (br s, 1H, H-17a), 4.66 (br s, 1H, H-17b), 0.94 (d, J = 6.8 Hz, 3H, H-18), 0.98 (d, J = 6.8 Hz, 3H, H-19), 1.01 (d, J = 6.8 Hz, 3H, H-20); RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz), δ 44.1 (d, C-1), 32.1 (t, C-2), 75.7 (d, C-3), 43.7 (d, C-4), 47.6 (t, C-5), 110.8 (s, C-6), 49.3 (t, C-7), 35.4 (d, C-8), 34.4 (t, C-9), 37.5 (t, C-10), 208.8 (s, C-11), 48.1 (d, C-12), 31.4 (t, C-13), 30.5 (t, C-14), 146.1 (s, C-15), 21.0 (q, C-16), 112.0 (t, C-17), 18.1 (q, C-18), 19.7 (q, C-19), 16.2 (q, C-20); HRESIMS m/z 345.2396 [M+Na]⁺ (Calculado para C₂₀H₃₄O₃Na, 345.2400).

3.2.15. Reacción de 8S-dihidroplexaurologona (**3**) con CH₂Cl₂ acidificado³

El compuesto **3** (50 mg, 0.15 mmol) fue tratado de la misma forma a la descrita para el compuesto **1**. Luego de 2 h, la mezcla de reacción fue secada y el producto mayoritario purificado mediante cromatografía en columna sobre sílica gel, eluyendo con hexano–AcOEt (90:10 v/v) para producir **49** (42 mg, 0.13 mmol, 86.6%) en forma de cristales blancos.

(+)-1R,3R,4R,8S,11R,12R-3,6-oxa-cembra-15(17)-en-6,11-diol 49. Cristales blancos; $[\alpha]_D^{25}$ +49.0 (c 0.25, CHCl₃); IR (KBr), ν_{\max} 3433, 1689, 1643, 887 cm⁻¹; RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz), δ 2.08 (m, 1H, H-1), 2.12 (m, 1H, H-2a), 1.22 (m, 1H, H-2a), 3.95 (ddd, J = 12.6, 7.0, 2.4 Hz, 1H, H-3), 2.27 (qt, J = 14.0, 7.1 Hz, 1H, H-4), 2.04 (m, 1H, H-5a), 1.70 (m, 1H, H-5b), 1.80 (m, 1H, H-7a), 1.65 (m, 1H, H-7b), 1.58 (m, 1H, H-8), 1.74 (m, 1H, H-9a), 1.13 (m, 1H, H-9b), 1.57 (m, 1H, H-10a), 1.44 (m, 1H, H-10b), 4.01 (dd, J = 10.5, 4.2 Hz, 1H, H-11), 1.60 (m, 1H, H-12), 1.51 (m, 1H, H-13a), 1.29 (m, 1H, H-13b), 2.47 (td, J = 10.1, 5.3 Hz, 1H, H-14a), 1.31 (m, 1H, H-14b), 1.75 (s, 3H, H-16), 4.88 (br s, 1H, H-17a), 4.83 (br s, 1H, H-17b), 0.94 (d, J = 6.9 Hz, 3H, H-18), 0.88 (d, J = 6.9 Hz, 3H, H-19), 0.83 (d, J = 6.9 Hz, 3H, H-20); RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz), δ 43.5 (d, C-1), 25.4 (t, C-2), 79.0 (d, C-3), 37.4 (d, C-4), 46.5 (t, C-5), 109.7 (s, C-6), 50.7 (t, C-7), 36.3 (d, C-8), 39.2 (t, C-9), 33.1 (t, C-10), 70.4 (d, C-11), 29.1 (d, C-12), 30.4 (t, C-13), 24.1 (t, C-14), 148.5 (s, C-15), 23.3 (q, C-16), 110.4 (t, C-17), 13.6 (q, C-18), 24.5 (q, C-19), 16.0 (q, C-20); HRESIMS m/z 347.2568 [M+Na]⁺ (Calculado para C₂₀H₃₆O₃Na, 347.2562).

3.2.16. Reacción de 8R-dihidroplexaurologona (**4**) con CH₂Cl₂ acidificado³

El compuesto **4** (20 mg, 0.06 mmol) fue tratado de la misma forma como se describió para **1**. Después de 2 h, la mezcla de reacción fue secada y purificada sobre sílica gel, eluyendo con hexano–AcOEt (90:10 v/v) para producir **50** (15 mg, 0.04 mmol, 74.5%).

(+)-1R,3R,4R,8R,11R,12R-3,6-oxa-cembra-15(17)-en-6,11-diol 50. Cristales blancos; $[\alpha]_D^{25}$ +49.0 (c 0.25, CHCl₃); IR (KBr), ν_{\max} 3428, 1687, 1648, 887 cm⁻¹; RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz), δ 2.04 (m, 1H, H-1), 2.10 (m, 1H, H-2a), 1.25 (m, 1H, H-2a), 3.79 (ddd, J = 12.4, 9.6, 2.9 Hz, 1H, H-3), 2.27 (m, 1H, H-4), 2.04 (m, 1H, H-5a), 1.70 (m, 1H, H-5b), 1.75 (m, 1H, H-7a), 1.63 (m, 1H, H-7b), 1.54 (m, 1H, H-8), 1.78 (m, 1H, H-9a), 1.10 (m, 1H, H-9b), 1.53 (m, 1H, H-10a), 1.40 (m, 1H, H-10b), 4.03 (dd, J = 10.4, 4.1 Hz, 1H, H-11), 1.56 (m, 1H, H-12), 1.51 (m, 1H, H-13a), 1.33 (m, 1H, H-13b), 2.38 (m, 1H, H-14a), 1.35 (m, 1H, H-14b), 1.73 (s, 3H, H-16), 4.86 (br s, 1H, H-17a), 4.81 (br s, 1H, H-17b), 0.92 (d, J = 6.8 Hz, 3H, H-18), 0.86 (d, J = 6.8 Hz, 3H, H-19), 0.82 (d, J = 6.8 Hz, 3H, H-20); RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz), δ 43.4 (d, C-1), 24.4 (t, C-2), 79.0 (d, C-3), 37.9 (d, C-4), 47.6 (t, C-5), 109.5 (s, C-6), 51.1 (t, C-7), 36.7 (d, C-8), 39.2 (t, C-9), 33.8 (t, C-10), 70.4 (d, C-11), 29.1 (d, C-12), 31.1 (t,

C-13), 24.1 (t, C-14), 148.5 (s, C-15), 23.2 (q, C-16), 110.4 (t, C-17), 13.5 (q, C-18), 24.4 (q, C-19), 15.5 (q, C-20); HRESIMS m/z 347.2546 $[M+Na]^+$ (Calculado para $C_{20}H_{36}O_3Na$, 347.2562).

3.3. ENSAYOS ANTIFOULING IN VITRO¹⁻³

Con el fin de valorar la capacidad *antifouling* de los compuestos sintéticos obtenidos mediante la metodología descrita en el numeral 3.2. se realizaron dos de los más representativos bioensayos del *microfouling*, la inhibición de los sistemas de *Quorum Sensing* (numeral 2.9.1. , capítulo 2) y el bioensayo para evaluar la inhibición de *biofilm* bacteriano (numeral 2.9.2., capítulo 2). Estos bioensayos se encuentran altamente relacionados entre sí con el *microfouling* (ver marco teórico, capítulo 1).^{7,9} Los *biofilms* están formados por comunidades de bacterias adheridas unas a otras y/o a superficies, luego de un proceso complejo que se lleva a cabo en múltiples pasos y que depende de la densidad poblacional, la cual se regula por sistemas de *Quorum Sensing* (QS). QS es un conteo de la densidad poblacional, paso previo a la comunicación celular y la regulación del gen, el cual ha demostrado que contribuye en la formación y maduración de *biofilms*.^{7,8,9}

3.3.1. Ensayo de Inhibición de sistemas de *Quorum Sensing*

El ensayo estándar de difusión en disco fue usado para establecer la actividad inhibitoria de *Quorum Sensing* de los compuestos semisintéticos, siguiendo los parámetros de la NCCLS¹⁰ y usando la cepa biosensora *Chromobacterium violaceum* (ATCC 31532). Los compuestos (**17-50**) fueron evaluados a 30.0, 15.0, 7.5, 5.0 y 2.5 μg por disco, la actividad inhibitoria de QS de los compuestos fue establecida por la aparición de un halo incoloro pero viable y evaluada cuantitativamente como la mínima cantidad del compuesto (en μg por disco) requerida para inhibir la producción del pigmento violeta en las zonas de inhibición alrededor de los discos,¹¹ como fue previamente descrito en el numeral 2.9.1, capítulo 2. El ácido kójico fue usado como control positivo, ya que es un reconocido inhibidor de sistemas de *Quorum Sensing*,^{7,11,12} adicionalmente, el agente *antifouling* Cu_2O fue también evaluado como control positivo.¹³

3.3.2. Ensayo de evaluación de la actividad inhibitoria del Biofilm bacteriano

La formación del biofilm bacteriano fue desarrollada en placas multipozo de poliestireno (96 pozos), los pre-inóculos de las cepas bacterianas *Vibrio harveyi*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* fueron crecidas en el medio de cultivo Luria-Bertani, a una densidad óptica (DO) a 600 nm de 0.2-0.3 A. Los compuestos puros **17-50** fueron evaluados a cinco diferentes concentraciones (0.5, 1.0, 2.5, 10 y 100 ppm). Finalmente, cada pozo fue llevado a 200 μL de volumen con medio de cultivo LB, el control de la inhibición del crecimiento fue monitoreado midiendo la absorbancia de cada pozo a 621 nm antes y después de la incubación y la actividad fue reportada como IC_{50} (ppm), como fue previamente descrito en el numeral 2.9.2., capítulo 2.¹⁻³

⁷ Dobretsov, S.; Teplitski, M.; Bayer, M.; Gunasekera, S.; Proksch, P.; Paul, V. J. **2011**. Inhibition of marine biofouling by bacterial quorum sensing inhibitors. *Biofouling* 27, 893-905.

⁸ Steidle, A.; Allesen-Holm, M.; Riedel, K.; Berg, G.; Givskov, M.; Molin, S.; Eberl, L. **2002**. Identification and characterization of an N-acyl-homoserine lactone-dependent quorum-sensing system in *Pseudomonas putida* strain IsoF. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 12, 6371–6382.

⁹ Reading, N. C.; Sperandio, V. **2006**. Quorum sensing: the many languages of bacteria. *FEMS Microb. Lett.* 254, 1-11.

¹⁰ National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. Fourteenth informational supplement. NCCLS document M100-514. NCCLS, Wayne, PA, 2004.

¹¹ Fotso, S.; Zabriskie, T. M.; Proteau, P. J.; Flatt, P. M.; Santosa, D. A.; Sulastri, M. T. **2009**. Limazepines A-F, pyrrolo[1,4]benzodiazepine Antibiotics from an Indonesian Micrococcus sp. *J. Nat. Prod.* 72, 690–695.

¹² Dobretsov, S.; Teplitski, M.; Paul, V. **2009**. Mini-review: quorum sensing in the marine environment and its relationship to biofouling. *Biofouling* 25, 413-427.

¹³ Omae, I. **2003**. General aspects of tin-free antifouling paints. *Chem. Rev.* 103, 3431-3448.

3.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.4.1. Síntesis de análogos tipo cembrano

Los compuestos naturales **1-16** fueron aislados de los octocorales *E. knighti* y *P. flagellosa*, usando los métodos cromatográficos descritos anteriormente y sus estereoestructuras fueron establecidas mediante el análisis de sus características espectrales como se estableció anteriormente y como fue reportado en Tello *et al.*, 2009,⁶ 2011,¹ y 2012². Algunos de estos compuestos mostraron altos valores de actividad inhibitoria de QS y/o actividad inhibitoria de biofilm bacteriano en los ensayos realizados en nuestro laboratorio y descritos en los numerales 2.10.4. y 2.10.5. del capítulo 2.^{1,2} Por lo anterior entendimos que los compuestos tipo cembrano son una fuente potencial de agentes inhibidores del *fouling*. Por esta razón, en esta etapa del trabajo procedimos a la obtención de diversos análogos estructurales tipo cembrano a partir de algunos compuestos naturales seleccionados como cabezas de serie, para tratar de potenciar sus propiedades *antifouling* y hacer algunos aportes preliminares de relación estructura-actividad. Los compuestos **1, 3, 4, 13, 15** y **16** (Figura 3.2) fueron seleccionados como cabezas de serie debido a la alta actividad que presentaron en alguno o en los dos ensayos contra el *microfouling*, por su alta concentración en los gorgónidos, así como por la variedad de grupos funcionales reactivos presentes en sus estructuras, *i.e.* grupos epóxidos en C-7,8, grupos hidroxilo en C-2 y C-18, dobles enlaces reactivos entre C-3,4 y C-11,12, y grupos tipo carbonilo o hidroxilo en C-3, C-6 y C-11.

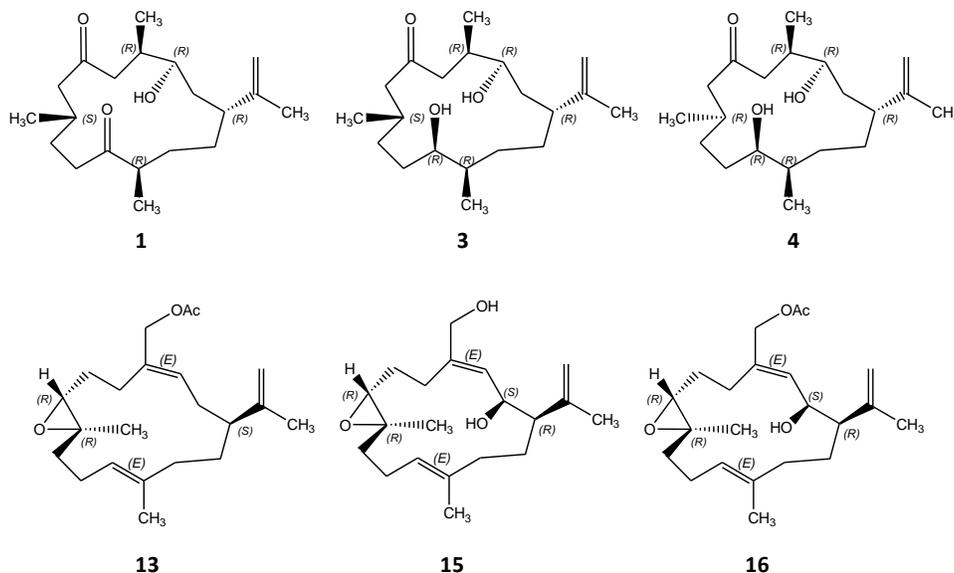


Figura 3.2. Compuestos naturales escogidos como cabezas de serie

Para obtener un amplio rango de estructuras análogas tipo cembrano, y para tratar de inducir significativamente o mejorar la actividad previamente establecida en los ensayos de inhibición de QS e inhibición de biofilm bacteriano (Tabla 2.7, capítulo 2), fue concebido un grupo de reacciones regioselectivas, sencillas, rápidas, reproducibles y de alto rendimiento. De este modo, las transformaciones utilizadas en este trabajo fueron agrupadas de acuerdo al tipo de reacción como sigue: reacciones de apertura de epóxido, reacciones de oxidación, tratamiento con yodo, reacciones fotoquímicas, reacciones de metilación y acetilación y finalmente síntesis de hemiacetales cíclicos, las cuales permitieron obtener los análogos de cembrano (**17-50**). Teniendo en cuenta que los compuestos de partida son ópticamente puros y no presentan ambigüedad en su configuración absoluta, se puede asumir que la configuración absoluta de los análogos obtenidos es como se describe a continuación, para cada compuesto.

3.4.2. Reacciones usadas y descripción de los compuestos obtenidos

3.4.2.1. Reacción de apertura del grupo funcional epóxido en los compuestos 13, 15, 16, y 26

El primer intento de modificación estructural fue tratar el grupo funcional epóxido de los compuestos acetato de asperdiol (**16**) y acetato de knightol (**13**) bajo condiciones ácidas (Figura 3.3) para obtener un grupo hidroxilo localizado en la posición C-7 y una mezcla de alquenos formados en C-8 debido a la formación de un carbocatión en esta posición, usando el procedimiento descrito en la metodología y en Tello, *et al.* 2009.⁶ De acuerdo a estudios previos, cuando el anillo epóxido de los cembranos sufre apertura, la actividad inhibitoria de QS es incrementada, particularmente cuando se forman nuevos dobles enlaces α al hidroxilo generado.^{3,6}

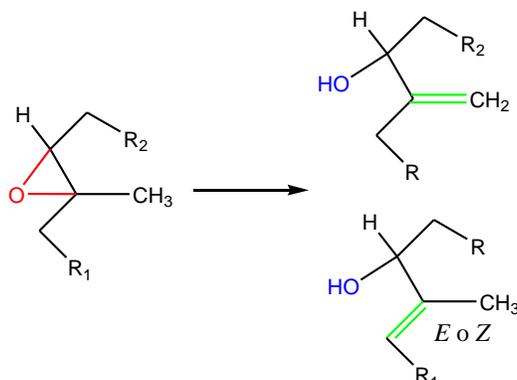


Figura 3.3. Apertura del anillo epóxido

Apertura del epóxido en el compuesto 16

Se tomó ventaja de la regioselectividad con la que la función C-7,8 epóxido en el compuesto **16** reacciona con ácidos de Lewis para dar predominantemente el diastereómero C-7(*R*).⁶ Así, se procedió a tratar el compuesto **16** con CDCl₃ acidificado, utilizando un cristal de yodo como catalizador y agitando durante 36 h para producir una mezcla 2.2:1.0:2.2:1.5:1.0 de compuestos C-7 hidroxilados (**17-21**) (Figura 3.4) en un 47.5% de producto global y un remanente de material de partida **16**. Los espectros de masas de alta resolución en modo electrospray y los datos espectrales de RMN de los compuestos **19-19** indicaron que estos compuestos poseen la misma fórmula molecular y funcionalidades, consistentes con la desaparición del grupo funcional epóxido, la introducción de un grupo hidroxilo en C-7 y la formación de un nuevo doble enlace en C-8. El espectro RMN ¹³C del compuesto **17** reveló la ausencia del grupo epóxido, exhibiendo señales solo para tres grupos metilos. Un metileno olefínico que resuena a δ_c 110.8 ppm, correlacionando con dos singletes anchos a δ_H 5.02 y 5.00 en el experimento HMBC, se asignó a un *exo*-metileno en C-19. Para el compuesto **18**, el espectro RMN ¹³C mostró señales para cuatro grupos metilo, uno de ellos adscrito a Me-19 en campo alto a δ_c 11.4 ppm; por lo que se dedujo una configuración (*E*) para el doble enlace trisustituido en C-8,9. El espectro de RMN ¹³C para el compuesto **19**, mostró igualmente cuatro grupos metilo y un metilo Me-19 resonante a campo bajo en δ_c 17.2 ppm, indicando una configuración (*Z*) para el doble enlace trisustituido en C-8,9. La estereoquímica de C-7 en los alcoholes **17-19** se estableció como (*R*) utilizando la metodología descrita en Tello *et al.* 2009,⁶ la cual tiene como base las correlaciones clave NOE observadas en el espectro NOESY, así como, el método de Mosher modificado empleando (*R*)- y (*S*)-MPA como agentes derivatizantes.^{14,15} El análisis de los datos obtenidos permitieron establecer la estructura de **17** como 7*R*-hidroxi-8(19)-en-cembrano, de **18** como 7*R*-hidroxi-8*E*-8-en-cembrano, y **19** como 7*R*-hidroxi-8*Z*-8-en-cembrano, como era de esperarse para la apertura del anillo epóxido.⁶

¹⁴ Seco, J. M.; Quiñoa, E.; Riguera, R. **2004**. The assignment of absolute configuration by NMR. *Chem. Rev.* *104*, 17-117.

¹⁵ Seco, J. M.; Quiñoa, E.; Riguera, R. A. **2001**. practical guide for the assignment of the absolute configuration of alcohols, amines and carboxylic acids by NMR. *Tetrahedron Asymmetry* *12*, 2915-2925.

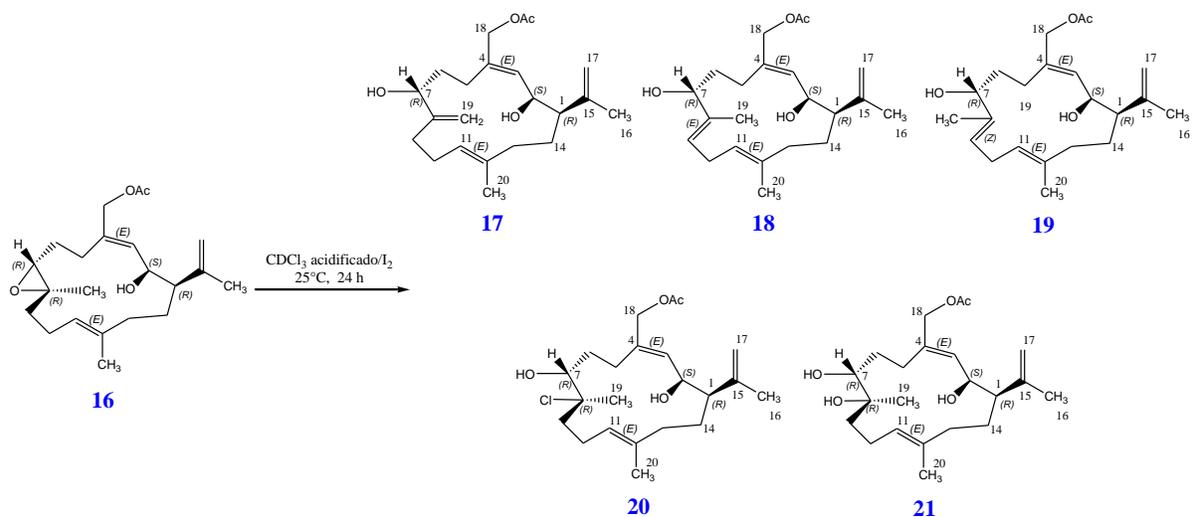


Figura 3.4. Reacción de apertura del anillo epóxido en el compuesto **16**

Para el compuesto **20** la presencia de un cloro en la molécula fue claramente establecida por la presencia de un ión en m/z 423.2125 $[M+2+Na]^+$ el cual es la tercera parte del ión aducto en m/z 421.2128 $[M+Na]^+$, de acuerdo a lo observado en el espectro de masas de alta resolución en modo electrospray, así como también por la aparición de una señal a campo bajo en δ_c 83.1 característica de carbonos cuaternarios halogenados y asignada a C-8 con base en el espectro de RMN ^{13}C . Lo anterior evidenció claramente la apertura del anillo epóxido y la introducción de un cloro en C-8, la configuración de este carbono en el compuesto **20** fue establecida teniendo en cuenta las correlaciones clave observadas en el experimento NOESY sensitivo a fase, entre H₃-19 y H₂-6 pero no con H-7, lo que indicó una orientación *syn* para H₃-19 y H₂-6. Así mismo, H-7 presentó un entrecruzamiento de picos con H₂-9, lo que permitió establecer la misma orientación. Estos datos indican una relación *trans* entre CH₃-19 y H-7, permitiendo asignar una configuración C-8*R* para este carbono y establecer la estereoestructura del compuesto **20** como una clorohidrina *trans* en C-7 y C-8 del cebrano **16**.

El compuesto **21**, obtenido a partir de **16**, muestra diferentes características estructurales. Su espectro de masas de alta resolución en modo electrospray presenta un ión en m/z 403.2460 $[M+Na]^+$ (Calculado para C₂₂H₃₆O₅Na, 403.2460) lo que indica la introducción de un átomo de oxígeno en la molécula. El espectro RMN ^{13}C presentó una señal característica de un carbono cuaternario oxigenado localizada en δ_c 80.2, la cual fue asignada a C-8; adicionalmente, la señal del Me-19 sufrió un desplazamiento a campo bajo a δ_c 27.3 comparada con el material de partida, también, esta señal presentó un entrecruzamiento de picos con el singlete en δ_H 1.59 de acuerdo a lo observado en el experimento gHMQC, corroborando la introducción de un grupo hidroxilo en C-8. Así mismo, se pudo establecer una configuración *trans* entre CH₃-19 y H-7 a partir de las correlaciones NOE observadas en el experimento NOESY.

Apertura del epóxido en el compuesto **13**

La apertura del epóxido en el compuesto natural acetato de knightol (**13**), se realizó bajo las mismas condiciones descritas para **16**,^{3,6} obteniéndose una mezcla de los compuestos **22-25** (1.2:1.0:1.1:1.0) con un rendimiento del 69.2% (Figura 3.5). La elucidación estructural para estos compuestos se realizó mediante el análisis de los datos obtenidos de los experimentos de RMN 1D/2D y sus respectivos espectros de masas de alta resolución en modo electrospray, permitiendo establecer que todos los compuestos presentaron una funcionalidad hidroxilo C-7*R*, la geometría del nuevo doble enlace formado se dedujo a partir del desplazamiento químico del C-19 junto con la correlación NOE observada entre H-9 y Me-19. La presencia de un átomo de cloro se dedujo a partir del espectro de masas de alta resolución en modo electrospray.

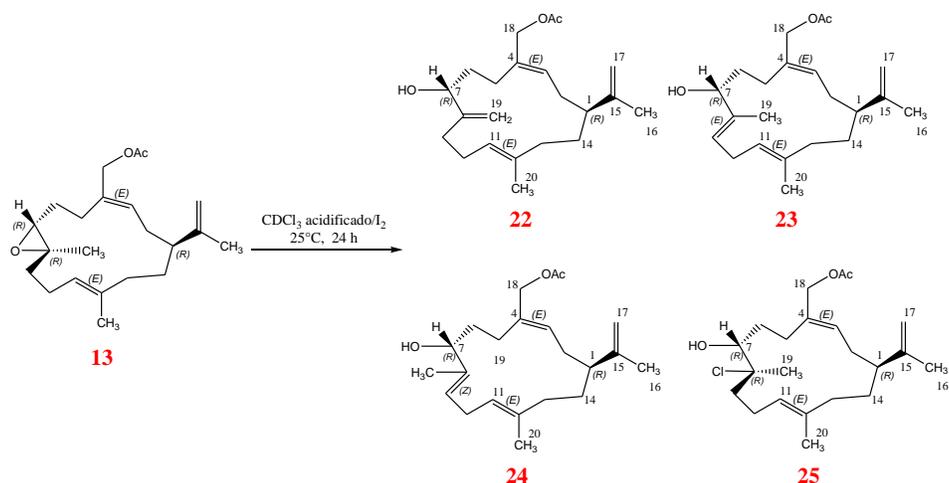


Figura 3.5. Reacción de apertura del anillo epóxido en el compuesto **13**

La estructura de los compuestos **22-25** fue formada a partir del mismo patrón de reacción de la apertura del epóxido del compuesto **16**. El compuesto **22** presenta un doble enlace exocíclico, el compuesto **23** presenta un doble enlace *E*-endocíclico, y el compuesto **24** presenta un doble enlace *Z*-endocíclico. Finalmente, el compuesto **25** fue establecido como el derivado *trans*-clorohidrina.

Apertura del epóxido en el compuesto **26**

Posteriormente, el compuesto **15** fue convertido en **26**, y este último fue sometido al mismo procedimiento anterior lográndose obtener los compuestos **27-30** (Figura 3.6), los cuales habían sido previamente descritos en Tello *et al.* 2009,⁶ pero sintetizados nuevamente en este trabajo para evaluar su actividad IQS contra *C. violaceum* y su actividad inhibitoria de biofilm bacteriano.³

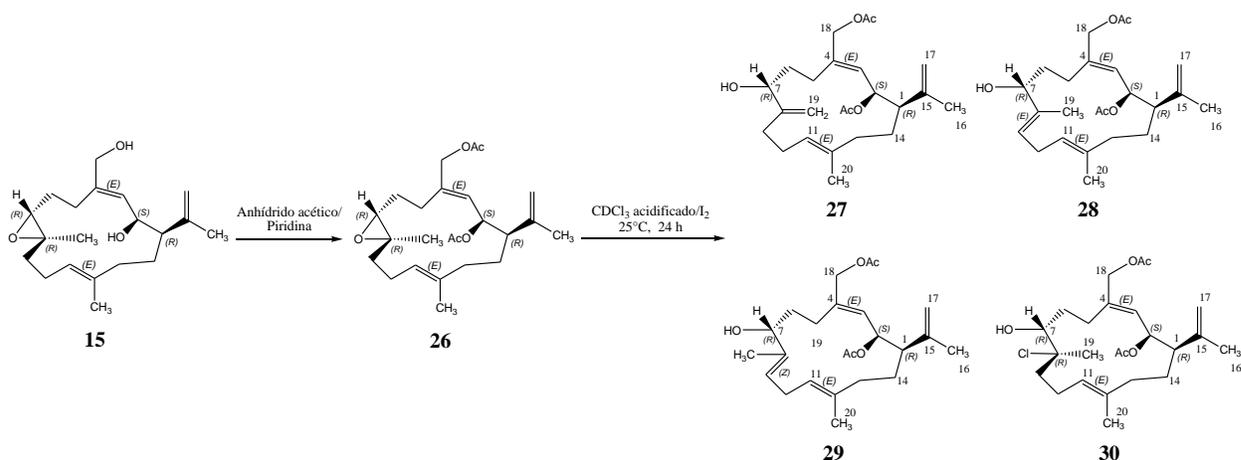


Figura 3.6. Apertura del anillo epóxido en el compuesto **26**

Apertura del epóxido en el compuesto **15**

El compuesto asperdiol (**15**) fue tratado bajo las mismas condiciones de acidez que **13** y **16**, lográndose obtener una mezcla de los compuestos **31-34** (2.6:3.2:2.1:1.0) con un rendimiento del 91% (Figura 3.7). Cabe resaltar, que en los experimentos de RMN ¹H y ¹³C no se apreciaron las señales características de los dobles enlaces *endo*- y *exo*-cíclicos en los productos.

El espectro de masas de alta resolución en modo electrospray del compuesto **31** presentó un ión aducto en m/z 359.2238 $[M+Na]^+$, el cual permitió calcular la fórmula molecular de este compuesto como $C_{20}H_{32}O_3$ con cinco grados de insaturación. El espectro RMN ^{13}C permitió localizar una función hidroxilo en C-7 (δ_C 76.8; δ_H 3.36) como se describió para los compuestos **13** y **16**, sin embargo, el carbono cuaternario localizado en C-8 fue desplazado a campo bajo a δ_C 79.8, lo que demuestra la adición de un oxígeno a este carbono. Adicionalmente, el acoplamiento a larga distancia observado en el experimento gHMBC entre H-2 a δ_H 4.51 ppm y la señal del carbono adscrito a C-8 permitió establecer que hubo un ataque nucleofílico del grupo hidroxilo en C-2 (δ_C 79.8; δ_H 4.51) al carbono C-8 para formar un anillo oxacíclico de ocho miembros. La parte remanente de la molécula, mostró la misma estructura del material de partida.

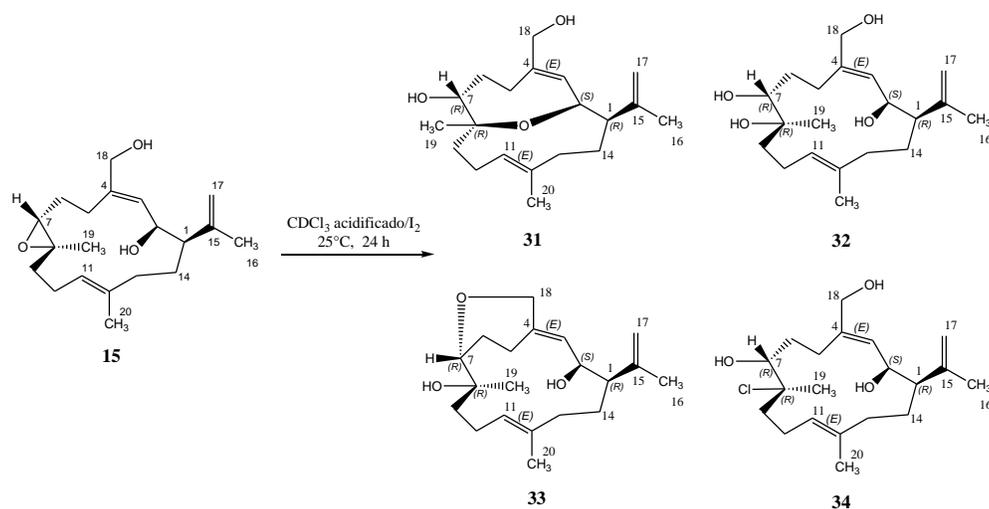


Figura 3.7. Reacción de apertura del anillo epóxido en el compuesto **15**

Para el compuesto **32**, el espectro de masas de alta resolución en modo electrospray presentó un ión en m/z 361.2351 $[M+Na]^+$ con el cual se pudo calcular una masa extra de 18 Da en relación con el compuesto de partida, lo que corresponde a la inserción de una molécula de H_2O . Los datos de RMN obtenidos para este compuesto son similares a los obtenidos para el compuesto **21**, sin embargo, como se estableció previamente la apertura del epóxido produce un hidroxilo en C-7 con configuración *R* y para este caso específico se produjo la adición de un grupo hidroxilo a C-8 resultando éste con una configuración *R*, deducido de los resultados obtenidos del experimento NOESY, logrando así, establecer la estructura del diol **32** (Figura 3.7). El compuesto **33** mostró un espectro de masas de alta resolución en modo electrospray similar a **31** en m/z 359.2362 $[M+Na]^+$ y posee los mismos cinco grados de insaturación, lo que sugiere isomerismo estructural, pero en este caso, se formó un anillo de seis miembros el cual contiene un oxígeno en el C-7. El C-7 resuena a δ_C 77.0; δ_H 3.44 y el C-18 aparece desplazado a campo bajo a δ_C 74.3; δ_H 4.46, H-18a; 4.13, H-18b. El acoplamiento a larga distancia observado en el experimento HMBC entre H-18a y C-7 confirmó la ubicación del grupo oxa en la estructura del compuesto. La estereoquímica se logró establecer como C-7*S* y C-8*R* debido a la correlación entre H-7 y Me-19 en el espectro NOE, lo que supone una relación *syn*. Para el compuesto **34** se obtuvo un ión en m/z 361.1889 $[M-H_2O+Na]^+$ en el espectro de masas de alta resolución en modo electrospray, el cual es consistente con una fórmula molecular $C_{20}H_{31}ClO_2$, de la cual se pudo determinar la presencia de un cloro en este compuesto. Los datos de RMN y las correlaciones NOESY estuvieron acordes con las estereoestructuras de los compuestos **20**, **25** y **30**. La formación de los compuestos **31** y **33** puede explicarse por el ataque nucleofílico al carbocatión formado en C-8, obtenido por la apertura del epóxido bajo condiciones ácidas; en el caso del compuesto **31**, ocurrió una reacción nucleofílica intramolecular y en el compuesto **33** éste fue formado por el ataque nucleofílico intramolecular del grupo hidroxilo en C-18 al carbono menos impedido del epóxido ubicado en C-7. Este mecanismo está acorde con el patrón de reacción propuesto para los derivados de los compuestos naturales **13** y **16**, descrito anteriormente.

3.4.2.2. Reacciones de oxidación

En estudios paralelos, se logró establecer que los cembrano oxigenados presentan una mayor actividad IQS que aquellos no oxigenados, así que se procedió a realizar la oxidación de los cembranos naturales **15** y **16** con el fin de obtener diversos análogos con actividad IQS. En consecuencia, se seleccionaron los agentes oxidantes PCC y P₂O₅ para obtener derivados carbonílicos, SeO₂ para oxidar las posiciones alílicas y *m*-CPBA para obtener los derivados epoxidados.

Reacción del acetato de asperdiol (**16**) con P₂O₅

La reacción del compuesto **16** con P₂O₅ a temperatura ambiente en CH₂Cl₂ por 3.5 h, permitió obtener una mezcla compleja, de la cual solo se pudieron separar los compuestos **35** y **36** (Figur 8) empleando CLAE en una columna RP-18. La comparación de los espectros de RMN ¹³C del compuesto **35** y **16** mostraron que las principales diferencias se encontraban en el fragmento C-6/C-9. El espectro de RMN ¹³C de **35** presenta una señal a δ_C 206.0, la cual muestra un entrecruzamiento de picos con la señal de un protón a δ_H 9.37, de acuerdo al espectro gHMQC, lo que indica la presencia de una función aldehído. Por otro lado, se pudieron establecer las correlaciones entre los protones de H₂-9 (δ_H 1.25), los protones del grupo metilo Me-19 (δ_H 1.05) con la señal del aldehído en C-7, de acuerdo a lo observado en el experimento gHMBC. También, se pudo observar un entrecruzamiento de picos de los protones H₂-5 (δ_H 1.81/1.46), H₂-6 (δ_H 1.83/1.63) y H-9 (δ_H 1.25) con el carbono cuaternario C-8 (δ_C 49.4). Todas estas correlaciones confirmaron la presencia de un grupo aldehído unido al carbón cuaternario en 49.4 ppm. El espectro de masas de alta resolución en modo electrospray del compuesto **35**, mostró un ión pseudomolecular [M+Na]⁺ en 385.2295 correspondiente a una fórmula molecular C₂₂H₃₄O₄, indicando seis grados de insaturación en la molécula. La falta de correlaciones clave NOE para el metilo Me-19 no permitió la determinación de la stereoquímica relativa del nuevo centro quiral formado en C-8. Adicionalmente, se pudo establecer un reordenamiento en el núcleo cembrano del análogo **35**, formando enlace sencillo entre C-6 y C-8 y una función aldehído en C-7.

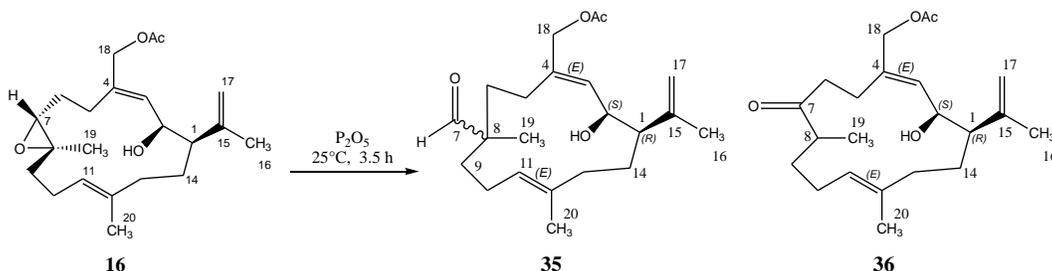


Figura 3.8. Reacción de oxidación utilizando P₂O₅ al compuesto **16**

La estructura del compuesto **36** se estableció por la comparación de los datos obtenidos de RMN con aquellos obtenidos para **16**, cuyas principales diferencias se encontraron en C-7 con una señal en δ_C 213.9 ppm, correspondiente a una función ceto, y en C-8 con una señal en δ_C 45.5 ppm, correspondiente a una señal de un grupo metino deducido por el experimento DEPT y la cual correlaciona en el gHMQC con la señal en δ_H 2.53 ppm. En el experimento COSY, se pudo claramente apreciar la correlación del protón del grupo metino adscrito a C-8 con una señal de un doblete asignada al Me-19 y resonante en δ_C 1.10. Adicionalmente, en el experimento gHMBC, se pudo establecer un entrecruzamiento de picos entre los protones del Me-19 con el grupo ceto en C-7, y el metino en C-8, lo cual permitió fijar su posición en C-8. Al igual que para el compuesto **35**, la falta de correlaciones clave en el experimento NOESY para el Me-19, no permitió establecer la configuración relativa de este centro quiral. Finalmente, se pudo establecer que el compuesto **36** es un derivado con un grupo ceto en C-7 del cembrano natural **16**.

Reacción del acetato de asperdiol (**16**) con SeO₂

Cuando el compuesto **16** fue tratado con SeO_2 y *t*-BuOOH, se obtuvo el compuesto **37** en 17.6% junto con una mezcla inseparable de compuestos de alta polaridad (Figura 3.9). El espectro de masas de alta resolución en modo electrospray para este compuesto presentó un ión en m/z 401.2298 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, permitiendo establecer los mismos cinco grados de insaturación que el material de partida y una masa extra de 16 Da comparado con el compuesto **16**; esta masa fue adscrita a un átomo de oxígeno. Los datos de los espectros RMN ^1H y ^{13}C del compuesto **37** fueron similares al material de partida (**16**), excepto por el desplazamiento químico observado para C-13 (las señales del metileno en **16** fueron desplazadas a campo bajo a δ_{C} 76.5 en el espectro de RMN ^{13}C y a δ_{H} 4.03 en el espectro de RMN ^1H), lo que implica la adición de un grupo hidroxilo en este carbono. El análisis de los datos de RMN, principalmente el experimento DEPT permitieron establecer la aparición de un nuevo metino carbinólico en el compuesto **37**, y la respectiva desaparición de las señales correspondientes al metileno C-13 en el material de partida. Todos los demás datos de RMN fueron consistentes con el material de partida. La estereoquímica del nuevo centro quiral C-13S se dedujo por la relación *syn* entre H-2 y H-13, observada en el experimento NOESY.

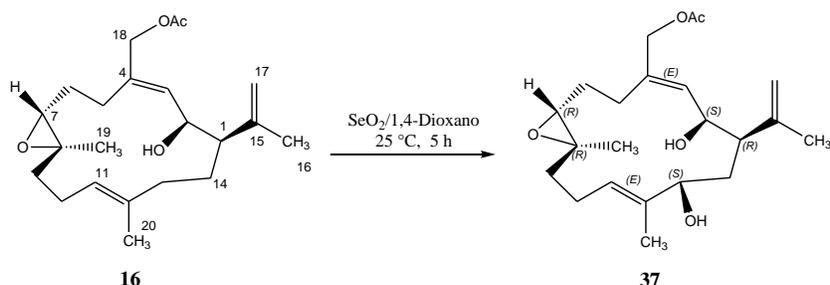


Figura 3.9. Reacción de oxidación utilizando SeO_2 al compuesto **16**

Reacción del acetato de asperdiol (**16**) con ácido *m*-cloroperbenzoico para producir **38**

La conversión de **16** al tetraepóxido **38** (Figura 3.10) se llevó a cabo mediante el uso del agente epoxidante *m*-CPBA en CH_2Cl_2 seco y a temperatura ambiente, obteniéndose un producto con un rendimiento del 56.9% luego de la purificación en cromatografía en columna (Figura 3.10). La fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_5$ y los seis grados de insaturación para **38** se dedujeron del espectro de masas de alta resolución en modo electrospray, el cual presentó un ión pseudomolecular en m/z 433.2197 $[\text{M}+\text{Na}]^+$. Las principales diferencias observadas entre el compuesto obtenido **38** y la cabeza de serie **16**, fueron tres oxígenos extras en **38**, los cuales fueron determinados a partir de los tres pares de señales observadas en el espectro de RMN ^{13}C en δ_{C} 64.0 (CH-3)/57.2 (C-4), δ_{C} 64.4 (CH-11)/62.6 (C-12), y δ_{C} 61.0 (C-15)/53.6 (CH₂-17) y atribuidos a la epoxidación de los tres dobles enlaces localizados en Δ^3 , Δ^{11} y Δ^{15} en el material de partida, es decir se encontraron tres grupos epóxido adicionales en el compuesto **38** en vez de los tres dobles enlaces presentes en **16**. Adicionalmente, la presencia de las señales de los protones en δ_{H} 3.08 (H-3), δ_{H} 2.66 (H-11) y δ_{H} 2.60 (H-17a)/2.47 (H-17b) observadas en el espectro de RMN ^1H , confirman las dos funciones epóxido trisustituidas y una disustituida respectivamente.

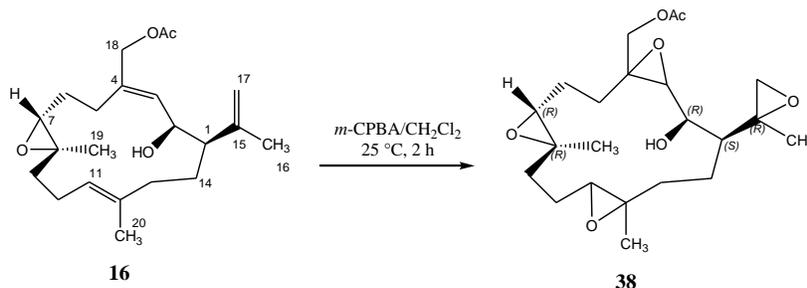


Figura 3.10. Reacción de epoxidación en el compuesto **16**

Reacción del asperdiol (**15**) con PCC para producir **39** y **40**

La última reacción de este grupo, fue la oxidación de los dos grupos hidroxilo disponibles en C-2 y C-18 en el compuesto **15** usando PCC en CH_2Cl_2 seco para producir, luego de una purificación considerable, compuestos mono-(**39**) y diceto (**40**) en rendimientos del 22.5% y 38.7%, respectivamente. El espectro de RMN ^{13}C del compuesto **40**, mostró dos señales en δ_{C} 199.9 y δ_{C} 195.0 adscritas a dos grupos carbonilo localizados en C-2 y C-18, respectivamente. Estos grupos carbonilo junto con la ausencia de las señales de los grupos hidroxilos localizados en C-2 (δ_{C} 68.4, d) y C-18 (δ_{C} 65.6, t) en la cabeza de serie **15**, sirvieron para establecer las funciones aldehído en C-18 y ceto en C-2. Lo anterior y el resto de señales en RMN fueron coincidentes con la estereoestructura de **40** como se describe en la Figura 3.11. La estructura del compuesto **39** fue establecida de forma similar a la realizada para el compuesto **40**, de este modo, las señales de los espectros RMN ^1H y ^{13}C localizadas en δ_{C} 194.7 y en δ_{H} 9.42 (correlacionadas en el experimento gHMQC), fueron asignadas a un grupo aldehído adscrito a C-18. Como se describió anteriormente, la ausencia de las señales para el grupo hidroximetileno (δ_{C} 65.6; δ_{H} 4.02/4.10) adscrito a C-18 en el compuesto cabeza de serie **15**, permitió establecer la posición del grupo funcional aldehído en C-18 y el resto de señales en RMN fueron coincidentes con la estereoestructura de **39** como se muestra en la Figura 3.11.

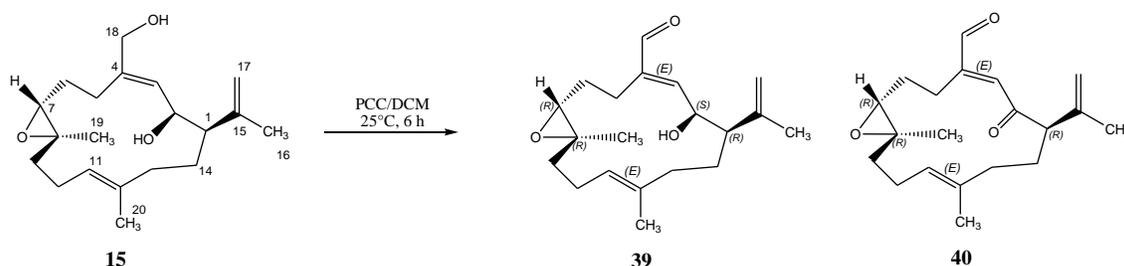


Figura 3.11. Reacción de oxidación con PCC al compuesto **15**

3.4.2.3. Tratamiento con iodo en el compuesto acetato de asperdiol **16**

El siguiente intento, fue tratar el acetato de asperdiol (**16**) con iodo para obtener compuestos tipo cembrano con rearrreglos inusuales y de esta forma incorporar diversidad química en los análogos. De este modo, al exponer el compuesto **16** a una mezcla de iodo en CDCl_3 , se obtuvo una mezcla compleja de productos (Figura 3.12), de los cuales, los compuestos **41** y **42** fueron aislados en 13.6% y 11.1%, respectivamente, junto con una mezcla polar inseparable (60.1%). Para el compuesto **41** pudo ser establecida la formación de un puente oxa entre C-2 y C-8, debido a los desplazamientos químicos observados en RMN de C-2 (δ_{C} 67.1) y C-8 (δ_{C} 75.8). La formación de este puente éter en **41** presumiblemente pudo ocurrir vía apertura del epóxido en **16**, como fue descrito para el compuesto **31**, adicionalmente, se pudo establecer una relación *trans* entre Me-19 y H-7 para el compuesto **41** mediante las correlaciones claves observadas en el experimento NOESY (igual a lo establecido para **21**), permitiendo determinar una configuración absoluta de C-7 R y C-8 S , todo lo anterior y el análisis de los datos restantes en RMN permitió establecer la estructura de este compuesto como se representa en la Figura 3.12. Para el compuesto **42** los datos de RMN ^1H y ^{13}C estuvieron acordes con la formación de un grupo tetrahydrofurano entre C-8 (δ_{C} 78.0) y C-11 (δ_{C} 74.8) determinado por el entrecruzamiento de picos observados en el experimento gHMBC entre la señal del protón en δ_{H} 3.37 (H-11) y el carbono cuaternario localizado en C-8 (δ_{C} 78.0). El espectro de masas de alta resolución en modo electrospray, permitió establecer la presencia de dos átomos de iodo en la molécula, así como una fórmula molecular de $\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{I}_2\text{O}_4$. Adicionalmente, el desplazamiento químico a campo bajo de los carbonos C-7 (δ_{C} 39.0) y C-12 (δ_{C} 49.6) en el espectro de RMN ^{13}C , sugirió la ubicación de los átomos de iodo en estas posiciones. La estereoestructura de **42** (Figura 3.12) pudo ser establecida con base en el mecanismo propuesto y en las correlaciones NOE observadas en el experimento NOESY. Para el compuesto **42**, se estableció una relación *trans* entre H-7 y β -Me-19, basados en las correlaciones NOE claves como las del compuesto **21**; a su vez, el β -Me-19 mostró una fuerte correlación NOE con H-11, indicando una orientación *syn*, y H-11 y Me-20 fueron ubicados en posición *trans*, estableciendo la configuración de C-7 S , C-8 R , C-11 R y C-12 R . La transformación del compuesto **16** al compuesto diiodado **42** puede ser explicada por

el ataque nucleofílico en C-7 de un anión ioduro para dar la iodohidrina en C-7 y C-8 con la respectiva inversión de la configuración, y por el ataque de la cara β del grupo alcóxido de C-8 al iodonio cíclico en C-11,12 previamente formado por el ataque del yoduro al grupo olefínico en Δ^{11} . Todo lo anterior junto con el resto de señales en RMN fue coincidente con la estructura que se muestra.

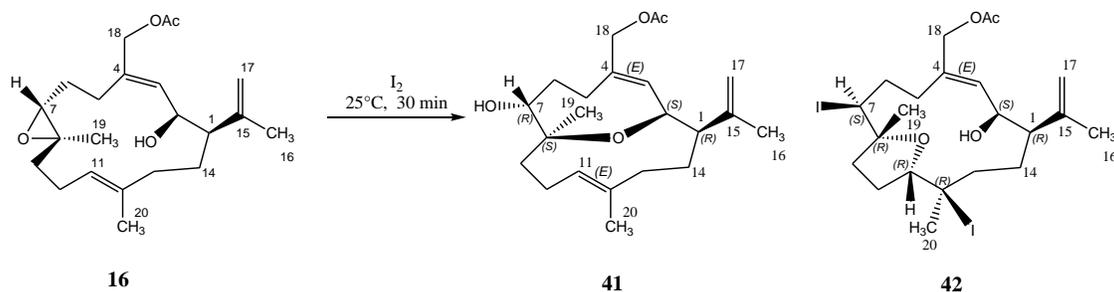


Figura 3.12. Tratamiento con yodo al compuesto 16

3.4.2.4. Reacciones fotoquímicas

La reacción fotoquímica del acetato de asperdiol (**16**) en isopropanol durante 12 h, produjo una mezcla 4:1:2 del compuesto **15**, el compuesto **43** y del material de partida **16** (Figura 3.13), los cuales fueron separados empleando cromatografía en columna sobre sílica gel. Los datos de RMN ^1H y ^{13}C del compuesto **43** fueron muy diferentes al material de partida **16**, evidenciando la ausencia del grupo funcional epóxido, el cual sufrió una apertura durante la reacción, formando una función hidroxilo en C-7 R y una función *exo*-metileno en C-8, las cuales son reminiscentes con las estructuras de los compuestos **17**, **22** y **27**, como pudo ser establecido de acuerdo a las señales observadas en los espectros de RMN ^1H y ^{13}C : δ_{C} 84.5/ δ_{H} 3.50 adscrito a C-7; δ_{C} 145.2 adscrito a C-8 y δ_{C} 115.4/ δ_{H} 5.05, 4.90 adscrito a C-19. La posición del nuevo *exometileno* fue fijada por el entrecruzamiento de picos observado en el experimento gHMBC entre los protones H₂-19 y las señales de los carbonos C-7 a δ_{C} 84.5 y C-9 a δ_{C} 29.7. Adicionalmente, la formación de un puente oxa en las posiciones C-7 y C-11 fue totalmente inesperada y pudo ser establecida por la ausencia de las señales correspondientes al doble enlace entre C-11 y C-12 presentes en el material de partida; por la presencia de las señales desplazadas a campo alto en δ_{C} 80.1/ δ_{H} 4.42, adscritas a C-11; por la señal observada en RMN ^{13}C en δ_{C} 84.7 adscrita a C-12, la cual fue asignada a un carbono cuaternario unido a un grupo hidroxilo por su desplazamiento; y por la señal del grupo hidroxilo localizado en C-7 (Figura 3.13). La estereoquímica de **43** se dedujo por el mecanismo y las correlaciones NOE observadas entre H-7 y H-11 en el experimento NOESY, estableciendo una relación *syn* sobre la cara α de la molécula. Adicionalmente, se sugirió la orientación del puente oxa sobre la cara β del cembrano, basado en las consideraciones mecánicas y de este modo se pudo establecer la configuración en C-7 R y C-11 R . Finalmente, el centro quiral en C-12 R se pudo determinar por la relación NOE entre H-2 y Me-20 sobre la cara α de la molécula. Todo lo anterior, junto con las demás señales en RMN permitió establecer la estereoestructura del compuesto **43** como se muestra en la Figura 3.13.

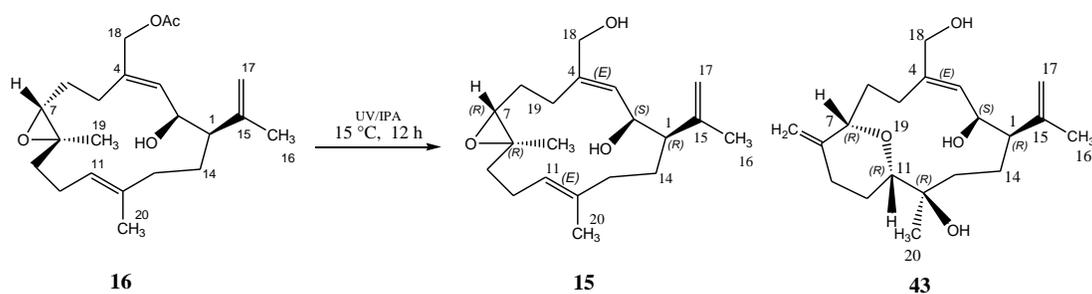


Figura 3.13. Reacción fotoquímica en el compuesto 16

3.4.2.5. Metilaciones y acetilaciones

Con las metilaciones y acetilaciones, se pretendió tratar de incorporar una mayor diversidad estructural-química a los diferentes compuestos tipo cembrano naturales.

Reacción del asperdiol (**15**) con MeOTf para producir **44**.

El compuesto metilado **44** se obtuvo por la reacción de **15** con metiltriflato y trietilamina en CH_2Cl_2 , en agitación durante toda la noche. Luego de la purificación del residuo por CLAE en fase reversa, se obtuvo el compuesto **44** puro, con un rendimiento global del 52.6%. El espectro de masas de alta resolución en modo electrospray de este compuesto mostró un ión en m/z 339.2285 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{Na}]^+$, que fue consistente con la fórmula molecular $\text{C}_{21}\text{H}_{34}\text{O}_3$ e indicó la introducción de un grupo metilo, cuya señal fue desplazada a campo bajo en el espectro de RMN ^1H en δ_{H} 3.16 (H-21). Adicionalmente, este grupo metilo mostró un entrecruzamiento de picos con la señal en el espectro de RMN ^{13}C en δ_{C} 56.7, de acuerdo a lo observado en el experimento gHMBC, confirmando la metilación del grupo hidroxilo. Las señales correspondientes a los protones diastereotópicos H₂-18 fueron desplazadas a δ_{H} 4.23 (H-18a) y 3.53 (H-18b) presentando correlación con la señal en δ_{C} 75.0, según lo observado en el experimento gHMBC, indicando la metilación del grupo hidroxilo en C-18. Los datos de RMN de **44** mostraron una señal en δ_{C} 216.0, consistente con un grupo carbonilo el cual fue asignado a C-7, el cual presentó un entrecruzamiento de picos con H₃-19 (δ_{H} 1.01) como se observó en el experimento gHMBC. Todo lo anterior, junto con las señales restantes en RMN condujo a establecer la estructura de **44** como está representada en la Figura 3.14.

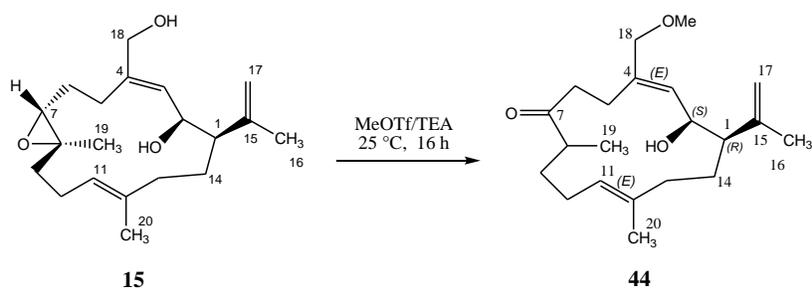


Figura 3.14. Reacción de metilación del compuesto **15**

Reacción de 8S-plexaurolona (**1**), 8S-dihidroplexaurolona (**3**) y 8R-dihidroplexaurolona (**4**) con anhídrido acético para producir los compuestos **45-47**.

Los compuestos **1**, **3** y **4** fueron tratados con anhídrido acético en piridina seca para producir los compuestos **45**, **46**,¹⁶ y **47** en 96.8%, 97.6% y 98.0%, respectivamente. Los espectros de masas de alta resolución tomados en modo electrospray de los compuestos **45** m/z 387.2508 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, **46** m/z 431.2773 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ y **47** m/z 431.2768 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ fueron consistentes con las fórmulas moleculares $\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{O}_4$, $\text{C}_{24}\text{H}_{40}\text{O}_5$, y $\text{C}_{24}\text{H}_{40}\text{O}_5$, respectivamente. Lo anterior indicó entonces, que se llevó a cabo la monoacetilación del compuesto **1** y la diacetilación de los compuestos **3** y **4** obteniéndose los compuestos **45-47**, respectivamente. Los datos RMN de los compuestos **45-47** indicaron claramente las respectivas acetilaciones y las demás señales en los experimentos de RMN fueron consistentes con las estructuras de estos compuestos como se muestra en la Figura 3.15.

¹⁶ El compuesto **46** fue previamente aislado del molusco *Planaxis sulcatus* y reportado en Linz, G. S.; Sanduja, R.; Weinheimer, A. J.; Alam, M.; Martin, G. E. **1986**. Applications of cosy and homonuclear relay 2D-NMR in the determination of the structure of new cembrane isolated from the mollusc *Planaxis sulcatus*. *Tetrahedron Lett.* **27**, 4833-4836.

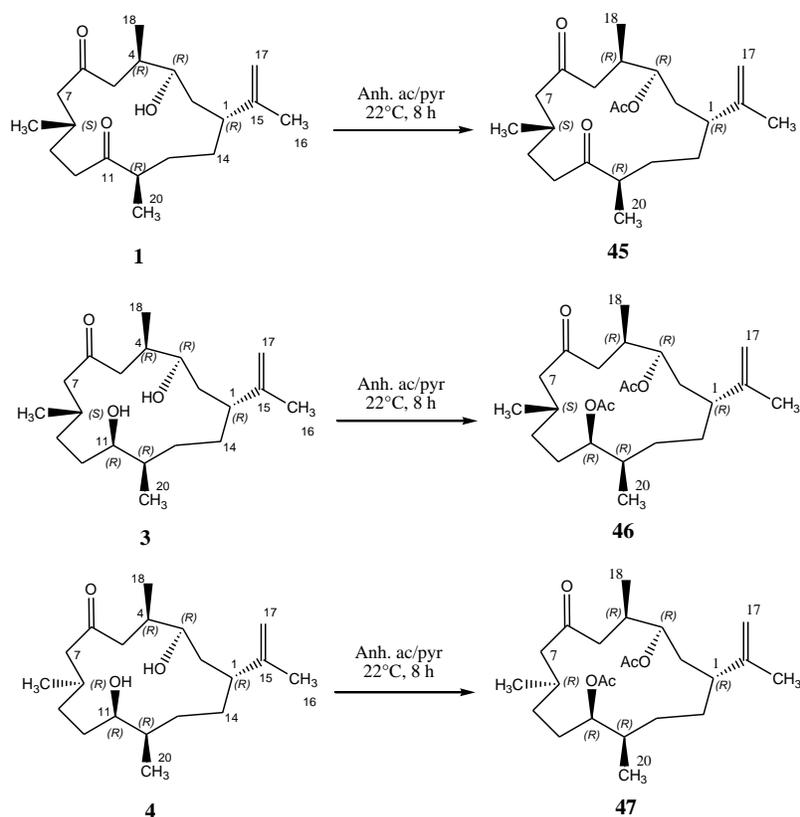


Figura 3.15. Acetilaciones de los compuestos 1, 3 y 4

3.4.2.6. Síntesis de hemiacetales cíclicos

En el capítulo 2, numeral 2.10.1. se pudo establecer que algunos compuestos que podían formar hemiacetales en solución mostraban diferentes propiedades *antifouling* que aquellos que no podían formarlos.¹ Es por esto, que decidimos obtener algunos hemiacetales tipo cembrano para establecer su actividad IQS.

Reacción de 8S-plexaurolona (1), 8S-dihidroplexaurolona (3) y 8R-dihidroplexaurolona (4) con CH₂Cl₂ acidificado para producir los compuestos 48-50.

En este último intento de modificación química se indujo una ciclización intramolecular entre el grupo hidroxilo y los grupos cetona disponibles en los compuestos 1, 3 y 4, empleando la metodología descrita en el capítulo 2, numeral 2.7.3. y en Tello *et al.* 2011.¹ Cada uno de estos compuestos, fue tratado con CH₂Cl₂ acidificado para obtener, luego de la purificación, los compuestos 48 (93.3%), 49 (86.6%) y 50 (74%). Los espectros de masas de alta resolución tomados en modo electrospray de los compuestos 48 m/z 345.2396 [M+Na]⁺, 49 m/z 347.2544 [M+Na]⁺ y 50 m/z 347.2546 [M+Na]⁺ fueron consistentes con las fórmulas moleculares C₂₀H₃₄O₃ (IDH = 4), C₂₀H₃₆O₃ (IDH = 3) y C₂₀H₃₆O₃ (IDH = 3), respectivamente. Para el compuesto 48, la ausencia de un grupo cetona junto con las señales en RMN en δ_C 110.8 adscrita a C-6 y δ_H 3.68/ δ_C 75.7 asignada a C-3, sugirió la formación del hemiacetal cíclico 48 (Figura 3.16), probablemente debido a la adición nucleofílica intramolecular del hidroxilo localizado en C-3 al grupo cetona ubicado en C-6. Los compuestos restantes 49 y 50 mostraron el mismo patrón de reacción. Así, para 49, la señal de C-6 en δ_C 109.7 y las señales de C-3 en δ_H 3.95/ δ_C 79.0, y para 50, la señal de C-6 en δ_C 109.5 y las señales de C-3 en δ_H 3.79/ δ_C 79.0, junto con los análisis detallados de los experimentos COSY y gHMBC, sugirieron la formación de hemiacetales cíclicos como se muestra en la Figura 3.16. La posición de los hemiacetales cíclicos producidos,

se estableció por las diferencias en los datos de RMN comparados con sus cabezas de serie respectivas, particularmente para las señales adscritas a los grupos carbonilo e hidroxilo como es representado en Figura 3.16. Las demás señales de RMN permitieron deducir las estructuras que se muestran.

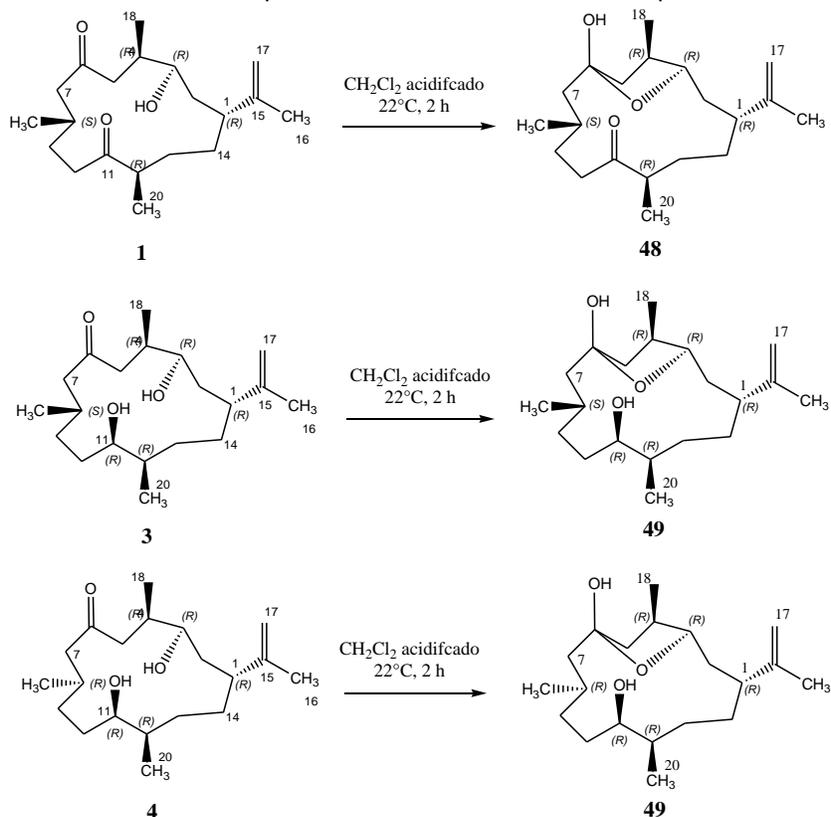


Figura 3.16. Formación de hemiacetales cíclicos a partir de los compuestos **1**, **3** y **4**

Es importante resaltar que de los 34 análogos semi-sintéticos obtenidos (**17-50**), solamente los compuestos **26-30**⁶ y el compuesto **46**,¹⁶ han sido previamente reportados en la literatura química, lográndose de este modo obtener 28 nuevos análogos tipo cembrano con una gran diversidad estructural, los cuales pueden ser utilizados para posteriores estudios de relación estructura-actividad frente a una amplia variedad de dianas biológicas, ya que otros compuestos con estructura tipo cembrano reportados en la literatura han exhibido estas actividades.¹⁷

3.5. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD *ANTIFOULING* DE LOS ANALOGOS SINTÉTICOS³

3.5.1. Ensayo de IQS en los análogos sintéticos 17-50

En la Tabla 3.1 se muestran todos los compuestos que fueron evaluados en el ensayo de IQS usando *Chromobacterium violaceum* como biosensor; cada compuesto fue evaluado a las concentraciones de 2.5, 5.0, 7.5, 15.0 y 30.0 µg/disco. Se empleó ácido kójico como control positivo, debido a que es un compuesto reconocido como inhibidor de los sistemas de *Quorum Sensing*,⁷ así como el óxido cuproso un conocido agente *antifouling* comercial.¹³ Los productos naturales **1**, **3**, **4**, **13**, **15** y **16** fueron seleccionados como cabezas de serie para la síntesis de **34** análogos tipo cembrano (**17-50**), debido a que algunos de estos precursores naturales mostraron actividad IQS o actividad inhibitoria del biofilm bacteriano, o las dos como en el caso del compuesto **3**. Es importante mencionar que, algunos de los cembranos co-aislados (ver

¹⁷ Newman, D. J.; Cragg, G. M. **2012**. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.* 75, 311-335.

capítulo 2), mostraron una buena actividad IQS y de biofilm bacteriano, como por ejemplo la 8*R*-dehidroxiplexauroolona (**6**), la 8*S*-dehidroxiplexauroolona (**7**), el 11(*R*)-hidroxi-12(20)-en-knightal (**10**), el acetato de 11(*R*)-hidroxi-12(20)-en-knightol (**11**) y el knightal (**14**),^{1,2} sin embargo, estos compuestos no fueron seleccionados como cabezas de serie debido a la poca cantidad en la que fueron aislados, pero si fueron una base para establecer algunas relaciones de estructura-actividad y de este modo plantear las transformaciones químicas realizadas.

De acuerdo a los resultados consignados en la Tabla 3.1, se pudo establecer que la mitad de los análogos tipo cembrano presentaron actividad IQS sin inhibir el crecimiento del biosensor utilizado, y es importante notar que dieciséis de los análogos que resultaron activos se obtuvieron a partir de cinco compuestos naturales que no eran activos (en el ensayo de IQS) y dos análogos activos (**46**, **49**) fueron obtenidos a partir del compuesto natural activo **3**. Adicionalmente, debido a que el crecimiento bacteriano de *C. violaceum* no fue inhibido por estos análogos sintéticos, fue posible establecer que la inhibición del pigmento violeta es causado por la interrupción de los sistemas de QS. Teniendo en cuenta lo anterior, si no hay un efecto bactericida, no hay una presión selectiva para crear resistencia en las bacterias.^{1,2,9} De los compuestos sintéticos los que presentan la mejor actividad IQS son: **18** (2.5 µg/disco), **23** (5.0 µg/disco) y **28** (2.5 µg/disco), los cuales tienen características estructuras similares: e.g. un grupo hidroximetino en C-7*R*, un doble enlace con configuración *E* entre los carbonos C-8 y C-9 y un grupo acetilo en C-18, lo anterior nos permitió inferir que la presencia de un rearrreglo *E*-hidroxi alílico es altamente relevante para la actividad. Otros análogos sintéticos que resultaron activos (**17**, **20**, **21**, **27**, **29**, **35**, **45** y **49**; todos mostraron actividad QSI a 7.5 µg/disco) también presentaron un núcleo oxigenado, particularmente en C-2, C-7 y C-18 como en los compuestos anteriores (excepto para **45** y **49**), pero difieren en la posición y geometría del doble enlace en el C-8. Los demás compuestos activos presentados en la Tabla 3.1, presentan actividad inhibitoria de QS a 15.0 y 30.0 µg/disco, una dosis superior a la requerida por la mayoría de los compuestos más activos, pero menor que la requerida por los controles positivos usados, ácido kójico (90.0 µg/disco) y óxido cuproso (40 µg/disco). En general, las reacciones de síntesis llevaron a mejorar o inducir la actividad IQS de los compuestos naturales escogidos como cabezas de serie y es de resaltar que los análogos de cembranos más activos (**18**, **23** y **28**) fueron más potentes que los productos naturales más activos previamente aislados y reportados en el capítulo 2, como por ejemplo el 11(*R*)-hidroxi-12(20)-en-knightal (**10**) a 7.5 µg/disco, el acetato de 11(*R*)-hidroxi-12(20)-en-knightol (**11**) a 15.0 µg/disco y el knightal (**14**) a 7.5 µg/disco; logrando de este modo alcanzar nuestro objetivo principal de potenciar u obtener análogos de cembranos con mayor actividad IQS. Otros estudios más extensos acerca de la relación estructura-actividad inhibitoria de QS para estos compuestos, se están realizando en nuestro grupo de investigación.

Al igual que para los compuestos naturales, los datos obtenidos de IQS de los compuestos análogos (**17-50**) fueron comparados contra los datos reportados en la literatura para diferentes tipos de compuestos, estableciendo claramente que éstos análogos presentan mejores propiedades inhibitorias de QS, debido a que los compuestos **18** y **28** presentan los mejores valores de IQS (2.5 µg/disco) y estos valores superan ampliamente a los reportados por Schmitt-Kopplin y colaboradores en el 2013¹⁸ (50 µg/disco para el cinamaldehído), a los de microdilución reportados por Schulz y colaboradores¹⁹ (312 µg/mL para la 10-metilundecan-5-olido), a los depsipéptidos solonamidas A y B (5000 µg/mL) reportados por Mansson, *et al*,²⁰ y finalmente al ácido lyngbyoico (212 µg/mL) reportado por Kwan y colaboradores.²¹ Como se había mencionado en el capítulo 2 y hasta nuestro conocimiento, no se encontraron reportes de otros compuestos con núcleo cembrano como inhibidores de QS con los cuales hacer una comparación directa a nivel de estructura.

¹⁸ Jha, B.; Kavita, k.; Westphal, J.; Hartmann, A.; Schmitt-Kopplin, P. **2013**. Quorum sensing inhibition by *Asparagopsis taxiformis*, a marine macro alga: separation of the compound that interrupts bacterial communication *Mar. Drugs* **11**, 253-265.

¹⁹ Schulz S.; Dickschat, J. S.; Kunze, B.; Wagner-Dobler, I.; Diestel, R.; Sasse, F. **2010**. Biological activity of volatiles from marine and terrestrial bacteria. *Mar. Drugs* **8**, 2976-2987.

²⁰ Mansson, M.; Nielsen, A.; Kjærulff, L.; Gotfredsen, C. H.; Wietz, M.; Ingmer, H.; Gram, L.; Larsen, T.O. **2011**. Inhibition of virulence gene expression in *Staphylococcus aureus* by novel depsipeptides from a marine *Photobacterium*. *Mar. Drugs* **9**, 2537-2552.

²¹ Kwan, J. C.; Meickle, T.; Ladwa, D.; Teplitski, M.; Paul, V.; Luesch, H. **2011**. Lyngbyoic acid, a "tagged" fatty acid from a marine cyanobacterium, disrupts quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. BioSyst.* **7**, 1205-1216.

Tabla 3.1. Inhibición de *quorum sensing* y del biofilm bacteriano de los compuestos cabeza de serie y de sus análogos sintéticos **17-50**

Ensayo	Inhibición de <i>Quorum sensing</i> ^a (cantidad en µg/disco) ^b		Inhibición del biofilm IC ₅₀ (ppm) ^c	
	<i>Chromobacterium violaceum</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Vibrio harveyi</i>
1	-	4.0	10.1	17.1
3	7.5	11.5	>100.0	11.0
4	-	17.2	>100.0	>100.0
13	-	12.8	0.3	>100.0
15	-	14.7	0.5	>100.0
16	-	5.0	0.01	80.2
17	7.5	52.3	3.2	21.4
18	2.5	3.7	1.8	5.8
19	-	37.4	0.13	34.5
20	7.5	57.3	0.04	1.2
21	7.5	21.6	1.3	16.8
22	-	49,8	35.5	>100.0
23	5.0	23,8	11.7	17.3
24	-	>100.0	>100.0	>100.0
25	-	>100.0	>100.0	>100.0
26	-	52.9	15.7	7.8
27	7.5	52.5	0.03	53.1
28	2.5	56.1	2.2	>100.0
29	7.5	56.0	3.1	>100.0
30	-	>100.0	1.2	>100.0
31	30.0	>100.0	>100.0	>100.0
32	-	>100.0	0.8	>100.0
33	-	>100.0	8.5	>100.0
34	30.0	>100.0	0.6	>100.0
35	7.5	47.2	0.01	6.2
36	30.0	46.2	0.02	62.5
37	30.0	51.4	0.07	14.5
38	-	>100.0	20.0	10,4
39	-	>100.0	81.5	>100.0
40	-	>100.0	>100.0	>100.0
41	-	33.6	3.1	38.3
42	-	28.5	0.30	2.6
43	-	43.5	4.2	52.5
44	-	>100.0	2.1	>100.0
45	7.5	>100.0	>100.0	>100.0
46	30.0	>100.0	>100.0	>100.0
47	15.0	>100.0	>100.0	>100.0
48	-	>100.0	>100.0	84.4
49	7.5	>100.0	>100.0	>100.0
50	-	>100.0	>100.0	>100.0
Ácido kójico	90.0	17.2	24.7	>100.0
Cu ₂ O	40.0	ND	ND	ND
Solvente	-	NI	NI	NI

^a La actividad fue medida teniendo en cuenta la inhibición del pigmento violeta. ^b Mínima cantidad requerida en µg por disco del compuesto para inhibir la producción del pigmento violeta. – No hay zona de inhibición inclusive a 30 µg/disco.

^c Concentración que inhibe el 50% del biofilm. ND No determinado. NI No hay inhibición del biofilm

3.5.2. Ensayo de inhibición de Biofilm bacteriano en los análogos sintéticos 17-50

Para los ensayos de inhibición del biofilm bacteriano se emplearon las siguientes bacterias modelo: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (Gram negativa), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Gram positiva) y *Vibrio harveyi* PHY-2A (Gram negativa). Los análogos sintéticos tipo cembrano **17-50** fueron usados en este bioensayo con el fin de evaluar su capacidad de inhibir la formación del biofilm producido por las bacterias modelo. Los bioensayos se realizaron en placas multipozo de 96, como se describió previamente en el capítulo 2, numeral 2.9.2, y en Tello, *et al*, 2011,¹ 2012² y 2013.³ Para todos los compuestos se calculó el IC₅₀ en ppm y los datos son reportados en la Tabla 3.1.

Los resultados de inhibición mostraron que aproximadamente la mitad de los análogos sintéticos inhibieron la formación de biofilm en las tres cepas bacterianas usadas como modelo a concentraciones menores que 100.0 ppm. Se pudo establecer, que varios compuestos que no presentaron IQS, tampoco presentaron inhibición de la formación del biofilm en las tres cepas biosensoras evaluadas, como es el caso de los compuestos **24, 25, 40 y 50**, sin embargo no fue una tendencia generalizada. En el caso contrario, todos los compuestos que presentaron IQS mostraron inhibición del biofilm bacteriano en al menos una de las tres cepas usadas, a excepción de los compuestos **31, 45-47 y 49**. También, fue evidente que algunos de los análogos sintéticos presentaron mejor actividad inhibitoria del biofilm que sus precursores naturales usados como cabezas de serie (**1, 3, 4, 13, 15 y 16**), logrando en varios casos inducir la actividad o incrementarla y de este modo cumplir con uno de los objetivos de esta tesis. Se pudo establecer que la mayoría de los análogos tipo cembrano, exhibieron una excelente actividad para inhibir la formación del biofilm contra la bacteria Gram positiva *S. aureus*, aunque contra las bacterias Gram negativas *P. aeruginosa* and *V. harveyi* también se obtuvieron buenos resultados. De forma particular, nueve análogos inhibieron la bacteria *S. aureus* a concentraciones menores que 1.0 ppm, diez cembranos inhibieron la misma cepa a concentraciones entre 1.0 y 10.0 ppm y cinco entre 10.0 y 100.0 ppm. Los compuestos que presentaron la mejor potencia contra esta cepa biosensora fueron **19, 20, 27, 32, 34-37 y 42**, siendo entre ellos, los compuestos **20** (0.04 ppm), **27** (0.03 ppm), **35** (0.01 ppm), **36** (0.02 ppm) y **37** (0.07 ppm) los de mayor potencia ya que resultaron ser hasta 2000 veces más activos que el reconocido inhibidor de QS ácido kójico, el cual presentó un IC₅₀ de 24.7 ppm. Contra la bacteria *P. aeruginosa*, tan solo el compuesto **18** (3.7 ppm) presentó un valor de IC₅₀ inferior que el control positivo ácido kójico (17.2 ppm), pero es importante mencionar que dieciséis análogos tipo cembrano presentaron valores de IC₅₀ entre 10.0 y 100.0 ppm. Finalmente, contra la bacteria *V. harveyi* cinco análogos sintéticos (**18, 20, 26, 35 y 42**) mostraron actividad a concentraciones más bajas que 10.0 ppm, siendo los compuestos **20 y 42** los más activos con valores de IC₅₀ de 1.2 y 2.6 ppm, respectivamente. Adicionalmente, once compuestos presentaron valores de IC₅₀ entre 10.0 y 100.0 ppm, los cuales siguen siendo más activos que el control positivo usado ácido kójico el cual presentó un valor IC₅₀ superior a 100.0 ppm contra esta cepa biosensora. Es de resaltar que la inhibición del biofilm se logró en todos los casos sin interrupción del crecimiento bacteriano en las cepas usadas, aún a la concentración más alta evaluada (100.0 ppm). El hecho de que los compuestos **17, 18, 20, 21, 23, 27, 28, 29, 34, 35-37** presentaran actividad IQS y de inhibición del biofilm, sugiere que estos compuestos interfieren en la comunicación bacteriana, evitando el desarrollo o maduración del biofilm bacteriano y el desarrollo sucesivo de las comunidades bacterianas, y como consecuencia, afecta la asociación de otras especies a la superficie, lo que podría probablemente evitar los pasos posteriores del proceso del *fouling* como fue descrito en el capítulo 1.

Al igual que para los compuestos naturales, se realizó la comparación de los resultados de inhibición del biofilm bacteriano contra los resultados encontrados en la literatura, estableciendo que los análogos tipo cembrano presentan una excelente actividad y baja toxicidad comparados con otros productos naturales reportados, por ejemplo: la oroidina presentó un IC₅₀ de 0.26 ppm contra *P. aeruginosa* y un IC₅₀ de 35 ppm contra *Acinetobacter baumannii*,²² el dictiol C inhibió la formación del biofilm en la cepa bacteriana

²² Richards, J. J.; Melander, C. **2009**. Controlling Bacterial Biofilms. *ChemBioChem*, *10*, 2287–2294.

Pseudoalteromonas sp. D41,²³ a un IC₅₀ de 9.2 ppm y la oxima de la agelasina D mostró una CMI de 0.027 ppm contra *Staphylococcus epidermis*.²⁴ Estos valores de IC₅₀ fueron mayores a los reportados por nosotros aquí para algunos de los análogos sintéticos contra la bacteria biosensora *S. aureus*, e.g. compuesto **20** (IC₅₀ 0.04 ppm), compuesto **27** (IC₅₀ 0.03 ppm), compuesto **35** (IC₅₀ 0.01 ppm), compuesto **36** (IC₅₀ 0.02 ppm) y compuesto **37** (IC₅₀ 0.07 ppm) (Tabla 3.1).

Como en los casos anteriores, se deben tener en cuenta algunas consideraciones en la relación estructura-actividad de los compuestos evaluados en este bioensayo, e.g. la presencia de un grupo electronegativo sobre C-7 (en la mayoría de compuestos oxígeno) es altamente relevante para la actividad, ya que los compuestos más activos presentaron esta funcionalidad; también, la formación de un doble enlace con configuración *E* en C-8,9 es uno de los rearrreglos más importantes para incrementar o inducir la actividad inhibitoria de biofilm, ya que su ausencia o formación del isómero *Z* disminuye la actividad, la presencia de átomos electronegativos sobre C-2 y C-18 (oxígeno) potencian esta actividad como puede observarse en todos los compuestos más activos en este bioensayo, con excepción del compuesto **23**; finalmente, la formación de un exometileno en C-8,19 también presenta un efecto positivo en la actividad como puede apreciarse en los compuestos **17** y **27**.

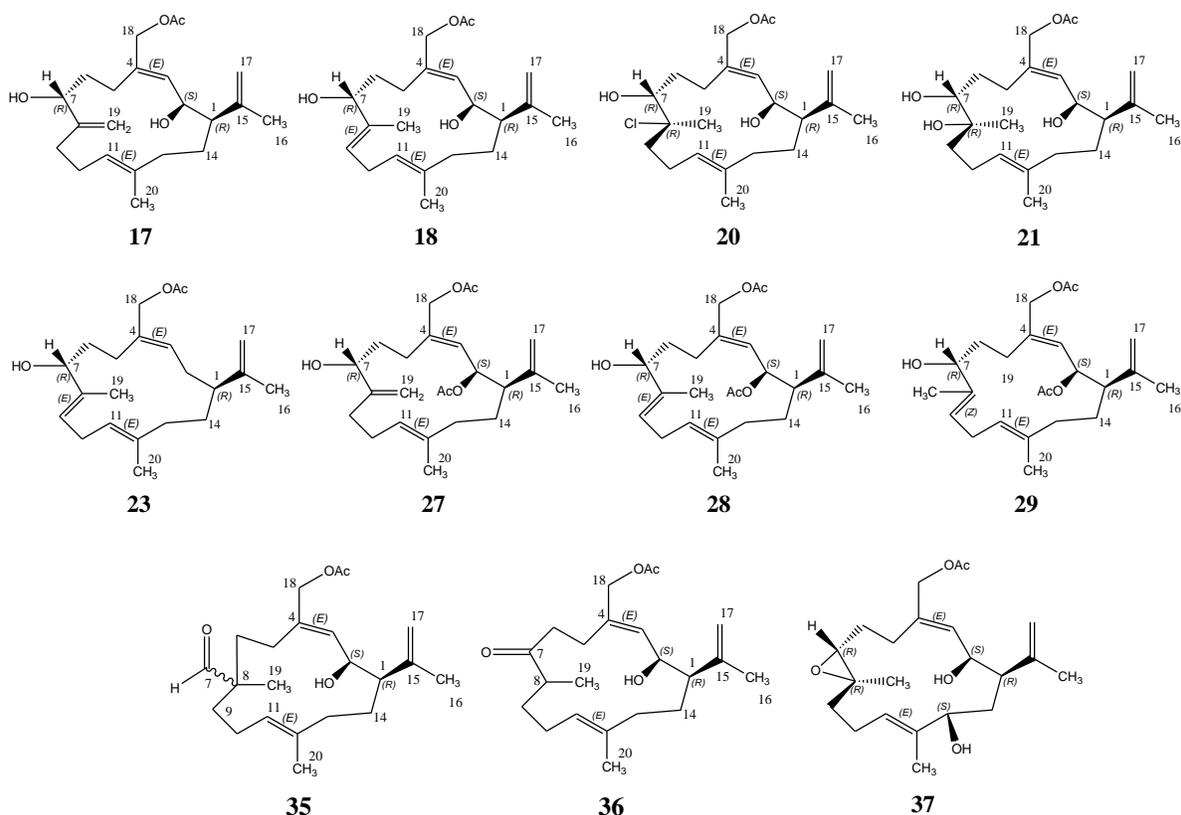


Figura 3.17. Compuestos más activos en los bioensayos IQS e inhibición de biofilm

En resumen, se seleccionaron seis compuestos naturales como cabezas de serie (**1**, **3**, **4**, **13**, **15** y **16**) para intentar inducir o mejorar sus propiedades *antifouling*, mediante transformaciones químicas aplicadas

²³ Viano, Y.; Bonhomme, D.; Camps, M.; Briand, J. F.; Ortalo-Magné, A.; Blache, Y.; Piovetti, L.; Culioli, G. **2009**. Diterpenoids from the Mediterranean brown alga *Dictyota* sp. evaluated as antifouling substances against a marine bacterial biofilm. *J. Nat. Prod.* **72**, 1299–1304.

²⁴ Hertiani, T.; Edrada-Ebel, R.; Ortlepp, S.; Van Soest, R. W. M.; De Voogd, N. J.; Wray, V.; Hentschel, U.; Kozytska, S.; Muller, W. E. G.; Proksch, P. **2010**. From anti-fouling to biofilm inhibition: New cytotoxic secondary metabolites from two Indonesian Agelas sponges. *Bioorg. Med. Chem.* **18**, 1297–1311.

selectivamente en diferentes lugares activos del núcleo cembrano. Como resultado, se obtuvieron treinta y cuatro análogos de cembranos (**17-50**), siendo, la mitad de ellos notablemente activos en los bioensayos de IQS contra la cepa biosensora *C. violaceum* y en la inhibición del biofilm bacteriano contra las cepas *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *V. harveyi*, todo esto sin interferir con el crecimiento bacteriano. Es importante resaltar que de los 34 análogos semi-sintéticos obtenidos, solamente los compuestos **26-30**⁶ y el compuesto **46**,¹⁶ han sido previamente reportados en la literatura química, lográndose de este modo obtener veintiocho nuevos análogos tipo cembrano con una gran diversidad estructural. Adicionalmente, se obtuvo un selecto grupo de cembranos estructuralmente relacionados (**17, 18, 20, 21, 23, 27, 28, 35-37**) (Figura 3.17) como inhibidores de QS y del biofilm bacteriano, lo que los hace excelentes candidatos para ser usados como agentes activos en pinturas *antifouling* comerciales, ya que los compuestos inhibidores del biofilm e inhibidores de QS son a menudo considerados como potentes agentes *antifouling*.²⁵ Este selecto grupo de análogos sintéticos tipo cembrano (**17-50**), junto con los compuestos naturales (**1-16**), pueden servir para posteriores estudios de actividad biológica, por ejemplo anticancerígena, antiinflamatoria y hasta como inhibidores de acetilcolinesterasa, ya que otros compuestos tipo cembrano estudiados previamente han exhibido estas actividades,^{17,26} también, esta base de datos reportada en esta tesis puede ser útil en futuros estudios REA.

²⁵ Fusetani, N. **2011**. Antifouling marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 28, 400-410.

²⁶ Blunt, J. W.; Coop, B. R.; Keyzers, R. A.; Munro, M. H. G.; Prinsep, M. R. **2012**. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 29, 144-222 y años anteriores

4. ENSAYO DE CAMPO

Los ensayos *in vitro* realizados con los cembranos (Capítulos 2 y 3) permitieron establecer que algunos de ellos son excelentes inhibidores de la comunicación bacteriana y consecuentemente de la formación del biofilm bacteriano. Tales bioensayos brindan una amplia información sobre la capacidad de inhibición del *microfouling* debido a que la formación de los biofilms es considerada como el paso inicial en el desarrollo del *fouling*. Adicionalmente el quorum sensing (QS) controla la maduración del biofilm bacteriano, por lo cual el uso de compuestos químicos como interferentes en estos procesos ha sido propuesto como una aproximación potencial para el control del *micro* y *macrofouling*.^{1,2,3} De este modo es lógico pensar que los resultados obtenidos en bioensayos contra el *microfouling* podrían ser aplicables al control del *macrofouling*. Sin embargo, es una idea generalizada en la comunidad científica, que no hay un ensayo específico para estimar las propiedades *antifouling* de un compuesto, debido a que los resultados que se obtienen en el laboratorio no dan información completa acerca de sus propiedades como inhibidor de los diversos y potenciales organismos colonizadores, por lo cual es mejor hacer una prueba donde existan muchos organismos colonizadores como en el medio natural. Estos ensayos *in situ* permiten exponer un compuesto a los diversos organismos que potencialmente pueden fijarse a una superficie, en un entorno más cercano a la condición real. Sin embargo, los ensayos en campo tienen limitaciones como la cantidad de muestra requerida y el cuidado del experimento durante largos periodos de tiempo.

Para evaluar de una manera más precisa las propiedades *antifouling* de los cembranos obtenidos en los capítulos 2 y 3, se decidió implementar un ensayo de campo empleando uno de los cembranos más activos en los ensayos *in vitro*. El ensayo fue realizado bajo la dirección de la Profesora Mónica Puyana de la Universidad Jorge Tadeo Lozano, adaptando métodos previamente utilizados por su grupo de investigación. Brevemente, los ensayos de exposición en campo, consisten en incorporar el compuesto a ensayar en una matriz, recubrir una superficie experimental y exponer la superficie al medio marino para evaluar su potencial desempeño *antifouling* contra una serie de organismos (microorganismos, larvas de invertebrados, esporas de algas).

Para la realización del ensayo, se prepararon diferentes formulaciones de pinturas *antifouling* basadas en el compuesto que presentó la mejor actividad inhibitoria de los sistemas de QS y de la formación del biofilm bacteriano en los ensayos *in vitro* (Capítulos 2 y 3), y que a su vez pudiera ser obtenido en cantidades del orden de gramos. Por esta razón se escogió el cembrano **28** (Figura 4.1), el cual puede ser obtenido a partir del cembrano natural asperdiol **15** mediante transformaciones químicas (Figura 4.2). Es importante mencionar que el cembrano **15** fue aislado en cantidades de gramos a partir de tan solo 650 g del octocoral fuente (Capítulo 2).

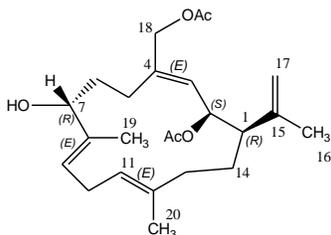


Figura 4.1. Estructura del cembrano **28**

¹ Fusetani, N. **2011**. Antifouling marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **28**, 400-410.

² Nadell, C. D.; Xavier, J. B.; Levin, S. A.; Foster, K. R. **2008**. The evolution of quorum sensing in bacterial biofilms. *PLoS Biology* **6**(1), e14.

³ Briand, J. F. **2009**. Marine antifouling laboratory bioassays: an overview of their diversity. *Biofouling* **25**, 297-311.

El compuesto **28** escogido como principio activo de los recubrimientos experimentales, fue incorporado en dos clases de pinturas para uso marino. Posteriormente, se pintaron paneles cerámicos experimentales que fueron dispuestos en el medio marino por un lapso de seis meses. Pasado ese tiempo se evaluó la cobertura de los diferentes organismos sobre los paneles cerámicos y se evaluó el desempeño de los recubrimientos experimentales en comparación con los controles. El experimento se dispuso en las instalaciones en la isla San Martín de Pajarales, islas der Rosario, Bolívar (10°10'N 75°45' W).

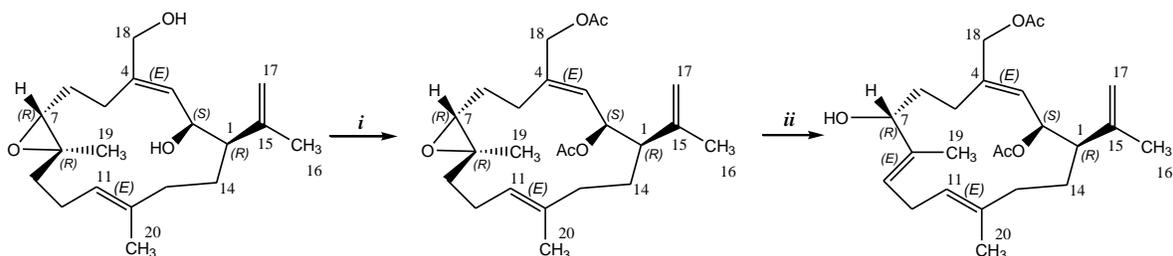


Figura 4.2. Reacciones para la obtención del cembrano *antifouling* **28**

Reactivos y condiciones: *i.* Anhídrido acético/TEA; *ii.* CDCl₃ acidificado/I₂

4.1. METODOLOGÍA

4.1.1. Generalidades

Las reacciones para la obtención del cembrano **28** fueron monitoreadas mediante cromatografía en capa delgada (CCD) usando placas de aluminio cubiertas con gel de sílice 60F₂₅₄ de Merck, visualizadas con luz ultravioleta ($\lambda_{\text{max}} = 254 \text{ nm}$), y luego reveladas con soluciones de sulfato cérico amónico ácido o permanganato de potasio básico.

Las reacciones requirieron condiciones anhidras por lo cual fueron conducidas bajo atmósfera inerte de nitrógeno, todo el material de vidrio utilizado fue previamente flameado o secado en estufa. Los solventes utilizados fueron de grado R.A. y usados directamente del proveedor a no ser que se dé otra indicación en el texto. El diclorometano fue destilado sobre hidruro de calcio.

Para la cromatografía en columna (CC) de compuestos se empleó como adsorbente gel de sílice (63-200 μm) suministrado por Merck.

Los análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) preparativa fueron hechos en un cromatógrafo Merck-Hitachi con un detector UV/Vis L-4250 a 210 nm usando una columna LichroCART RP-18 (250 x 10 mm d.i.; 5 μm), como eluente se utilizó una mezcla de MeOH-H₂O 80:20 a un flujo de 3 mL/min.

Los sustratos utilizados para el ensayo de campo fueron paneles cerámicos cuadrados de 12 cm x 12 cm y 5 mm de espesor, los cuales tenían una cara lisa y una cara rugosa sobre la cual fue aplicado el recubrimiento *antifouling* con las diferentes sustancias a evaluar. Cada panel tenía una perforación en cada esquina con el fin de poder fijar los paneles cerámicos a la superficie sumergida.

Para el ensayo, se utilizaron dos tipos de pinturas como matrices experimentales, la pintura marina de un solo componente (DUNLOP facilitada por la empresa DUNLOP) y la pintura epóxica de dos componentes (EPOXYMASTIC facilitada por la empresa PINTUGRAN).

Como controles positivos se usaron el conocido agente *antifouling* óxido cuproso (Cu₂O) al 30% y el ácido kójico al 0,5%, un reconocido inhibidor de sistemas de quorum sensing,⁴ los cuales fueron adquiridos a la empresa Merck.

4.1.2. Síntesis del cembrano 28 a partir del asperdiol 15

Reacción del compuesto asperdiol 15 con anhídrido acético⁵

El compuesto asperdiol **15** (8,0 g, 25.0 mmol) fue tratado con anhídrido acético (10 mL) en TEA seca (10 mL) durante 24 h, bajo agitación y a temperatura ambiente. El producto fue purificado por cromatografía en columna en sílica gel (hexano–AcOEt 90:10 v/v) para obtener un aceite incoloro correspondiente al compuesto puro diacetilado **26** (9,6 g, 24.0 mmol, 96,0%).

(-)-diacetato de asperdiol 26. Aceite incoloro; $[a]_D^{25}$ -78.3 (c 0.40, CHCl₃); IR (CH₂Cl₂) ν_{\max} 3069, 1739, 1232, 736 cm⁻¹; RMN ¹H y ¹³C idénticos a los reportados en el capítulo 3, sección 3.2.1.

Reacción del diacetato de asperdiol 26 con CDCl₃ acidificado

El compuesto **26** (9.6 g, 24.0 mmol) fue disuelto en CDCl₃ (20 mL) y un cristal de yodo fue posteriormente adicionado. Luego, 20 mL de CDCl₃ acidificado (HCl_(g)) fue burbujado en 20 mL de CDCl₃ durante 1 minuto) fueron adicionados a la mezcla de reacción.^{5,6,7} Después de 36 h, la reacción fue detenida y los productos purificados mediante cromatografía en columna en sílica gel, eluyendo con hexano–AcOEt (90:10 v/v) para producir el compuesto puro **28** (isómero *E*) (2.07 g, 5.16 mmol, 21.5%).

(-)-(1R,2S,7R,3E,8E,11E)-2,18-diacetoxicembra-3,8,11,15(17)-tetraen-7-ol 28. Aceite incoloro; $[a]_D^{25}$ -155.0 (c 0.10, CHCl₃); IR (CH₂Cl₂) ν_{\max} 3455, 1739, 1234, 736 cm⁻¹; RMN ¹H y ¹³C idénticos a los reportados en el capítulo 3, sección 3.2.1.

4.1.3. Ensayo de campo

Preparación de las pinturas

Para establecer el potencial como agente *antifouling* del compuesto **28** se prepararon diferentes formulaciones, las cuales fueron evaluadas en el ensayo de campo. Para la preparación se seleccionaron dos tipos de pinturas comerciales como matrices, una pintura marina de un solo componente (DUNLOP) y una pintura epóxica de dos componentes (EPOXYMASTIC). Ambas fueron escogidas teniendo en cuenta su resistencia al agua de mar durante el periodo de prueba (6 meses), ausencia de agentes biocidas como óxidos de plomo y cobre, ausencia de alguicidas y capacidad de lixiviación del principio activo al medio marino. Los principios activos fueron: el cembrano **28**, el ácido kójico un reconocido inhibidor de los sistemas de QS y el óxido cuproso (Cu₂O) uno de los principales agentes *antifouling* utilizados en recubrimientos industriales.^{4,8} Las formulaciones I-XII fueron preparadas disolviendo los principios activos en

⁴ Dobretsov, S.; Teplitski, M.; Bayer, M.; Gunasekera, S.; Proksch, P.; Paul, V. J. **2011**. Inhibition of marine biofouling by bacterial quorum sensing inhibitors. *Biofouling* 27, 893-905.

⁵ Tello, E.; Castellanos, L.; Arévalo, C.; Duque, C. **2009**. New cembranoid diterpenes from the Caribbean sea whip *Eunicea knightii*. *J. Nat. Prod.* 72, 1595-1602.

⁶ Greenland, J. G.; Bowden, B. F. **1994**. Cembranoid diterpenes related to sarcophytol A from the soft coral Sarcophyton trocheliophorum (*Alcyonacea*). *Aust. J. Chem.* 47, 2013-2021.

⁷ Tello, E.; Castellanos, L.; Arevalo-Ferro, C.; Duque, C. **2012**. Disruption in quorum sensing systems and biofilm inhibition of bacteria by cembranoid diterpenes isolated from the octocoral *Eunicea knightii*. *J. Nat. Prod.* 75, 1637-1642.

⁸ Omae, I. **2003**. General aspects of tin-free antifouling paints. *Chem. Rev.* 103, 3431-3448.

acetona y posteriormente fueron adicionados y homogeneizados en las matrices escogidas en las cantidades que se describen en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Formulación de los recubrimientos *antifouling* experimentales para la evaluación en campo del potencial *antifouling* del cembrano semisintético 28 en comparación con el ácido kójico, un reconocido inhibidor de los sistemas de QS, y el óxido cuproso (Cu_2O) uno de los principales agentes *antifouling* utilizados en recubrimientos industriales

Formulación	Pintura ^a	Compuesto 28 (%)	Cu_2O (%)	ácido kójico (%)	matriz (%)	catalizador (%)	acetona (%)
I	1	0.5	0.0	0.0	48.0	48.0	3.5
II	2	0.5	0.0	0.0	96.0	0.0	3.5
III	1	2.0	0.0	0.0	47.0	47.0	4.0
IV	2	2.0	0.0	0.0	94.0	0.0	4.0
V	1	1.0	0.0	1.0	47.0	47.0	4.0
VI	2	1.0	0.0	1.0	94.0	0.0	4.0
VII	1	0.0	0.0	0.5	48.0	48.0	3.5
VIII	2	0.0	0.0	0.5	96.0	0.0	3.5
IX	1	0.0	30.0	0.0	35.0	35.0	0.0
X	2	0.0	30.0	0.0	70.0	0.0	0.0
XI ^b	1	0.0	0.0	0.0	48.0	48.0	4.0
XII ^b	2	0.0	0.0	0.0	96.0	0.0	4.0

^aPintura 1: DUNLOP; Pintura 2: EPOXYMASTIC. Se representa en rojo el principio activo en cada formulación. ^bControles usados

Preparación de los paneles cerámicos

Para evaluar el desempeño de las pinturas escogidas como matrices experimentales, se pintaron cuatro paneles y se dejaron en agua de mar artificial y aireación durante 15 días. Para el ensayo de campo los paneles cerámicos fueron previamente pulidos con papel lija, lavados con agua y posteriormente secados en estufa a 40°C para permitir una mejor fijación de las pinturas sobre su superficie rugosa. Cada uno de los paneles fue debidamente rotulado y pintados con las diferentes formulaciones (I-XII) (Tabla 4.1) las cuales contenían los tres principios activos a ensayar. Se contó con cinco réplicas de cada formulación. En la Figura 4.3 se pueden apreciar los paneles cerámicos utilizados en el bioensayo con y sin las formulaciones.

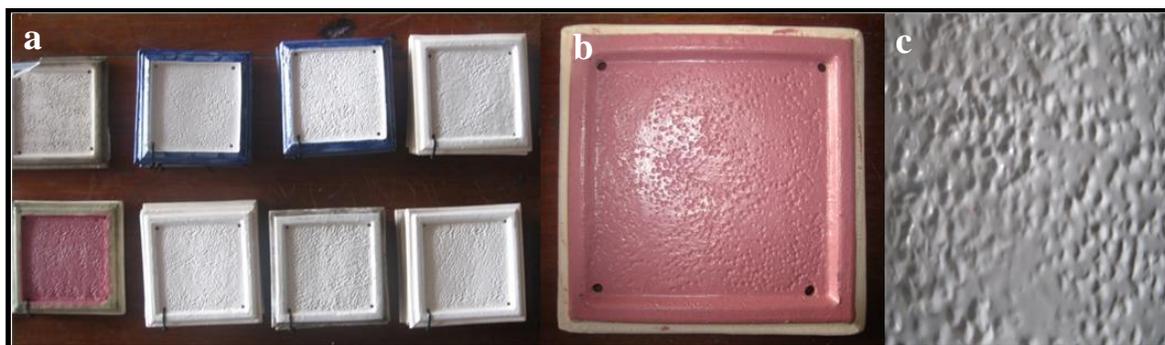


Figura 4.3. Paneles cerámicos y pinturas *antifouling* utilizados en el ensayo de campo. ^aPaneles cerámicos usados en el ensayo de campo. ^bPanel cerámico pintado con una pintura *antifouling* con óxido cuproso (Cu_2O) como principio activo. ^cAmpliación de un panel cerámico pintado con una pintura *antifouling*

Disposición de los paneles cerámicos en el océano

El ensayo de campo fue realizado en las instalaciones del Centro de Investigaciones, Educación y Recreación-CEINER de la Isla San Martín de Pajarales, Islas del Rosario, Caribe Colombiano (10°10'N 75°45'W). Los paneles cerámicos fueron fijados aleatoriamente sobre la malla metálica sumergida que rodea las instalaciones del CEINER a una profundidad entre 2 y 6 metros mediante buceo autónomo SCUBA (Figura 4.4). El desempeño de los recubrimientos *antifouling* experimentales fue evaluado durante un periodo de 6 meses (25 de abril al 25 de octubre de 2012) pero se realizó un monitoreo a los tres meses para establecer que efectivamente los paneles seguían fijados. El ensayo fue desarrollado bajo condiciones naturales y no hubo interacción con agentes externos. Una vez los paneles fueron removidos del medio, se evaluó el porcentaje de cobertura de los principales organismos que recubrieron los mismos. El diseño experimental, disposición, recuperación y análisis de los paneles experimentales fue realizada bajo la dirección de la Profesora Mónica Puyana y con la colaboración en la identificación de los organismos del Biólogo Marino Felipe Nieto de la Universidad Jorge Tadeo Lozano

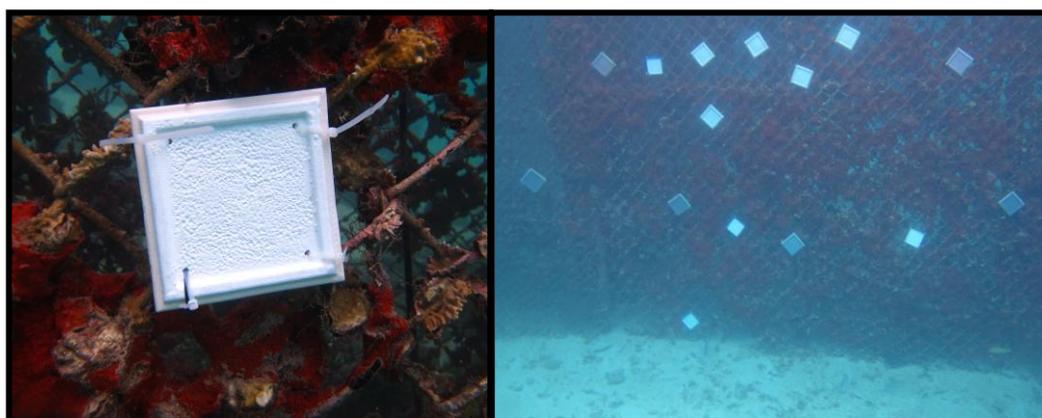


Figura 4.4. Evaluación de recubrimientos *antifouling* experimentales en condiciones naturales de exposición al medio marino. Los paneles experimentales fueron ubicados y sujetos con amarres plásticos sobre la malla metálica sumergida que rodea en las instalaciones del Centro de Investigaciones, Educación y Recreación-CEINER de la Isla San Martín de Pajarales, Islas del Rosario, Caribe Colombiano.

4.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Para obtener el cembrano **28** en cantidades del orden de gramos para el desarrollo del ensayo de campo se procedió a sintetizar este cembrano a partir del precursor asperdiol **15** como se ilustra en la Figura 4.2 y siguiendo la metodología descrita en la sección 4.1.2. Para la realización del ensayo en campo se logró sintetizar 2,07 g del cembrano **28** a partir del precursor asperdiol **15** como se ilustra en la Figura 4.2.

A continuación se presentan los resultados del ensayo de campo expresados como porcentaje promedio de cobertura del área total de cada uno de los ocho tratamientos y de los cuatro controles evaluados (Figuras 4.5-4.10). Los organismos principales responsables del *fouling* sobre los paneles experimentales fueron clasificados algas filamentosas (clorofíceas y rodofíceas), esponjas, tunicados, gusanos poliquetos tubícolas y cianobacterias. Para el análisis de los paneles cerámicos no se tuvieron en cuenta los bordes debido a que estos eran esmaltados y no fueron pintados con los tratamientos, por lo cual solo se evaluó la parte central de las placas.

4.2.1. Resultados generales

Los paneles tratados con el compuesto **28** (Formulaciones I-IV) previnieron completamente el asentamiento del *macrofouling* durante el periodo de prueba. Es importante notar que si bien se observaron algunos cirripedios y bivalvos fijados sobre superficies disponibles en el mismo lugar donde se realizó el experimento, éstos no se encontraron en los paneles utilizados en el ensayo. Los paneles usados como control (Formulaciones XI-XII) fueron completamente cubiertos por organismos como algas filamentosas, esponjas, tunicados, gusanos poliquetos y tubícolas así como cianobacterias, predominando en todos los tratamientos las algas. Finalmente, los paneles tratados con pinturas a base de cobre fueron recubiertos con *microfouling* durante el periodo que duró el ensayo.

4.2.2. Comparación del efecto de la matriz en la actividad *antifouling* de cada uno de los principios activos utilizados en las diferentes formulaciones

El compuesto **28** fue evaluado a una concentración de 0,5% en las dos pinturas (formulaciones I y II, Figura 4.5). Los resultados del ensayo *antifouling* permitieron establecer una cobertura de organismos del *fouling* de aproximadamente 70% sobre los paneles experimentales. Para las formulaciones I y II, la cobertura de clorofíceas fue de 37% y 29% respectivamente, y de esponjas fue de aproximadamente 25% para ambos casos. Finalmente, el porcentaje de cobertura de fue de alrededor del 5% sobre los paneles experimentales.

En las formulaciones III y IV se evaluó el compuesto **28** a un porcentaje de 2,0% en los dos tipos de pinturas (Figura 4.6). Para la formulación III el porcentaje cobertura total fue de 62% y para la formulación IV fue de 52%, siendo las algas filamentosas los organismos más abundantes (aproximadamente 30%) en las dos formulaciones. Las esponjas presentaron un porcentaje de cobertura del 20% para los dos tratamientos y los demás organismos no superaron el 10% en todos los casos.

Compuesto 28 (0.5%)

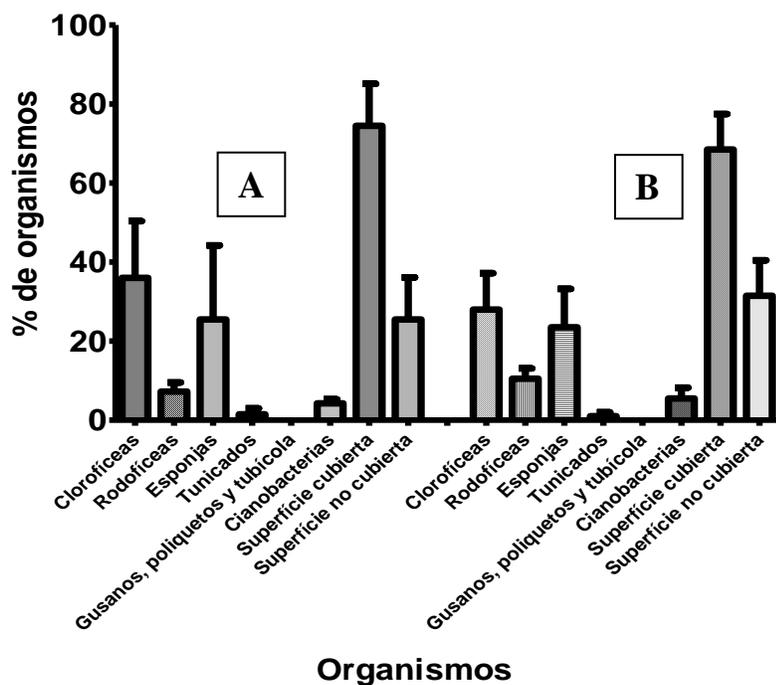


Figura 4.5. Resultados del ensayo *antifouling* en campo expresados como promedio + error estándar del porcentaje de cobertura de organismos asentados y superficie cubierta total. **A.** Formulación I (0,5% compuesto 28 + pintura 1); **B.** Formulación II (0,5% compuesto 28 + pintura 2)

Compuesto 28 (2.0%)

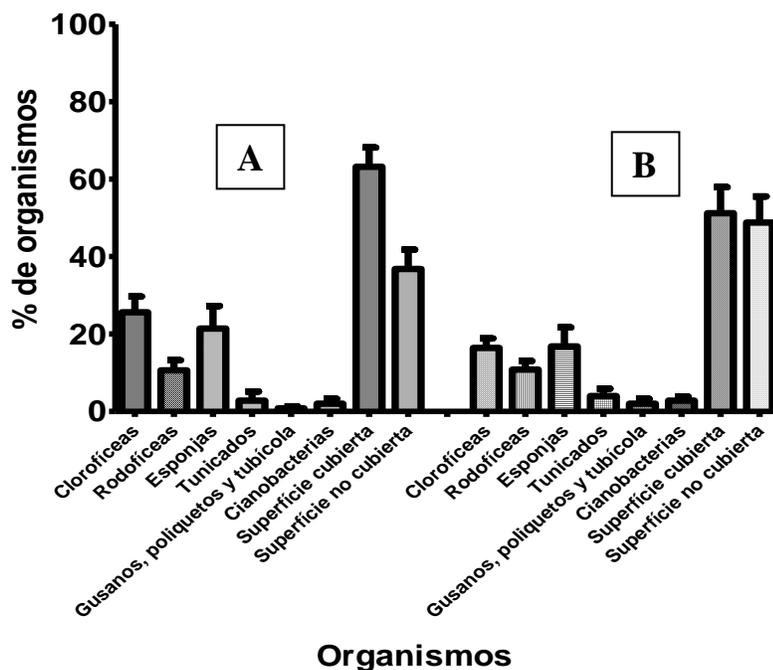


Figura 4.6. Resultados del ensayo *antifouling* en campo expresados como promedio + error estándar del porcentaje de cobertura de organismos asentados y superficie cubierta total. **A.** Formulación III (2,0% compuesto 28 + pintura 1); **B.** Formulación IV (2,0% compuesto 28 + pintura 2)

Compuesto 28 (1.0%) + Ácido kojico (1.0%)

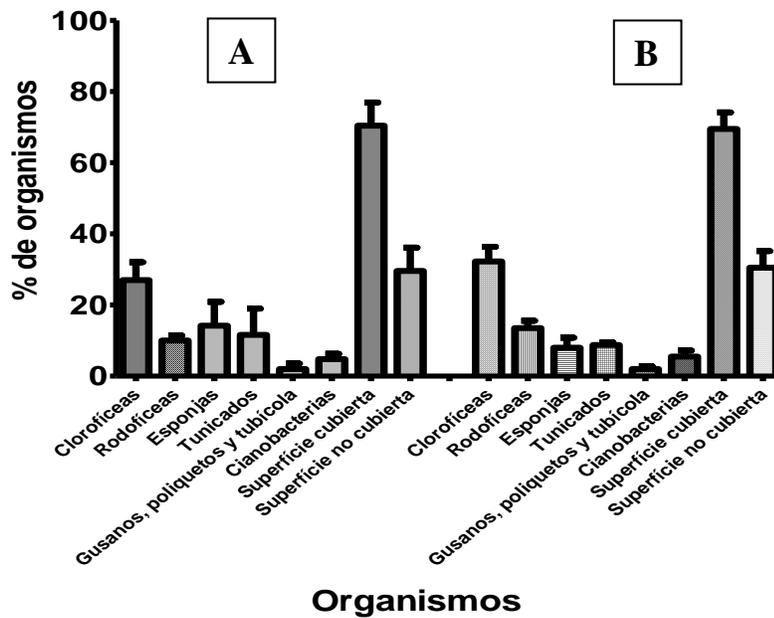


Figura 4.7. Resultados del ensayo *antifouling* expresados como porcentaje de organismos asentados y porcentaje de superficie cubierta total. **A.** Respuesta a la formulación V (1,0% compuesto 28 + 1,0% ácido kójico + pintura 1); **B.** Respuesta a la formulación VI (1,0% compuesto 28 + 1,0% ácido kójico + pintura 2)

Ácido kojico (0.5%)

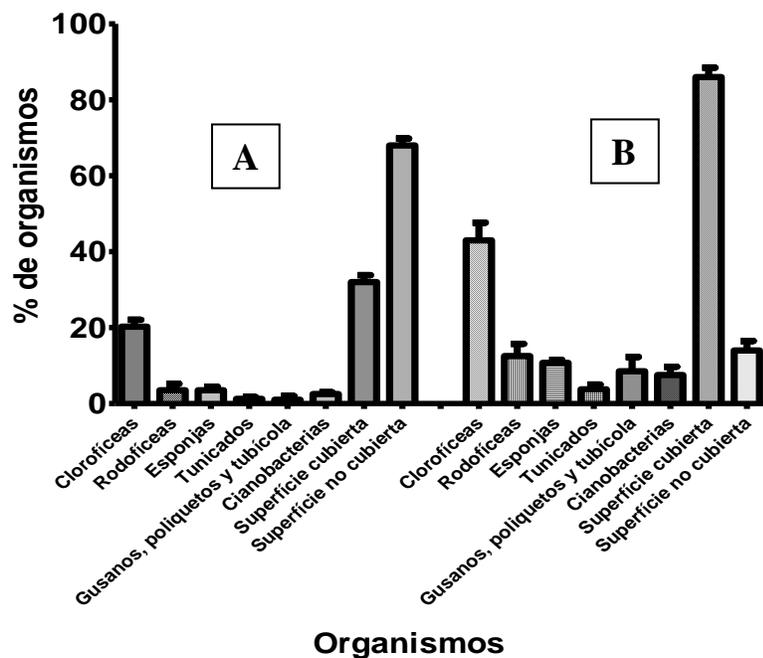


Figura 4.8. Resultados del ensayo *antifouling* expresados como porcentaje de organismos asentados y porcentaje de superficie cubierta total. **A.** Respuesta a la formulación VII (0,5% ácido kójico + pintura 1); **B.** Respuesta a la formulación VIII (0,5% ácido kójico + pintura 2)

Óxido cuproso (Cu₂O)

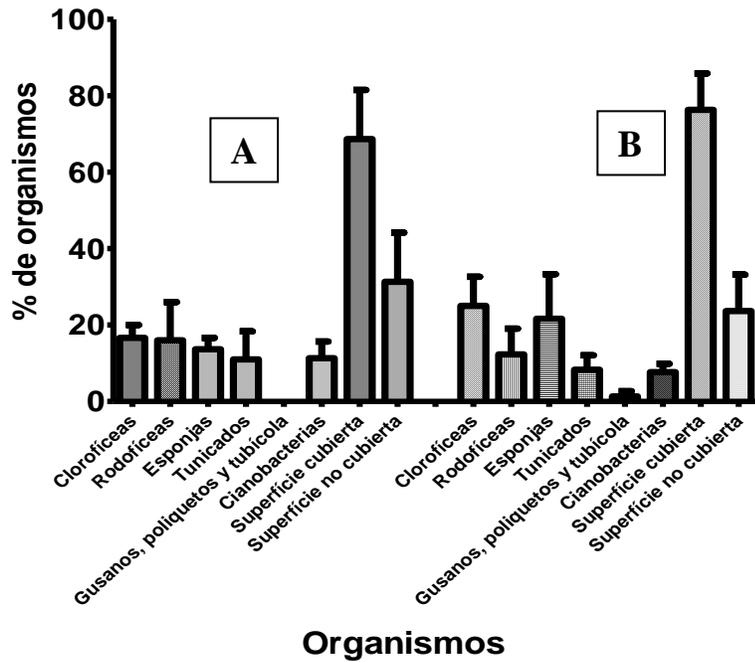


Figura 4.9. Resultados del ensayo *antifouling* expresados como porcentaje de organismos asentados y porcentaje de superficie cubierta total. **A.** Respuesta a la formulación IX (30,0% óxido cuproso + pintura 1); **B.** Respuesta a la formulación X (30,0% óxido cuproso + pintura 2)

Controles

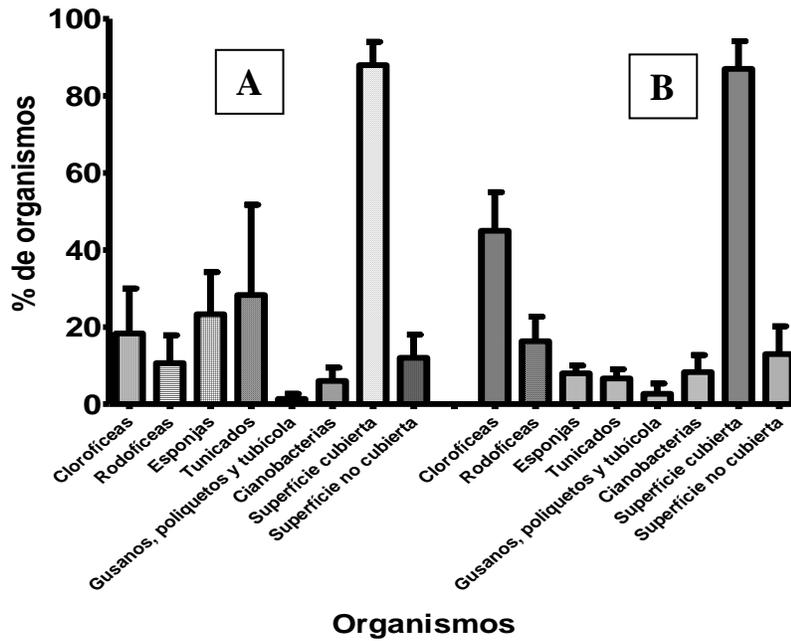


Figura 4.10. Resultados del ensayo *antifouling* expresados como porcentaje de organismos asentados y porcentaje de superficie cubierta total. **A.** Respuesta a la formulación XI (pintura 1); **B.** Respuesta a la formulación XII (pintura 2)

Las formulaciones V y VI, consistieron en evaluar mezclas del ácido kójico al 1,0% junto con el cembrano **28** al 1,0% tanto en matrices de pintura simple (formulación V) y una matriz con catalizador (formulación VI). El ácido kójico es un conocido inhibidor de *fouling*⁴ y por su parte, el compuesto **28** presentó las mejores propiedades *antifouling* en ensayos *in vitro* (inhibición de quorum sensing e inhibición del biofilm bacteriano). Los resultados del ensayo de campo utilizando estas formulaciones permitieron establecer que los organismos del *fouling* presentes en los paneles experimentales recubrieron la superficie hasta en un 70%. Las algas filamentosas, principalmente clorofíceas, fueron los organismos más importantes alcanzando porcentajes de cobertura del 30%. Otros organismos como esponjas y tunicados no superaron el 15% para cada tratamiento (Figura 4.7).

Los recubrimientos elaborados con ácido kójico al 0,5% (formulaciones VII y VIII, Figura 4.8) presentaron un excelente desempeño en cuanto a la inhibición de organismos del *fouling*. En la formulación VII al menos 70% de la superficie de los paneles no fue cubierta y solamente el 20% restante fue cubierto por clorofíceas. Los demás organismos no superaron el 5% de cobertura. Por su parte, en la formulación VIII, el porcentaje de cobertura total fue del 85%, siendo las algas clorofíceas los organismos más abundantes con un 45%. Los organismos restantes no superaron el 10% de cobertura. Es importante mencionar que a pesar que tanto las formulaciones VII y VIII contenían el mismo principio activo en la misma proporción, la formulación VII tuvo un muy buen desempeño mientras que la VIII no. Esta diferencia pudo deberse a las características de la matriz de las pinturas usadas para incorporar el ingrediente activo. La primera matriz fue una pintura marina de un solo componente mientras que la segunda consistió de una pintura epóxica que se prepara mezclándola con un catalizador en una proporción 1:1. Durante el proceso de preparación de la formulación VIII, los componentes de la matriz de pintura pudieron haber reaccionado con el principio activo (ácido kójico) afectando sus propiedades como agente *antifouling*, por efecto de degradación del mismo o probablemente porque tal matriz no permitió una suficiente lixiviación del principio activo al medio marino.

Para comparar el desempeño de los tratamientos, se usó como control pinturas preparadas con óxido cuproso (Cu₂O) al 30%. Las dos formulaciones (IX y X) presentaron en general un porcentaje de cobertura de aproximadamente un 75%, siendo en su mayoría algas filamentosas (40%) seguidas de esponjas (20%) (Figura 4.9).

Los resultados del ensayo de campo mostraron que los paneles recubiertos con formulaciones que no contenían ningún principio activo (formulaciones XI y XII, pintados únicamente con las pinturas 1 y 2) presentaron un porcentaje de cobertura de organismos *fouling* muy alto (Figura 4.10): En ambos casos, la superficie cubierta fue cerca al 90% incluyendo algas filamentosas (clorofíceas y rodofíceas), esponjas, tunicados, gusanos poliquetos tubícolas y cianobacterias. La principal diferencia entre los paneles tratados con las pinturas 1 y 2 fue la presencia de una mayor cantidad de clorofíceas (45% aprox.) en la formulación XI comparada con la formulación XII (20% aprox.). El porcentaje de cobertura los otros organismos que colonizaron la superficie de los paneles fueron similares como puede apreciarse en la Figura 4.10.

4.2.3. Comparación del potencial *antifouling* de las diferentes formulaciones

Todas las formulaciones fueron evaluadas en el ensayo de campo durante seis meses realizando cinco réplicas de cada formulación. Como era de esperarse, los paneles cerámicos usados como controles negativos fueron pintados solamente con las formulaciones XI y XII (pinturas 1 y 2) y éstos fueron los que presentaron un mayor porcentaje de cobertura organismos del *fouling* (Figura 4.11) presentando un porcentaje de cobertura sobre su superficie cercana al 90%.

Porcentaje de área cubierta vs formulación

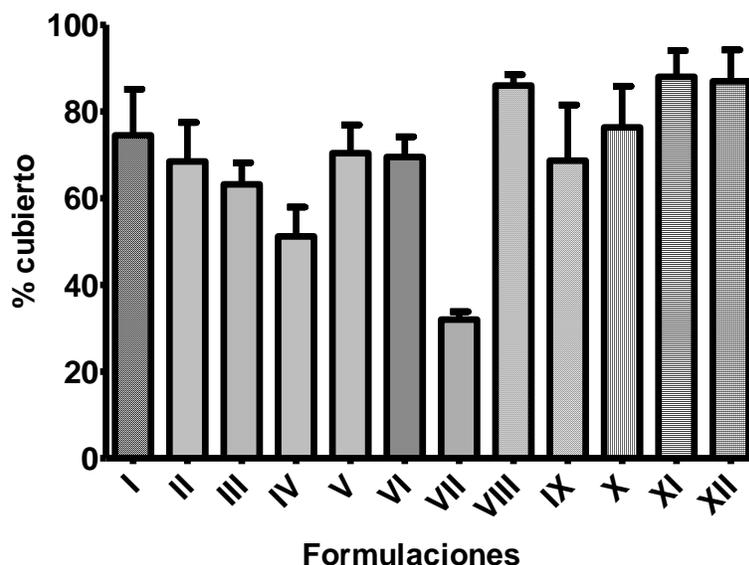


Figura 4.11. Resultados del ensayo *antifouling* para todas las formulaciones (I-XII) expresados como porcentaje de superficie cubierta VER COMENTARIOS EN GRAFICAS ANTERIORES

Para el control positivo con óxido cuproso (Cu_2O), el porcentaje de cobertura fue de 74% en promedio para las formulaciones IX y X (Figura 4.11), lo que permitió establecer que pese al porcentaje tan alto de principio activo (30% p/p) su efectividad como agente *antifouling* durante el periodo de ensayo (seis meses) no fue significativa, sin embargo al inicio del ensayo (1 mes) se pudo apreciar que los paneles cerámicos con estas formulaciones presentaron un buen desempeño *antifouling*, ya que las superficies se mantuvieron libres de organismos colonizadores durante este periodo (Figura 4.12). Es de resaltar que los paneles pintados con las formulaciones IX y X (Cu_2O) inhibieron en más de un 95% el asentamiento y deposición de gusanos poliquetos y tubícolas (Figura 4.9).

Para evaluar el desempeño de un conocido inhibidor de los sistemas de *Quorum Sensing* (ácido kójico), se prepararon las formulaciones VII y VIII, las cuales contenían 0,5% de tal principio activo. Los recubrimientos basados en ácido kójico mostraron una efectiva inhibición de los organismos del *fouling* para la formulación VII (Figura 4.11) comparada con los controles (XI y XII) con una inhibición de asentamiento de organismos del *fouling* cercana al 90%. Al comparar los porcentajes de cobertura de la formulación VII (30%) contra aquellos de las formulaciones XI y XII usadas como controles (cobertura promedio 90%) (Figura 4.11) se pudo establecer claramente el superior desempeño de la formulación VII como agente *antifouling*

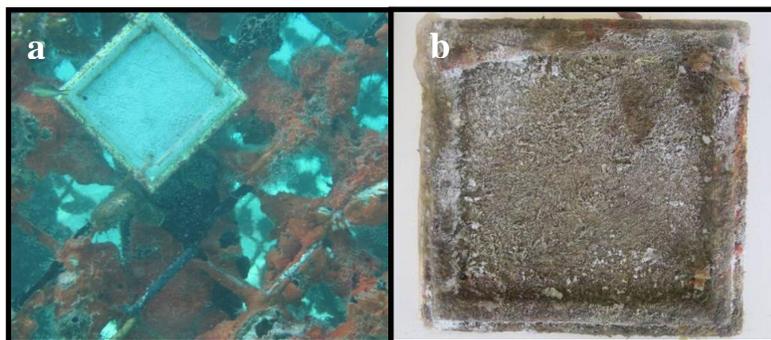


Figura 4.12. Panel cerámico con la formulación IX. **a.** Un mes de prueba; **b.** Seis meses de prueba

El potencial *antifouling* del compuesto **28** fue evaluado de la misma forma que las formulaciones anteriores, pero usando dos concentraciones del compuesto 0,5% y 2,0% (formulaciones I-IV). Se puede establecer que los paneles tratados con las formulaciones I y II (0,5% del compuesto **28**) presentaron al menos un 15% más de inhibición que los controles negativos (Formulación XI, XII; Figura 4.11). Para el caso de las formulaciones con 2,0% de principio activo (III y IV), los resultados del ensayo *antifouling* permitieron establecer que la formulación IV presentó al menos un 40% más de inhibición en comparación con los controles negativos (XI y XII). Al incorporar el compuesto **28** en los recubrimientos, se redujo significativamente el asentamiento de todos los organismos del *fouling*, principalmente cianobacterias y algas filamentosas (clorofíceas) (Figura 4.6).

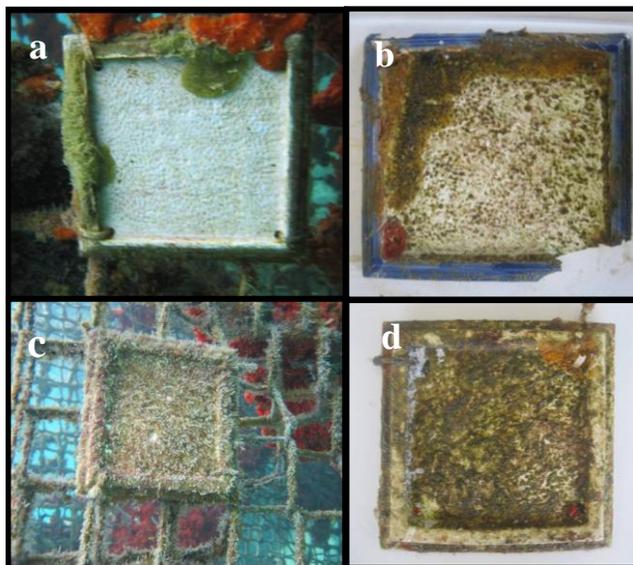


Figura 4.13. Desarrollo del *fouling* sobre los paneles cerámicos durante el ensayo en campo. Paneles cerámicos tratados con la formulación IV luego de (a) tres meses de prueba y (b) seis meses de prueba. Paneles cerámicos sin tratamiento luego de (c) tres meses de prueba y (d) seis meses de prueba

En conclusión, como era de esperarse, los paneles usados como control positivo fueron completamente cubiertos por organismos del *fouling* como algas filamentosas, esponjas, tunicados, gusanos poliquetos tubícolas y cianobacterias, predominando en todos los tratamientos las algas. Los paneles tratados con recubrimientos a base de cobre fueron recubiertos con *microfouling* durante el periodo que duró el ensayo pero mostraron buena actividad *antifouling* contra macroorganismos luego de seis meses de prueba. Los paneles tratados con el compuesto **28** previnieron completamente el asentamiento del *macrofouling* durante el periodo de prueba de la formulación a pesar del notable régimen de *fouling* local. Los resultados anteriores permitieron establecer las excelentes propiedades *antifouling* del cembrano **28** en condiciones naturales, por lo cual este cembrano puede ser utilizado como agente *antifouling* y ser incorporado en recubrimientos industriales para inhibir la fijación y/o adhesión de macroorganismos pertenecientes al *fouling*.

5. DISEÑO DE UNA RUTA SINTÉTICA PARA LA OBTENCIÓN DE COMPUESTOS TIPO CEMBRANO CON ACTIVIDAD ANTIFOULING

De acuerdo a los resultados de actividad *antifouling* obtenidos en los capítulos 2, 3 y 4, se pudo evidenciar claramente que los compuestos tipo cembrano poseen excelentes propiedades que los hacen buenos candidatos como agentes *antifouling* para usarlos en recubrimientos industriales. Sin embargo, la extracción de grandes cantidades de estos compuestos a partir de su fuente natural, los octocorales, para uso industrial o comercial no puede ser la vía de obtención, hoy en día es clara la importancia del uso sostenible de los recursos naturales. Es bien sabido, que la recolección y uso indiscriminado de estos organismos ha llevado a muchos de ellos a su extinción o a estar al borde de ella, así como a la destrucción de *hábitats* de diversas comunidades de octocorales, por lo cual, numerosas áreas del conocimiento están actualmente encaminando sus estudios hacia la obtención de compuestos bioactivos, mediante la utilización de técnicas y métodos sustentables; entre ellas se cuentan, maricultura, acuicultura, síntesis y semi-síntesis, métodos biosintéticos, cultivos celulares, ingeniería genética, cultivo de microorganismos. Por todo lo anterior y conscientes de la necesidad de obtener este tipo de compuestos en grandes cantidades (gramos), se optó por la síntesis como herramienta para el desarrollo de esta parte del trabajo.

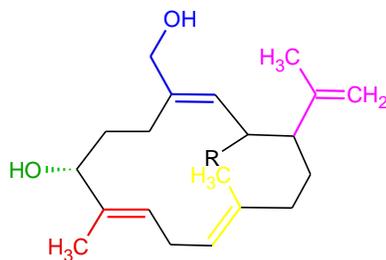
Para el desarrollo de una ruta sintética que permita la obtención de la estructura tipo cembrano que presentó las funcionalidades y arreglos espaciales determinantes en la actividad *antifouling*, como fue establecido en los capítulos 2 y 3, y comprobado mediante la evaluación de su actividad *antifouling* en el ensayo de campo en el capítulo 4, se realizó una revisión acerca de algunas metodologías utilizadas para la síntesis de cembranos, para de este modo plantear una estrategia sintética que nos permitiera obtener un cembrano con las características estructurales que han potenciado su actividad *antifouling*, a saber, un anillo de 14 miembros con un doble enlace trisustituido en C-8,9 con configuración *E* (rojo), la presencia de un grupo hidroxilo en C-7 con configuración *R* (verde), un metileno carbinólico vinílico en C-18 (azul), un doble enlace trisustituido con configuración *E* sobre C-11,12 (verde) y un grupo isopropilideno soportado sobre C-1 (fucsia); funcionalidades que están presentes en el compuesto más activo (-)-(1*R*,2*S*,7*R*,3*E*,8*E*,11*E*)-2,18-diacetoxicembra-3,8,11,15(17)-tetraen-7-ol (ver capítulos 3 y 4). Con base en lo anterior y en toda la revisión bibliográfica presentada en el marco teórico (ver capítulo 1),^{1,2,3,4} se diseñó una estrategia sintética para obtener una estructura similar al cembrano **19** con grupos funcionales y arreglos estructurales responsables de las propiedades *antifouling* establecidas en los capítulos anteriores (Figura 5.1.), a partir de reactivos simples o moléculas comerciales que permitieran obtener de una manera eficiente este tipo de compuestos.

¹ Schweizer, E.; Gaich, T.; Brecker, L.; Mulzer, J. **2007**. Synthetic studies towards the total synthesis of providencin. *Synthesis* **24**, 3807-3814.

² Wipf, P.; Grenon, M. **2006**. Toward the total synthesis of lophotoxin - New methodologies and synthetic strategies. *Can. J. Chem.* **84**, 1226-1241.

³ Kato, T.; Aoki, M.; Uyehara, T. **1986**. Synthesis of (±)-asperdiol, an anticancer cembranoid. *J. Org. Chem.* **52**, 1803-1810.

⁴ Marshall, J. A.; Van-Devender, E. A. **2001**. Synthesis of (-)-deoxy-pukalide, the enantiomer of a degradation product of the furanocembranolide pukalide. *J. Org. Chem.* **66**, 8037-8041.



19 R = H, OH, OAc

Figura 5.1. Características estructurales en el anillo cembrano que le confieren sus propiedades *antifouling*

Para obtener cantidades del orden de gramos del compuesto *antifouling* **19**, concebimos una ruta sintética vía la preparación de dos compuestos **6** y **16** a partir de los cuales luego de su acoplamiento y macrociclización podría obtenerse la molécula objetivo. A continuación se describe el enfoque sintético hacia la obtención de **19**, basado en una macrociclización del diterpeno **17**, el cual se planeó producir a partir del haluro alílico **6** y el ioduro *E*-vinílico **16**. La síntesis concisa del cloruro alílico **6** se logró en cinco pasos a partir del reactivo comercial geraniol **1** (Figura 5.2) y el compuesto **16** fue obtenido mediante una serie de reacciones, las cuales consistieron en la obtención del ácido hidroxitetróico **8** a partir del reactivo comercial alcohol propargílico **7**, luego una posterior reacción de adición conjugada entre el bromuro de butenilmagnesio y **8** condujo a la obtención de **9**, el cual fue convertido en el alcohol alílico **11**. Una posterior ruptura oxidativa del alqueno terminal en el éter **12** condujo al aldehído **14** y la posterior adición del bromuro de acetiln magnesio al aldehído **14** produjo el alcohol propargílico **15** (Figura 5.2). Finalmente, debido al bajo rendimiento en la reacción de iodometilación del triple enlace en **15** para obtener el ioduro *E*-vinílico **16** no fue posible realizar el acoplamiento entre **6** y **16** y la posterior macrociclización para obtener la molécula objetivo, aunque en algunos modelos experimentales realizados utilizando el compuesto **6** y un modelo *E*-iodo vinílico (**16a**) la reacción de acoplamiento resultó exitosa.

A continuación en la figura 5.2 se muestra la ruta sintética diseñada para la obtención de los compuestos **6** y **16**, así como su posterior acoplamiento para obtener el precursor **17** el cual está en la ruta para la obtención del cembrano *antifouling* **19**. Los detalles de cada reacción son descritos detalladamente en la metodología (sección 5.1.2.) y en la discusión de los resultados (sección 5.2.).

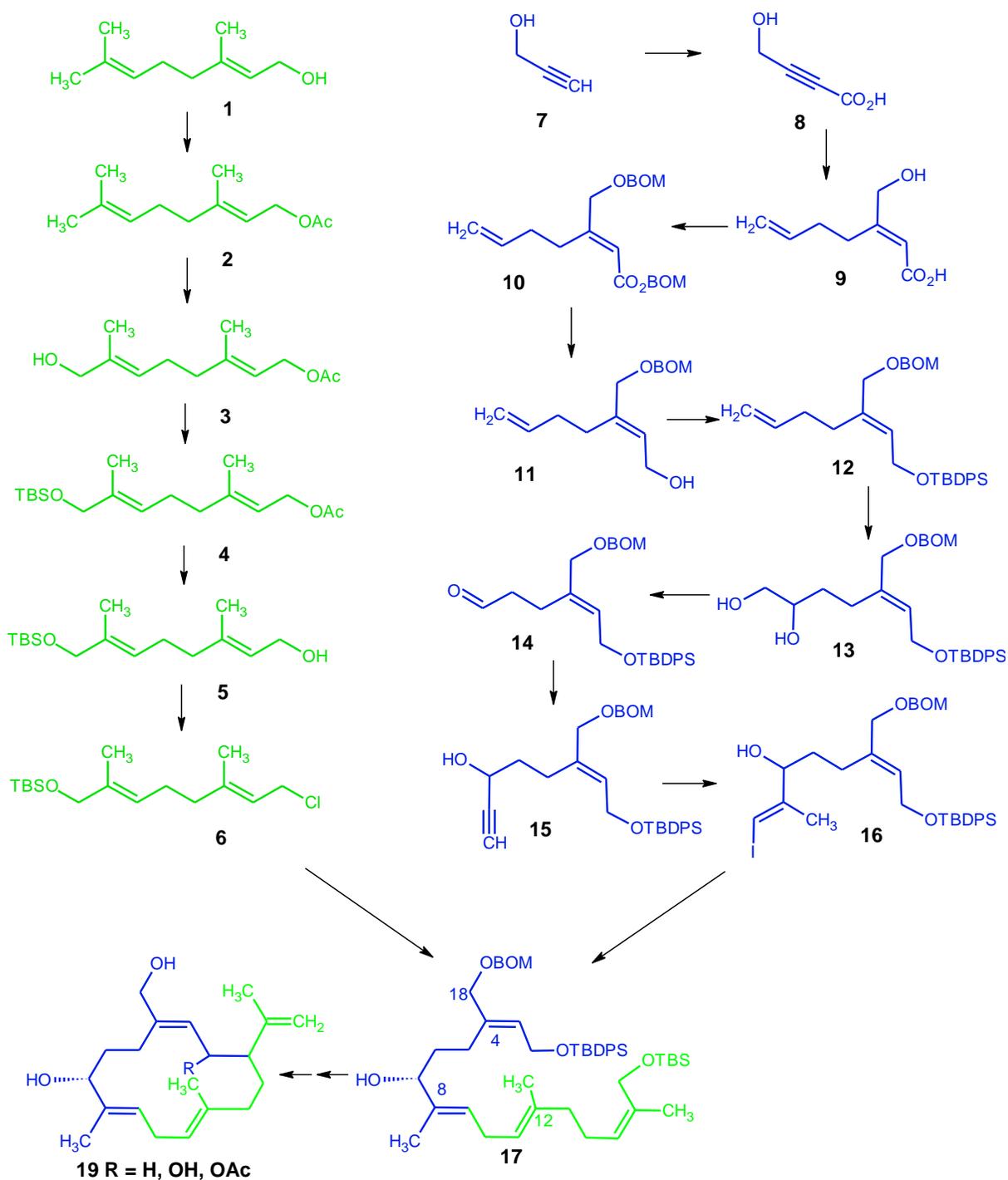


Figura 5.2. Esquema de síntesis de la estructura tipo cembrano **19** con propiedades *antifouling*

5.1. METODOLOGÍA

5.1.1. Generalidades

Todas las reacciones fueron monitoreadas mediante cromatografía en capa delgada (CCD) usando placas de aluminio cubiertas con gel de sílice 60F₂₅₄ de Merck, las cuales fueron visualizadas con luz ultravioleta ($\lambda_{\text{max}} = 254 \text{ nm}$), y luego reveladas con soluciones de permanganato de potasio básico a no ser que se indique el uso de otro revelador en el texto.

Las reacciones que requirieron condiciones anhidras fueron conducidas bajo atmósfera inerte de nitrógeno o argón, todo el material de vidrio utilizado fue previamente flameado o secado en estufa. Los solventes orgánicos fueron rutinariamente almacenados bajo atmósfera de nitrógeno y/o secados sobre sodio. Diclorometano, trietilamina y piridina fueron destilados sobre hidruro de calcio. El tetrahidrofurano fue secado mediante destilación sobre sodio y benzofenona. Los solventes fueron removidos en vacío a aprox. 20 mmHg usando un rotaevaporador Buchi.

Para la cromatografía en columna (CC) de compuestos de baja y mediana polaridad se empleó como adsorbente gel de sílice (63-200 μm) de Merck y para CC al vacío se utilizó también gel de sílice pero de menor tamaño de partícula (40-63 μm) suministrado por Merck.

Los análisis de espectrometría de masas (EM) se llevaron a cabo en un Bruker MicroTOF system, usando la técnica electrospray (ESI). Los análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) preparativa fueron realizados en un cromatógrafo Merck-Hitachi con un detector UV/vis L-4250 a 210 nm usando una columna LichroCART RP-18 (250 x 10 mm d.i.; 5 μm), como eluente se utilizó una mezcla de MeOH-H₂O 80:20 a un flujo de 3 mL/min.

Los espectros UV de cada compuesto se obtuvieron en un cromatógrafo líquido Merck-Hitachi con detector de arreglo de diodos, equipado con una columna Shimpack CLC-ODS (150 x 6 mm d.i., 5 μm), utilizando como fase móvil un gradiente de MeOH-H₂O de 50% a 100% de MeOH en 30 min, el flujo se fijó en 1.0 mL/min.

Los espectros de resonancia magnética nuclear RMN fueron obtenidos en los equipos Bruker AVANCE 400 (400 MHz para ¹H y 100 MHz para ¹³C) y en un Bruker Avance 500 (500 MHz para ¹H y 125 MHz para ¹³C) como soluciones diluidas (~ 10 mg/0.4 mL) en cloroformo deuterado. Los desplazamientos químicos fueron reportados en partes por millón (ppm) relativos al pico del solvente residual y la multiplicidad de cada señal fue designada por las siguientes abreviaciones: s (singlete), d (doblete), t (triplete), q (cuarteto), br (ancho), m (multiplete). Todas las constantes de acoplamiento fueron reportadas en hertz (Hz) y las asignaciones fueron hechas de acuerdo a los desplazamientos químicos y al análisis de los experimentos bidimensionales. En algunos casos se emplearon los disolventes deuterados CDCl₃ (99.8%), CD₂Cl₂ (99.9%) y MeOD (99.8%).

La actividad óptica fue medida en un polarímetro Polartronic ADP440+, Bellinghan+stanley polarimeter, las concentraciones se expresan como g/100 mL y el disolvente usado se indica en cada caso. Los espectros IR fueron tomados en un espectrofotómetro Perkin-Elmer-FT-IR Paragon 500, series 1000.

Los solventes utilizados fueron de grado R.A. y usados directamente del proveedor a no ser que se dé otra indicación en el texto.

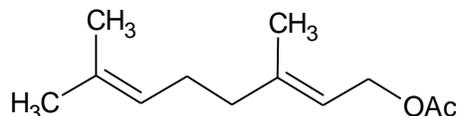
Nota: Para mayor facilidad en la comprensión del texto por parte del lector, la numeración de los compuestos utilizados en este capítulo es completamente independiente a la usada en el resto de este manuscrito.

5.1.2. Síntesis de 6 y 16

A continuación se describe el procedimiento realizado para la obtención de **6** y **16** a partir de reactivos sencillos y comercialmente disponibles, así como los rendimientos y los datos de RMN y de EM usados para caracterizar cada uno de los productos obtenidos.

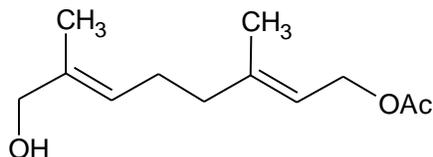
5.1.2.1. Síntesis de 6

Acetato de *E*-Geraniol **2**.⁵



Anhídrido acético (5.18 g, 50.1 mmol) fue agregado gota a gota durante 10 minutos a una solución en agitación de *E*-geraniol **1** (6.67 g, 43.2 mmol, Sigma-Aldrich, CAS: 106-24-1), 4-DMAP (0.105 g, 0.86 mmol) y trietilamina (6.38 g, 63 mmol) en diclorometano (100 mL) a temperatura ambiente. Luego de 30 minutos se le adicionó agua a la mezcla y se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x 25 mL). Los extractos orgánicos fueron combinados y lavados sucesivamente con HCl 1M (50 mL), una solución saturada de NaHCO₃ (50 mL) y una solución saturada de NaCl (50 mL) y luego se secó sobre MgSO₄ anhidro y finalmente se filtró a través de sílica gel, eluyendo con hexano–AcOEt 2:1 v/v (200 mL). El filtrado fue concentrado al vacío para dar el respectivo éster **2** (8.2 g, 42.0 mmol, 97 %) como un aceite incoloro. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 5.35 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H), 5.08 (t, *J* = 6.7 Hz, 1H), 4.59 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.17-2.09 (m, 2H), 2.07-2.03 (m, 2H), 2.06 (s, 3H), 1.71 (s, 3H), 1.69 (s, 3H), 1.61 (s, 3H); RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 171.1 (s), 142.2 (s), 131.8 (s), 123.7 (d), 118.3 (d), 61.4 (t), 39.5 (t), 26.3 (t), 25.7 (q), 21.0 (q), 17.7 (q), 16.4 (q); IR (neat) 3010, 2967, 1728, 1446, 1377, 1242, 1023; HRMS (ESI) Calculado para C₁₂H₂₀NaO₂ (M + Na)⁺ 219.1355, experimental 219.1350.

Acetato de (2*E*,6*E*)-8-hidroxi-3,7-dimetilocta-2,6-dienilo (Acetato de 8-hidroxi-geraniol) **3**.^{6,7,8}



t-Butilhidroperóxido (10 mL, 70%) fue agregado gota a gota durante 15 minutos a una suspensión en agitación de dióxido de selenio (283 mg, 2.5 mmol) y ácido salicílico (353 mg, 2.5 mmol) en CH₂Cl₂ (125 mL) a temperatura ambiente; la mezcla fue agitada durante 10 min más y luego enfriada a 0° C. Posteriormente, se agregó una solución de acetato de geraniol **2** (5.0 g, 25 mmol) en CH₂Cl₂ (10 mL). La mezcla fue agitada a 0°C durante 10 minutos más y luego llevada a temperatura ambiente y agitada durante 24 h. La suspensión fue diluida con acetato de etilo y luego lavada sucesivamente con una solución acuosa de NaHCO₃ al 5% (100 mL), una solución acuosa de CuSO₄ (50 mL x 2), una solución saturada de Na₂S₂O₃ (50 mL), agua (100 mL) y salmuera (100 mL). La fase orgánica separada fue secada sobre MgSO₄ anhidro y luego concentrada al vacío. El residuo fue sometido a cromatografía sobre sílica gel (hexano–AcOEt 10:1 v/v) para dar el éster

⁵ Snyder, S. A.; Treitler, D. S. **2009**. Et₂SBr SbCl₅Br: an effective reagent for direct, bromonium-induced polyene cyclizations. *Ang. Chem.* **48**, 7899-7903.

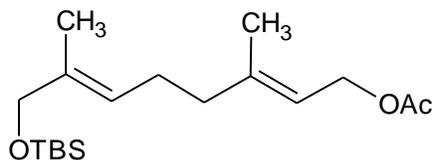
⁶ Suhara, Y.; Hirota, Y.; Nakagawa, K.; Kamao, M.; Tsugawa, N.; Okano, T. **2008**. Design and synthesis of biologically active analogues of vitamin K2: evaluation of their biological activities with cultured human cell lines. *Bioor. Med. Chem.* **16**, 3108-3117.

⁷ Yu, X.; Zhang, H.; Xiong, F.; Chen, X.; Chen, F. **2008**. An improved convergent strategy for the synthesis of oligoprenols. *Helv. Chim. Acta.* **91**, 1967-1974.

⁸ Tomooka, K.; Suzuki, M.; Shimada, M.; Yanagitsuru, S.; Uehara, K. **2006**. Planar chiral cyclic amine and its derivatives: synthesis and stereochemical behavior. *Org. Lett.* **8**, 963-965.

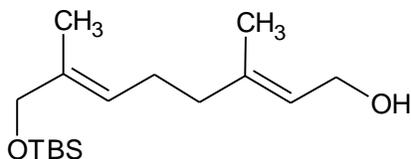
hidroxilado **3** (3.98 g, 18.8 mmol, 75%) como un aceite incoloro. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 5.39-5.36 (m, 1H), δ 5.36-5.33 (m, 1H), 4.59 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H), 4.00 (s, 2H), 2.21-2.16 (m, 2H), 2.11-2.06 (m, 2H), 2.06 (s, 3H), 1.72 (s, 3H), 1.67 (s, 3H); RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 171.2 (s), 141.7 (s), 135.3 (s), 125.2 (d), 118.7 (d), 68.8 (t), 61.4 (t), 39.1 (t), 25.7 (t), 21.0 (q), 16.4 (q), 13.7 (q); IR (neat) 3436, 3010, 2981, 1732, 1447, 1366, 1242, 1024, 909; HRMS (ESI) Calculado para C₁₂H₂₀NaO₃ (M + Na)⁺ 235.1305, experimental 235.1306.

Acetato de (2E,6E)-8-tert-Butildimetilsiloxi-3,7-dimetilocta-2,6-dienilo (Acetato de 8- tert-butildimetilsiloxi-geranilo) 4.^{9,10}



A una solución en agitación de acetato de 8-hidroxi-geranilo **3** (3.0 g, 14.1 mmol) en CH₂Cl₂ (25 mL), se agregó trietilamina (3.99 g, 5.5 mL, 39.4 mmol), cloruro de *tert*-butildimetilsililo (2.56 g, 17.0 mmol) y cantidades catalíticas de DMAP. La mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante 2 h y luego se detuvo la reacción mediante la adición de agua (50 mL) y CH₂Cl₂ (50 mL). La fase orgánica fue separada y lavada con agua, y luego las fases acuosas se combinaron y extrajeron con CH₂Cl₂ (25 mL x 3). Los extractos orgánicos fueron lavados sucesivamente con una solución acuosa saturada de CuSO₄ (50 mL x 2), agua (50 mL x 2) y salmuera (50 mL x 2), luego secada sobre MgSO₄ anhidro y concentrada al vacío para dar finalmente un aceite amarillo, el cual fue purificado en cromatografía en columna (usando SiO₂ EP–AcOEt 80:20 v/v) para dar el silil éster **4** (4.57 g, 14.0 mmol, 99 %) como un aceite. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 5.40-5.37 (m, 1H), 5.37-5.35 (m, 1H), 4.60 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H), 4.02 (s, 2H), 2.21-2.15 (m, 2H), 2.11-2.06 (m, 2H), 2.07 (s, 3H), 1.72 (s, 3H), 1.61 (s, 3H), 0.92 (s, 9H), 0.07 (s, 6H); RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 171.1 (s), 142.0 (s), 134.8 (s), 123.6 (d), 118.4 (d), 68.5 (t), 61.4 (t), 39.2 (t), 25.9 (q), 25.9 (q), 25.7 (t), 21.0 (q), 18.4 (s), 16.4 (q), 13.4 (q), -5.2 (q), -5.2 (q); IR (neat) 3448, 3010, 2956, 1730, 1471, 1388, 1255, 1059; HRMS (ESI) Calculado para C₁₈H₃₄NaO₃Si (M + Na)⁺ 349.2169, experimental 349.2160.

(2E,6E)-8-tert-Butildimetilsiloxi-3,7-dimetilocta-2,6-dienil-1-ol (8- tert-butildimetilsiloxi-geraniol) 5.^{6,11}



A una solución en agitación de silil éster **4** (4.5 g, 13.8 mmol) en MeOH (70 mL) a 25°C, se le adicionó lentamente (10 min. aprox.) una solución acuosa de NaOH 1N (9.5 mL), hasta que se alcanzó un pH entre 11 y 12. La mezcla fue agitada a 25°C por 30 min, luego se vertió en hielo-agua e inmediatamente se extrajo con acetato de etilo (50 mL x 3). Los extractos orgánicos fueron combinados y lavados con agua (100 mL) y una solución saturada de NaCl (100 mL), luego fueron secados sobre MgSO₄ anhidro y se concentró al vacío. El residuo fue filtrado a través de sílica gel usando EP–AcOEt 80:20 v/v y luego el solvente eliminado al vacío para dar el silil alcohol **5** (3.02 g, 10.6 mmol, 77%) como un aceite incoloro, el cual fue usado sin más purificación en el siguiente paso. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 5.44 (dt, *J* = 6.9, 1.3 Hz, 1H), 5.37 (dt, *J* = 6.9, 1.3 Hz, 1H), 4.15 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 4.02 (s, 2H), 2.20-2.14 (m, 2H), 2.09-2.05 (m, 2H), 1.68 (s, 3H), 1.60 (s, 3H), 0.91 (s, 9H), 0.06 (s, 6H); RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 139.5 (s), 134.7 (s), 123.8 (d), 123.6 (d), 68.6 (t),

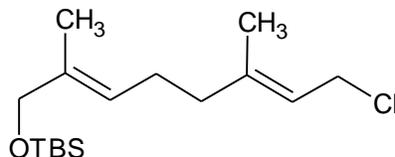
⁹ Marshall, J. A.; Lebreton, J.; Dehoff, B. S.; Jenson, T. M. **1987**. Stereoselective total synthesis of (±)-aristolactone and (±)-epiaristolactone via [2,3] Wittig ring contraction. *J. Org. Chem.* *52*, 3883-3889.

¹⁰ Li, Y.; Zhang, Q.; Wittlin, S.; Jin, H.; Wu, Y. **2009**. Synthesis and in vitro antimalarial activity of spiro-analogues of peroxyplakoric acids. *Tetrahedron* *65*, 6972-6985.

¹¹ Zhao, Y.; Loh, T. **2008**. Asymmetric total synthesis of antiochic acid. *Org. Lett.* *10*, 2143-2145.

59.4 (t), 39.2 (t), 25.9 (q). 25.9 (q), 25.9 (q), 25.7 (t), 18.4 (s), 16.2 (q), 13.4 (q), -5.2 (q), -5.2 (q); IR (neat) 3448, 3010, 2956, 1471, 1388, 1255, 1059, 838; HRMS (ESI) Calculado para $C_{16}H_{32}NaO_2Si$ ($M + Na$)⁺ 307.2063, experimental 307.2050.

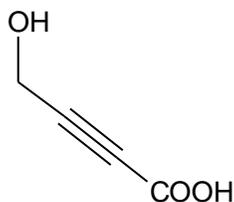
(2E,6E)-2,6-Dimetil-8-cloro-2,6-octadien *tert*-butildimetilsilil éter 6.^{12,13}



Se empleó el procedimiento descrito por Collington y Meyers.¹³ Una solución de 8- *tert*-butildimetilsiloxi-geraniol **5** (3.0 g, 10.5 mmol) en 2,6-lutidina recién destilada (1.24 g, 11.5 mmol), fue agregada durante 15 minutos a una solución de cloruro de litio anhidro (0.45 g, 10.5 mmol) en DMF (6.0 mL) con agitación vigorosa y a 0°C. Luego de 30 minutos, se notó la formación de una pasta pegajosa blanca, posterior a ello se agregó gota a gota durante 15 min el cloruro de metanosulfonilo (1.32 g, 11.5 mmol). La reacción se llevó a cabo a 0°C con agitación constante durante 6 h, se detuvo con la adición de agua (1 mL) y se extrajo con éter (15 mL x 3). Los extractos orgánicos se combinaron y fueron lavados sucesivamente con agua (30 mL), una solución saturada de $CuSO_4$ (30 mL) y salmuera (30 mL). Las fases orgánicas fueron secadas sobre $MgSO_4$ anhidro y luego concentradas a presión reducida para dar el cloruro como un aceite amarillo pálido. El cloruro fue purificado por cromatografía empleando SiO_2 EP-AcOEt 80:20 v/v para dar el producto puro **6** (2.8 g, 9.1 mmol, 87 %) como un aceite. RMN ¹H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 5.48 (dt, $J = 8.0, 1.3$ Hz, 1H), 5.39 (dt, $J = 6.8, 1.4$ Hz, 1H), 4.12 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 4.03 (s, 2H), 2.20-2.17 (m, 2H), 2.14-2.08 (m, 2H), 1.76 (s, 3H), 1.62 (s, 3H), 0.94. (s, 9H), 0.09 (s, 6H); RMN ¹³C (100 MHz, $CDCl_3$) δ 142.6 (s), 134.9 (s), 123.4 (d), 120.5 (d), 68.5 (t), 41.1 (t), 39.1 (t), 25.9 (q). 25.9 (q), 25.9 (q), 25.7 (t), 18.4 (s), 16.1 (q), 13.4 (q), -5.2 (q), -5.2 (q); IR (neat) 3011, 2955, 1471, 1363, 1255, 839; HRMS (ESI) calculado para $C_{16}H_{31}ClNaOSi$ ($M + Na$)⁺ 325.1725, experimental 325.1722.

5.1.2.2. Síntesis de 16

Ácido hidroxitetróico **8**.

¹⁴

n-Butil litio (74.8 mL, 150 mmol) fue agregado gota a gota durante 1 h a una solución agitada y enfriada (-40 °C) de alcohol propargílico **7** (3.0 g, 53 mmol, Sigma-Aldrich, CAS: 107-19-7) en THF seco (100 mL). La mezcla fue agitada a -40 °C por 1 h mas y luego se burbujeó dióxido de carbono a la suspensión durante 2 h a una temperatura de -40°C. La mezcla resultante fue vertida sobre hielo seco (10 g) y luego acidificada con HCl 6 M (20 mL); la mezcla fue llevada lentamente a temperatura ambiente hasta que todo el hielo seco desapareció. El residuo sólido fue extraído con AcOEt (50 mL x 2) y las fases orgánicas combinadas fueron secadas sobre $MgSO_4$ anhidro y luego concentrada a presión reducida. El residuo sólido aceitoso fue lavado con CH_2Cl_2 (50 mL x 4) para dar el ácido carboxílico **8** (4.0 g, 40 mmol, 75%) como un sólido de color beige.

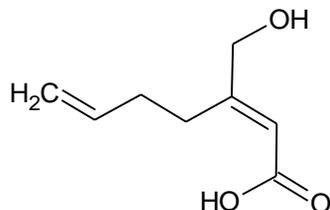
¹² Schottner, E.; Wiechoczek, M.; Jones, P. G. ; Lindel, T. **2010**. Enantiospecific synthesis of the cubitane skeleton. *Org. Lett.* **12**, 784-787.

¹³ Collington, E. W.; Meyers, A. I. **1971**. A facile and specific conversion of allylic alcohols to allylic chlorides without rearrangement. *J. Org. Chem.* **36**, 3044-3045.

¹⁴ Keen, S. P.; Weinreb, S. M. **1998**. Studies on the synthesis of pinnaic acid and halichlorine. Stereoselective preparation of a (Z)-δ-chloro-γ,δ-unsaturated-β-keto phosphonate as a side chain synthon. *J. Org. Chem.* **63**, 6739-6741.

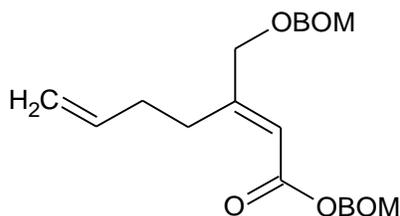
RMN ^1H (400 MHz, MeOD) δ 4.98 (br s, 2H), 4.34 (s, 2H); RMN ^{13}C (100 MHz, MeOD) δ 154.7 (s), 85.7 (s), 76.3 (s), 49.0 (t); IR (neat) 3483, 3011, 2929, 1645, 1420, 1245, 1190, HRMS (ESI) Calculado para $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_3\text{Na}$ ($\text{M} + \text{Na}$) $^+$ 123.0052, experimental 123.0058.

Ácido 2E-3-(Hidroximetil)hepta-2,6-dienoico 9.



Una solución de 1-bromo buteno (21.6 g, 160 mmol) en THF seco (15 mL) fue agregada gota a gota durante 10 minutos sobre una solución de magnesio en granallas (5.83 g, 240 mmol) en THF seco (80 mL). La reacción se inició por la adición de un cristal de I_2 . Luego de que la adición se completara, la mezcla se calentó y se sometió a un reflujo suave durante 1.5 h. Posteriormente, una solución del ácido hidroxitetrólico **8** (4.0 g, 40 mmol) en THF seco (100 mL) se enfrió a -70°C y se le adicionó tetraclorocuprato de litio (2.89 g, 13.2 mmol) gota a gota durante 10 min, la mezcla se mantuvo con agitación constante por 1 h más a -70°C . Luego el reactivo de Grignard se adicionó lentamente durante 2.0 h a la solución anterior a -70°C (reacción exotérmica), el baño de hielo fue removido y la solución se dejó calentar lentamente a temperatura ambiente, la cual se mantuvo en agitación durante 2.5 h. Posteriormente, se adicionó NH_4Cl saturado (40 mL) hasta que se disolvieron todos los sólidos y la solución resultante se acidificó con HCl concentrado hasta pH 3 (solución amarilla). La mezcla fue extraída con AcOEt (100 mL x 2) y la fase orgánica fue lavada con salmuera (50 mL x 2) y secada sobre MgSO_4 anhidro. El solvente fue evaporado al vacío y el residuo fue purificado mediante cromatografía en columna usando SiO_2 EP-AcOEt 60:40 v/v para dar el E-hidroxi ácido **9** (4.69 g, 30.0 mmol, 75%), como un aceite amarillo. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 6.03 (s, 1H), 5.84 (tdd, $J = 16.9, 10.1, 6.7$ Hz, 1H), 5.08-4.98 (m, 2H), 4.23 (s, 2H), 2.64 (t, $J = 8.0$ Hz, 2H), 2.25 (dd, $J = 14.7, 7.5$ Hz, 2H); RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 171.4 (s), 163.8 (s), 137.6 (d), 115.3 (t), 113.4 (d), 65.7 (t), 32.9 (t), 29.0 (t); IR (neat) 3483, 3011, 2929, 1690, 1645, 1418, 1260, 1192, 928; HRMS (ESI) calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{31}\text{ClNaOSi}$ ($\text{M} + \text{Na}$) $^+$ 325.9445, experimental 325.9450.

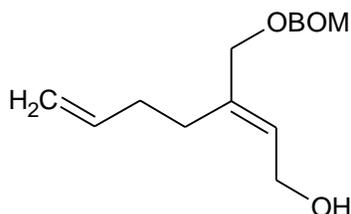
(Benziloxi)metil 2E-3-[(benziloxi)metoxi]metil-hepta-2,6- dienoato 10.



Benzil clorometil éter (10.1 g, 64.8 mmol) fue adicionado durante 5 minutos a una solución del E-hidroxi ácido **9** (4.6 g, 29.4 mmol), diisopropiletilamina (11.4 g, 88.2 mmol) y DMAP (cantidades catalíticas) en diclorometano (100 mL) a temperatura ambiente y agitación constante. Luego de 36 h, la mezcla se vertió en una solución saturada de NaHCO_3 (30 mL) y luego se extrajo con AcOEt (50 mL x3). Las fases orgánicas se combinaron y se lavaron con una solución saturada de NH_4Cl (50 mL x 2) y salmuera (60 mL), luego, se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y se concentró a presión reducida para dar el producto crudo BOM éter. El producto se purificó por medio de cromatografía en columna usando SiO_2 EP-AcOEt 95:5 v/v para dar el bis derivado BOM éter **10** (10.7 g, 27.0 mmol, 92 %) como un aceite. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 7.41-7.35 (m, 10H), 6.09 (t, $J = 1.6$ Hz, 1H), 5.89 (tdd, $J = 16.9, 10.2, 6.7$ Hz, 1H), 5.45 (s, 2H), 5.13-5.01 (m, 2H), 4.85 (s, 2H), 4.76 (s, 2H), 4.68 (s, 2H), 4.21 (d, $J = 1.7$ Hz, 2H), 2.72 (t, $J = 8.0$ Hz, 2H), 2.34-2.28 (m, 2H); RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3)

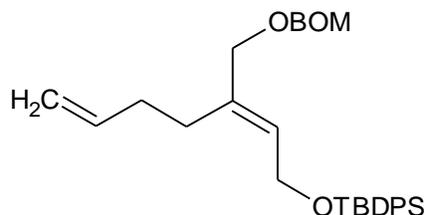
δ 165.5 (s), 159.7 (s), 137.6 (d), 137.1 (s), 137.1 (s), 128.5 (s), 128.5 (s), 128.5 (s), 128.5 (s), 128.0 (s), 128.0 (s), 128.0 (s), 127.9 (s), 127.9 (s), 127.9 (s), 115.3 (t), 114.6 (d), 94.2 (t), 87.9 (t), 71.7 (t), 70.0 (t), 69.8 (t), 32.8 (t), 29.2 (t); IR (neat) 3088, 3007, 2948, 1719, 1653, 1454, 1380, 1105, 971; HRMS (ESI) calculado para $C_{24}H_{28}NaO_5$ ($M + Na$)⁺ 419.1829, experimental 419.1831

(2E)-3-[(Benziloxi)metoxi]metil-hepta-2,6-dien-1-ol 11.



Se agregó $LiAlH_4$ (1.0 g, 26.5 mmol) en tres porciones (primera adición: 0.33 g, 0.33 eq; segunda adición: 0.33 g, 0.33 eq.; tercera adición: 0.33 g, 0.33 eq) a una solución en agitación del *E*-hidroxi éster **10** (10.5 g, 26.5 mmol) en dietil éter seco (150 mL). La mezcla se mantuvo con agitación constante durante 2 h y a temperatura ambiente. La reacción se inactivó por la adición de una solución de NaOH 1N (5.0 mL) y luego se agitó durante 0.5 h aproximadamente y posteriormente fue filtrada. El filtrado fue secado sobre Na_2SO_4 anhidro y evaporado al vacío. El residuo fue purificado por cromatografía usando SiO_2 EP–AcOEt 90:10 v/v para dar el alcohol primario **11** (6.0 g, 23.0 mmol, 87 %) como un aceite incoloro. RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.38-7.32 (m, 5H), 5.87-5.83 (m, 1H), 5.76 (t, $J = 6.8$ Hz, 1H), 5.08-5.00 (m, 2H), 4.80 (s, 2H), 4.66 (s, 2H), 4.22 (d, $J = 6.8$ Hz, 2H), 4.09 (s, 2H), 2.26-2.24 (m, 2H), 2.22-2.21 (m, 2H), 1.61 (br s, 1H); RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) δ 138.3 (s), 137.9 (d), 137.8 (s), 128.5 (s), 128.5 (s), 127.8 (s), 127.8 (s), 127.7 (s), 127.3 (d), 115.3 (t), 93.8 (t), 70.8 (t), 69.5 (t), 58.7 (d), 32.6 (t), 27.8 (t); IR (neat) 3607, 3425, 3008, 2936, 1952, 1876, 1812, 1604, 1496, 1454, 1384, 1188, 1018; HRMS (ESI) calculado para $C_{16}H_{22}NaO_3$ ($M + Na$)⁺ 285.1461, experimental 285.1458.

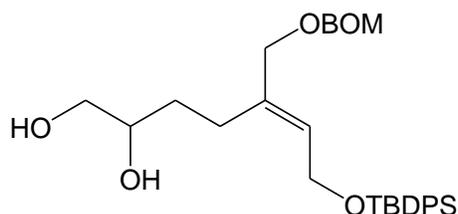
(Benziloxi)metil (2E)-3-[(difenil tert-butilsililhepta]-2,6- dien-éter 12.



Trietilamina (4.6 g, 45.8 mmol), DMAP (cantidades catalíticas) y cloruro de *tert*-butildifenilsililo (7.5 g, 27.4 mmol) se agregaron secuencialmente a una solución del alcohol **11** (6.0 g, 22.9 mmol) en CH_2Cl_2 (100 mL) a 25 °C. La mezcla se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente y luego se vertió en una mezcla de agua (50 mL) y CH_2Cl_2 (50 mL). La fase orgánica fue separada y lavada con agua (50 mL). Las fases acuosas se combinaron y se extrajeron de nuevo con CH_2Cl_2 (50 mL x 3). Los extractos orgánicos combinados se lavaron sucesivamente con una solución saturada de $CuSO_4$ (100 mL), agua (100 mL) y salmuera (100 mL), luego la fracción orgánica fue secada sobre $MgSO_4$ anhidro y concentrada a presión reducida para dar un aceite amarillo, el cual fue purificado en cromatografía en columna usando SiO_2 EP–AcOEt 95:5 v/v para dar el respectivo silil éter **12** (10.8 g, 21.7 mmol, 95%) como un aceite. RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.76-7.74 (m, 4H), 7.48-7.35 (m, 11H), 5.78 (t, $J = 6.2$ Hz, 1H), 5.77-5.71 (m, 1H), 5.01-4.92 (m, 2H), 4.81 (s, 2H), 4.68 (s, 2H), 4.34 (d, $J = 6.1$ Hz, 2H), 4.09 (s, 2H), 2.09 (m, 4H), 1.11 (br s, 9H); RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) δ 138.0 (d), 137.9 (s), 136.5 (s), 135.6 (s), 135.6 (d), 135.6 (d), 135.6 (d), 133.8 (s), 133.8 (s), 129.6 (d), 129.6 (d), 128.5 (d), 128.5 (d), 128.3 (d), 128.0 (d), 128.0 (d), 127.7 (d), 127.7 (d), 127.7 (d), 127.7 (d), 127.7 (d), 114.9 (t), 93.7 (t), 70.9 (t), 69.5 (t), 60.5 (t), 32.5 (t), 28.0 (t), 26.9 (q), 26.9 (q), 26.9 (q), 19.2 (s); IR (neat) 3072, 3011,

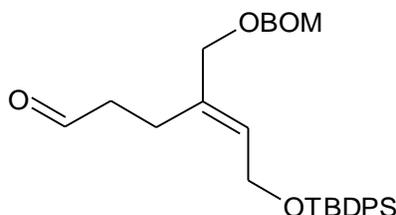
2932, 1497, 1472, 1428, 1362, 1112, 1040; HRMS (ESI) calculado para $C_{32}H_{40}NaO_3Si$ ($M + Na$)⁺ 523.2638, experimental 523.2625.

(Benziloxi)metil (2E)-3-[(difenil tert-butilsililhepta]-2-en, 6,7-diol **13.**



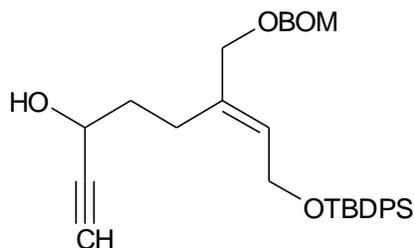
A una solución en agitación del alqueno **12** (10.0 g, 20 mmol), junto con NMO (2.3 g, 20 mmol) en acetona (90 mL) y agua (10 mL) a temperatura ambiente, se le adicionó cantidades catalíticas de tetróxido de osmio. La suspensión fue agitada durante 3 h y posteriormente se agregó una solución acuosa de tiosulfato de sodio (10 mL) y se continuó con la agitación por 10 minutos más. Las dos fases fueron separadas y la fase acuosa se extrajo con AcOEt (40 mL x 3) y los extractos orgánicos combinados fueron secados y evaporados al vacío para dar el diol vecinal como un aceite. El producto fue purificado mediante cromatografía en columna (SiO_2 EP–AcOEt 70:30 v/v) para dar el producto puro **13** (5.5 g, 10.4 mmol, 52 %) como un aceite amarillo pálido. RMN ¹H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.72-7.70 (m, 4H), 7.47-7.32 (m, 11H), 5.73 (t, $J = 6.7$ Hz, 1H), 4.77 (s, 2H), 4.64 (s, 2H), 4.29 (ddd, $J = 18.9, 12.6, 6.7$ Hz, 2H), 4.07 (d, $J = 2.5$ Hz, 2H), 3.61-3.51 (m, 2H), 3.37 (dd, $J = 11.0, 7.7$ Hz, 1H), 2.28-2.07 (m, 2H), 1.45 (dd, $J = 14.5, 6.8$ Hz, 2H), 1.07 (br s, 9H); RMN ¹³C (100 MHz, $CDCl_3$) δ 137.7 (s), 137.7 (s), 135.7 (d), 135.7 (d), 135.6 (d), 135.6 (d), 133.5 (s), 129.8 (d), 129.8 (d), 128.5 (d), 128.0 (d), 127.9 (d), 127.8 (d), 127.7 (d), 93.7 (t), 71.1 (t), 70.9 (d), 69.6 (t), 66.7 (t), 60.2 (t), 31.2 (t), 26.8 (q), 26.8 (q), 26.8 (q), 24.1 (t), 19.2 (s); IR (neat) 3434, 3011, 2933, 1497, 1472, 1428, 1363, 1111, 1040; HRMS (ESI) calculado para $C_{32}H_{42}NaO_5Si$ ($M + Na$)⁺ 557.2694, experimental 557.2695.

4E-4-(Benziloxi)metil-6-difenil tert-butilsililhexa-4-en-al **14.**



A una porción del diol vecinal **13** (5.5 g, 10.3 mmol) en THF (10.0 mL) y agua (30.0 mL), se le adicionó periodato de sodio (2.6 g, 12.3 mmol) a temperatura ambiente y con agitación constante. La mezcla fue agitada durante 3 h bajo atmósfera de nitrógeno y posteriormente, se le adicionó dietil éter (10 mL). La solución fue agitada durante 10 min más y las dos fases fueron separadas, la fase acuosa se extrajo con éter (30 mL x 3) y la combinación de los extractos orgánicos se secaron sobre $NaSO_4$ anhidro y posteriormente la fase orgánica resultante fue concentrada al vacío para dar el producto **14** (3.8 g, 7.6 mmol, 74 %) como un aceite amarillo. RMN ¹H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.65 (t, $J = 1.4$ Hz, 1 H), 7.71-7.69 (m, 4H), 7.46-7.34 (m, 11H), 5.74 (t, $J = 6.1$ Hz, 1H), 4.76 (s, 2H), 4.63 (s, 2H), 4.29 (d, $J = 6.1$ Hz, 2H), 4.04 (d, $J = 0.8$ Hz, 2H), 2.45-2.41 (m, 1H), 2.26 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H), 1.07 (br s, 9H); RMN ¹³C (100 MHz, $CDCl_3$) δ 201.6 (d), 137.8 (s), 135.6 (d), 135.6 (d), 135.6 (d), 135.6 (d), 135.3 (s), 133.6 (s), 129.7 (d), 129.7 (d), 129.4 (d), 128.5 (d), 127.9 (d), 127.8 (d), 127.7 (d), 93.7 (t), 71.1 (t), 69.6 (t), 60.3 (t), 42.5 (t), 26.8 (q), 26.8 (q), 26.8 (q), 21.1 (t), 19.2 (s); IR (neat) 3072, 3011, 2933, 1722, 1472, 1427, 1363, 1111, 1040; HRMS (ESI) calculado para $C_{31}H_{38}NaO_4Si$ ($M + Na$)⁺ 525.2432, experimental 525.2439.

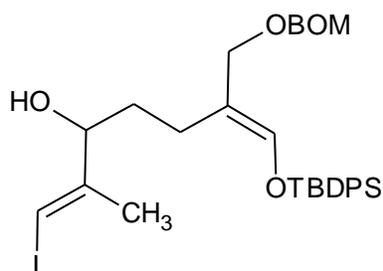
6E-6-(Benziloxi)metil)-8-(difenil *tert*-butilsililocta)-6-en-1-in-3-ol **15**.



Bromuro de acetilmagnesio (42.6 mL, 21.3 mmol) en hexano fue agregado gota a gota durante 30 minutos a una solución en agitación del aldehído **14** (3.6 g, 7.1 mmol) en éter dietílico (100 mL) a 0° C. La mezcla fue continuamente agitada durante 3 h a temperatura ambiente, luego, se le agregó cloruro de amonio saturado (10 mL) y se dejó en agitación durante 10 minutos más; posteriormente se le adicionó agua (10 mL) para solubilizar todos los precipitados. Las dos fases fueron separadas y la fase acuosa extraída con dietil éter (30 mL x 3), los extractos orgánicos combinados fueron secados sobre NaSO₄ anhidro y el solvente evaporado al vacío para dar el alquino **15** como un aceite incoloro (3.4 g, 6.4 mmol, 90 %). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7.75-7.73 (m, 4H), 7.47-7.34 (m, 11H), 5.78 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H), 4.80 (s, 2H), 4.67 (s, 2H), 4.40-4.31 (m, 2H), 4.29-4.25 (m, 1H), 4.08 (br s, 2H) 2.36 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 2.24-2.14 (m, 2H), 1.78-1.73 (m, 2H), 1.10 (br s, 9H); RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 137.9 (s), 136.4 (s), 135.7 (d), 135.7 (d), 135.7 (d), 135.7 (d), 133.7 (s), 129.7 (d), 129.7 (d), 128.9 (d), 128.5 (d), 128.5 (d), 128.0 (d), 128.0 (d), 127.8 (d), 127.7 (d), 127.7 (d), 127.7 (d), 93.8 (t), 84.7 (s), 73.0 (t), 73.0 (d), 71.2 (t), 69.6 (t), 61.4 (d), 60.4 (t), 36.1 (t), 26.9 (q), 26.9 (q), 24.0 (t), 19.2 (s); IR (neat) 3418, 3071, 2932, 1472, 1427, 1363, 1111, 1083; HRMS (ESI) calculado para C₃₃H₄₀NaO₄Si (M + Na)⁺ 551.2588, experimental 551.2595.

6E-6-(Benziloxi)metil)-8-(difenil *tert*-butilsililocta)-6-en-1-iodo-2-metil-3-ol **16**.

Para la síntesis del compuesto **16** se desarrollaron dos procedimientos (A y B) con el fin de obtener mayores rendimientos en su producción a partir del precursor **15**, desafortunadamente los rendimientos no superaron el 2%, por lo cual se realizaron diferentes pruebas utilizando las moléculas modelo **15a-15c** bajo las mismas condiciones de reacción, para establecer la efectividad de la reacción de iodometilación así como sus rendimientos:



Procedimiento A:^{15,16} a una mezcla en agitación de Me₃Al y Cp₂ZrCl₂ en CH₂Cl₂ (5 mL) a 0°C fue adicionado gota a gota una solución del alquino **15** en CH₂Cl₂ (2 mL). Luego de 16 h de agitación a temperatura ambiente, la mezcla fue tratada con una solución de I₂ en THF (2 mL) a -78 °C. La mezcla resultante fue agitada durante 30 min, posteriormente llevada a temperatura ambiente y vertida sobre agua-hielo y

¹⁵ Tan, Z.; Negishi, E. I. **2006**. Selective synthesis of epolactaene featuring efficient construction of methyl (Z)-2-iodo-2-butenolate and (2R,3S,4S)-2-trimethylsilyl-2,3-epoxy-4-methyl-γ-butyrolactone. *Organic Lett.* 8(13), 2783-2785.

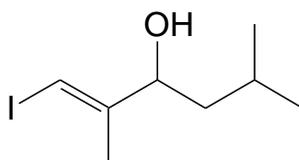
¹⁶ Wang, G.; Negishi, E. I. **2009**. AlCl₃-Promoted facile *E*-to-*Z* isomerization route to (Z)-2-methyl-1-buten-1,4-ylidene synthons for highly efficient and selective (Z)-isoprenoid synthesis. *Eur. J. Org. Chem.* 1679-1682.

extraída con dietil éter, lavada con una solución saturada de NaCl, secada sobre MgSO₄ anhidro y finalmente filtrada y concentrada.

Procedimiento B:¹⁷ a una mezcla en agitación de Me₃Al y Cp₂ZrCl₂ en CH₂Cl₂ (5 mL) a -10°C fue adicionada agua lentamente (5.1 μL) bajo agitación vigorosa (precaución: reacción exotérmica). Luego de 10 min. se le adicionó una solución del alquino **15** en CH₂Cl₂ (2 mL) y se dejó en agitación durante 72 h a temperatura ambiente. Posteriormente, la mezcla fue llevada a -70°C y una solución de I₂ en THF (2 mL) fue adicionada. La mezcla resultante fue agitada a -70 °C durante 30 min, posteriormente llevada a temperatura ambiente y agitada durante 2 h, luego vertida sobre agua-hielo y extraída con dietil éter, lavada con una solución saturada de NaCl, secada sobre MgSO₄ anhidro y finalmente filtrada y concentrada.

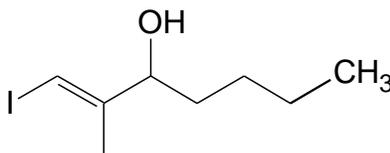
Luego de múltiples variaciones a la reacción de carboiodinación el rendimiento no superó el 2% en todos los casos. El producto final fue un aceite amarillo. (1.0 mg, 1.5 x10⁻³ mmol, 1.6 %). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7.75-7.73 (m, 4H), 7.47-7.34 (m, 11H), 6.30 (s, 1H), 5.77 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H), 4.80 (s, 2H), 4.67 (s, 2H), 4.40-4.31 (m, 2H), 4.29-4.25 (m, 1H), 4.08 (br s, 2H), 2.36 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 2.24-2.14 (m, 2H), 1.79 (s, 3H), 1.78-1.73 (m, 2H), 1.10 (br s, 9H); HRMS (ESI) calculado para C₃₄H₄₃I NaO₄Si (M + Na - I)⁺ 566.7770, experimental 566.7692.

(1*E*)-1-iodo-2,5-dimetilhexen-3-ol **16a**.



A una mezcla en agitación de Me₃Al (3.4 mL, 6.69 mmol) y Cp₂ZrCl₂ (163 mg, 0.56 mmol) en CH₂Cl₂ (5 mL) a 0°C fue adicionado gota a gota una solución del alquino 5-metil-1-hexin-3-ol **15a** (250 mg, 2.23 mmol) en CH₂Cl₂ (2 mL). Luego de 3 días de agitación a temperatura ambiente, la mezcla fue tratada con una solución de I₂ en THF (2 mL) a -78 °C. La mezcla resultante fue agitada durante 30 min y posteriormente llevada a temperatura ambiente, agitada durante 2 h, luego vertida sobre agua-hielo, extraída con dietil éter, lavada con una solución saturada de NaCl, secada sobre MgSO₄ anhidro y finalmente filtrada y concentrada. El producto crudo fue sometido a CC sobre SiO₂ eluyendo con hexano-AcOEt 90:10 v/v obteniendo el *E*-vinil ioduro **16a** como un aceite incoloro (180 mg, 1.00 mmol, 42 %). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 6.32 (s, 1H), 4.30 (dd, 1H, *J* = 5.4, 8.1 Hz), 1.85 (s, 3H), 1.72-1.67 (m, 1H), 1.54-1.49 (m, 1H), 1.43-1.40 (m, 1H), 0.97 (d, 3H, *J* = 1.3 Hz), 0.95 (d, 3H, *J* = 1.3 Hz); RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 150.6 (s), 78.2 (d), 75.1 (d), 44.2 (d), 24.7 (t), 23.1 (q), 22.3 (q), 19.6 (q). HRMS (ESI) calculado para C₃₃H₄₀NaO₄Si (M + Na)⁺ 551.2588, experimental 551.2595.

(1*E*)-1-iodo-2-metilhepten-3-ol **16b**.

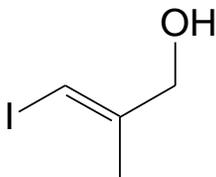


A una mezcla en agitación de Me₃Al (4.0 mL, 8.01 mmol) y Cp₂ZrCl₂ (130 mg, 0.45 mmol) en CH₂Cl₂ (5 mL) a 0°C fue adicionado gota a gota una solución del alquino 1-heptin-3-ol **15b** (200 mg, 1.78 mmol) en CH₂Cl₂ (2 mL). Luego de 3 días de agitación a temperatura ambiente, la mezcla fue llevada a -78 °C y posteriormente tratada con una solución de I₂ (937 mg, 3.69 mmol) en THF (2 mL). La mezcla resultante fue agitada durante

¹⁷ Wipf, P.; Lim, S. **1993**. Rapid Carboalumination of alkynes in the presence of water. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 32(7), 1068-1071.

30 min y posteriormente llevada a temperatura ambiente, agitada durante 2 h y luego vertida sobre agua-hielo, extraída con dietil éter, lavada con una solución saturada de NaCl, secada sobre MgSO₄ anhidro y finalmente filtrada y concentrada. El producto crudo fue sometido a CC sobre SiO₂ eluyendo con hexano–AcOEt 90:10 v/v obteniendo el *E*-vinil ioduro como un aceite incoloro **16b** (120 mg, 0.65 mmol, 35 %). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 6.32 (s, 1H), 4.30 (dd, 1H, *J* = 5.4, 8.1 Hz), 1.85 (s, 3H), 1.72-1.67 (m, 1H), 1.54-1.49 (m, 1H), 1.43-1.40 (m, 1H), 0.97 (d, 3H, *J* = 1.3 Hz), 0.95 (d, 3H, *J* = 1.3 Hz); RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 150.6 (s), 78.2 (d), 75.1 (d), 44.2 (d), 24.7 (t), 23.1 (q), 22.3 (q), 19.6 (q). HRMS (ESI) calculado para C₃₃H₄₀NaO₄Si (M + Na)⁺ 551.2588, experimental 551.2595.

(2*E*)-3-iodo-2-metil-2-propen-1-ol 16c.



A una mezcla en agitación de Me₃Al (26.8 mL, 53.6 mmol) y Cp₂ZrCl₂ (1.30 g, 4.48 mmol) en CH₂Cl₂ (10 mL) a 0°C fue adicionado gota a gota una solución del alquino alcohol propargílico **15c** (1.0 g, 17.8 mmol) en CH₂Cl₂ (2 mL). Luego de 3 días de agitación a temperatura ambiente, la mezcla fue llevada a -78 °C y posteriormente tratada con una solución de I₂ (5.44 g, 21.4 mmol) en THF (5 mL). La mezcla resultante fue agitada durante 30 min y posteriormente llevada a temperatura ambiente, agitada durante 2 h y luego vertida sobre agua-hielo, extraída con dietil éter, lavada con una solución saturada de NaCl, secada sobre MgSO₄ anhidro y finalmente filtrada y concentrada. El producto crudo fue sometido a CC sobre SiO₂ eluyendo con hexano–AcOEt 90:10 v/v obteniendo el *E*-vinil ioduro **16c** como un aceite incoloro (180 mg, 1.00 mmol, 42 %). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 6.28 (s, 1H), 4.11 (s, 2H), 1.85 (s, 3H); RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 147.2 (s), 77.4 (d), 67.1 (t), 21.4 (q). HRMS (ESI) calculado C₃₃H₄₀NaO₄Si (M + Na)⁺ 551.2588, experimental 551.2595.

5.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.2.1. Diseño de una ruta sintética para obtener la estructura **19** que presentó la mejor actividad *antifouling in vitro e in vivo*

Para obtener la estructura tipo cembrano que presentó los mejores resultados de actividad *antifouling in vitro e in vivo*, se diseñó una ruta sintética a partir de simples reactivos comerciales que permitieran obtener de una manera eficiente este tipo de compuestos como se describió preliminarmente al comienzo de este capítulo. Para ello consideramos algunos precedentes en la síntesis de cembranos, los cuales han venido siendo estudiados por diferentes grupos de investigación durante muchos años. Por ejemplo, Still y Mobillio¹⁸ describieron la síntesis del asperdiol mediante una macrociclización *treo*-selectiva la cual fue dirigida por la conformación adquirida por la molécula debido a la función epóxido en los carbonos 7 y 8. Marshall y Cleary¹⁹ también presentaron una sencilla y completa síntesis estereoselectiva del 7,8-desoxiasperdiol usando una reacción de alquilación intramolecular como paso clave y este mismo macrociclo fue un intermediario en una síntesis anterior de una mezcla racémica del asperdiol desarrollada por Kato y colaboradores.²⁰ Con base en lo anterior, decidimos sintetizar la estructura **19**, la cual incorpora diversas características estructurales como: un anillo de 14 miembros tipo cembrano, con un doble enlace trisustituido en C-8,9 con configuración *E*, la presencia de un grupo hidroxilo en C-7 con configuración *R*, un metileno carbinólico en C-18, un doble enlace trisustituido con configuración *E* sobre C-11,12 y un grupo isopropilideno soportado sobre C-1; funcionalidades que de acuerdo a los estudios de relación estructura-actividad planteados en el capítulo 3, confieren la actividad *antifouling* a este tipo de compuestos (como fue establecido en los capítulos 2, 3 y 4). Así, la síntesis concebida mediante el análisis retrosintético para el cembrano **19**, condujo a la preparación de los compuestos **6** y **16** de la molécula objetivo (Figura 5.3) y finalmente una macrociclización como paso final en este proceso.

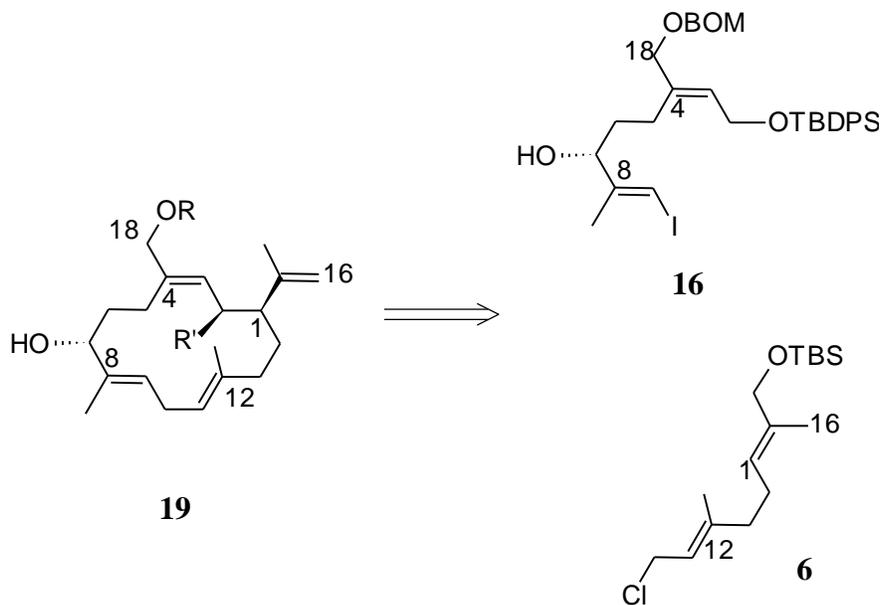


Figura 5.3. Análisis retrosintético de **19**

¹⁸ Still, W. C.; Mobillio, D. **1983**. Synthesis of asperdiol. *J. Org. Chem.* *48*, 4785-4786.

¹⁹ Marshall, J. A.; Cleary, D. G. **1986**. Synthesis of 7(8)-desoxyasperdiol. A precursor of the cembranoid asperdiol. *J. Org. Chem.* *51*, 858-863.

²⁰ Aoki, M.; Tooyama, Y.; Uyehara, T.; Kato, T. **1983**. Synthesis of (\pm)-asperdiol, a marine anticancer cembranoid. *Tetrahedron Lett.* *24*, 2267-2270.

Considerando lo anterior, se analizaron un gran número de rutas sintéticas para obtener la molécula objetivo con núcleo cembrano **19** y con base en lo anterior decidimos que podríamos adoptar una macrociclización cercana a **17** usando una reacción catalizada por metal, a partir del compuesto ω -aldehído **18** (Figura 5.4). Un amplio precedente del procedimiento para este tipo de macrociclizaciones ha sido desarrollado por Nozaki, Hiyama y Kishi, usando un catalizador de $\text{CrCl}_2/\text{NiCl}_2$,^{21,22,23} por lo cual decidimos que la aproximación más práctica para la obtención del cembrano **19** fuera a partir de una reacción de acoplamiento que involucrara al iodo vinil **16** y al cloruro alílico **6** (Figura 5.4).

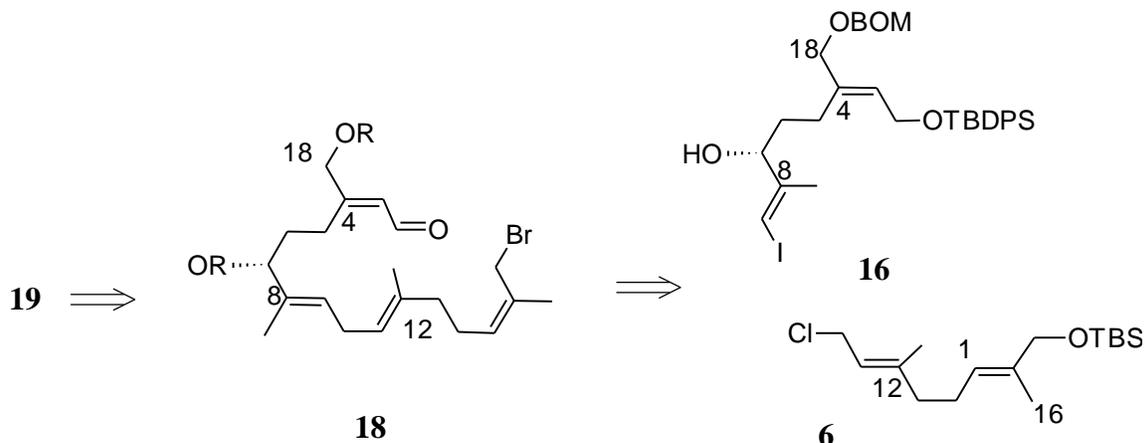


Figura 5.4. Análisis retrosintético de **19** vía el precursor **18**

Síntesis de **6**:

La síntesis de **6** comenzó con el reactivo comercialmente disponible y económico, geraniol **1**. Entonces, como primer paso se realizó la acetilación del geraniol produciendo el acetato de geraniol **2**, el cual fue posteriormente tratado con el agente oxidante SeO_2 en *tert*-butilhidroperóxido (t-BHP) para obtener el nuevo alcohol alílico hidroxilado en el C-8 **3**. La posterior protección del grupo hidroxilo formado en **3** fue realizada utilizando el reactivo cloruro de *tert*butililililo (TBSCl), lo que produjo el respectivo silil-éter **4**, la saponificación del grupo acetato en **4** mediante el uso de NaOH 1 N, permitió obtener el alcohol **5** con rendimientos del 77%. Finalmente, el grupo hidroxilo en **5** fue tratado con cloruro de metanosulfonilo en la presencia de lutidina y LiCl_2 para dar el cloruro alílico **6**, del cual se logró obtener 2.8 g en un rendimiento global del 48.2% (Figura 5.5). El halogenuro alílico fue mantenido a -4°C hasta el momento de su uso para evitar una posible descomposición.

²¹ Furstner, A.; Shi, N. **1996**. Nozaki-Hiyama-Kishi reactions catalytic in chromium. *J. Am. Chem. Soc.* *118*, 12349-12357.

²² Fischer, D. F.; Xin, Z.; Peters, R. **2007**. Asymmetric formation of allylic amines with N-substituted quaternary stereocenters by Pd^{II} -catalyzed aza-Claisen rearrangements. *Angew. Chem. Int. Ed.* *46*, 7704-7707.

²³ Norio, O.; Nishikawa, T.; Isobe, M. **2003**. First asymmetric total synthesis of tetrodotoxin. *J. Am. Chem. Soc.* *125*, 8798-8805.

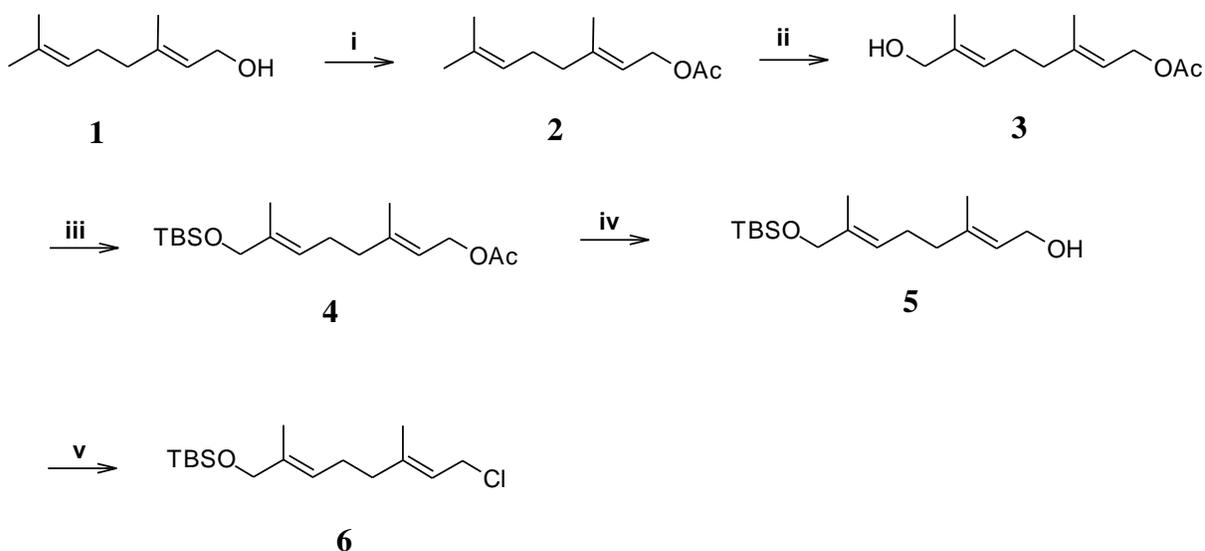


Figura 5.5. Síntesis de **6**

Reactivos y condiciones: *i.* Anhídrido acético, pyr, TEA, DMAP, DCM. *ii.* SeO₂, *t*-BHP, TEA, ácido salicílico, DCM. *iii.* TBSCl, TEA, DMAP, DCM. *iv.* 1 N NaOH, MeOH. *v.* CH₃SO₂Cl, LiCl, lutidina, DMF.

Con la síntesis exitosa del cloruro alílico **6** en cantidades de gramos, el siguiente objetivo fue el acoplamiento de **6** con el yoduro vinílico **16** catalizada con paladio (Figura 5.3), para producir el precursor **17** el cual está en la ruta para la obtención del intermediario clave **18** en la síntesis total de **19**. Para realizar el acoplamiento fue necesario obtener el yoduro vinílico **16** en cantidades de gramos, lo cual se realizó como se describe continuación.

Síntesis de **16**:

Para la síntesis del compuesto **16** se consideraron un gran número de rutas sintéticas y luego de numerosos ensayos se decidió que la ruta más concisa para obtenerlo era mediante la reacción de carboiodinación de Negishi del correspondiente alcohol propargílico intermediario **15** el cual se planeó producir a partir del aldehído sustituido **14** (Figura 5.6).

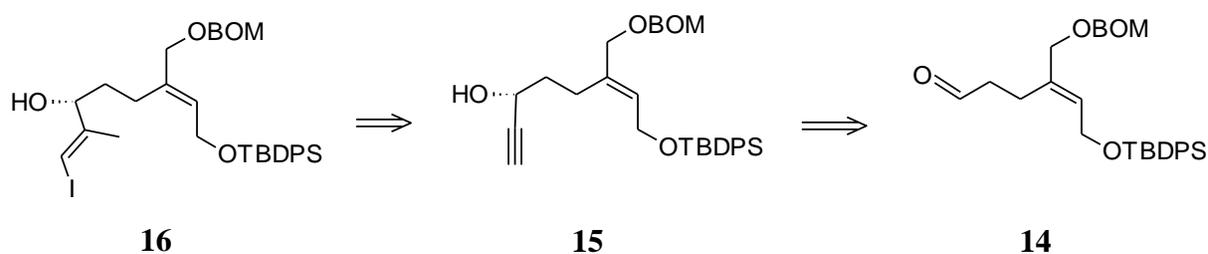


Figura 5.6. Análisis retrosintético para obtener **16**

Así para sintetizar el compuesto **14**, se procedió a llevar a cabo la reacción del reactivo comercialmente disponible y económico alcohol propargílico **7** con BuLi para obtener el respectivo carbanión, el cual seguido de la adición de CO₂ y posterior adición de HCl produjo el ácido hidroxitetróico **8** (Figura 5.7). Posteriormente, luego de una considerable cantidad de pruebas se pudo establecer que cuando un exceso del reactivo de Grignard preparado a partir del reactivo comercial 4-bromobuteno era adicionado a **8** en presencia de Li₂CuCl₄ a -78°C y posterior acidificación del medio hasta pH 3, se obtenía una adición *trans*-

selectiva del reactivo organometálico al enlace del acetileno en **8**, obteniéndose en un excelente rendimiento (75%) el alqueno polar trisustituido **9**, el cual fue obtenido exclusivamente con una configuración *E* en el doble enlace como era lo deseado. El hidroximetil ácido carboxílico **9** fue posteriormente sometido a un proceso de protección usando el grupo protector cloruro de Benzil-clorometil éter (BOMCl) para ser convertido en el derivado bis-BOM **10**, el cual fue purificado exhaustivamente mediante cromatografía en columna para eliminar cualquier remanente del agente protector BOMCl.

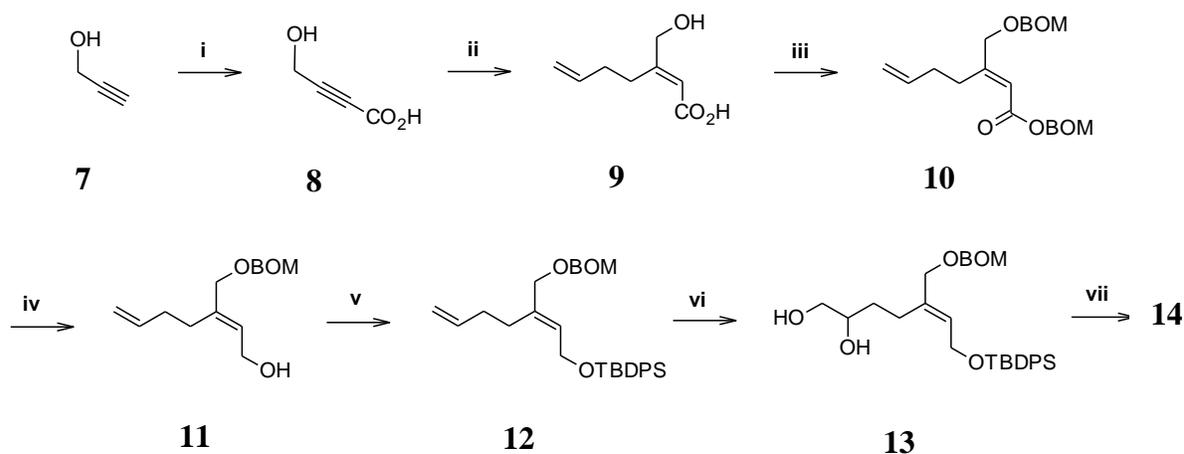


Figura 5.7. Síntesis del intermediario clave **16**

Reactivos y condiciones: *i.* 1. BuLi/THF, 2. CO₂/HCl 6M. *ii.* 4-bromobut-3-en magnesio, Li₂CuCl₄/THF. *iii.* BOM-Cl, DIPEA/DCM. *iv.* LiAlH₄/THF. *v.* TBDPSCl, TEA, DMAP/DCM. *vi.* OsO₄, NMO/Acetona:H₂O. *vii.* NaIO₄/THF:H₂O.

La posterior reducción del grupo éster en **10**, se realizó usando cantidades estequiométricas de LiAlH₄ o DIBAL-H, lográndose obtener el alcohol alílico **11**, el cual fue posteriormente protegido usando el agente cloruro de tert-butildifenilsilil éter (TBDPSCl) para obtener el respectivo TBDP silil éter **12**. Finalmente, una dihidroxilación vecinal en el doble enlace monosustituido en **12** utilizando como catalizador OsO₄ y el agente oxidante NMO, condujo a obtener el diol **13**, el cual fue sometido a una ruptura oxidativa con NaIO₄, para obtener el aldehído deseado **14** (Figura 5.7). Esta ruta sintética permitió obtener 3.8 g de **14** en un rendimiento global de 26.9%.

Acoplamiento de **6** con **16**:

Luego, se hizo la conversión del aldehído **14** en el alcohol propargílico **15**, en la ruta para la obtención del iodo vinilo **16**, el cual sería posteriormente acoplado a **6** (Figura 5.3). Fue una gran satisfacción encontrar que la adición del bromuro de etinilmagnesio al aldehído **14** produjo 3.4 g del alcohol propargílico resultante **15** (Figura 5.5) con un rendimiento del 90%. El paso final en la obtención del iodo vinilo **16** consistió en la reacción de carboiodinación de Negishi, esta reacción tiene un amplio precedente en la literatura y permite obtener ioduros vinílicos a partir de alquinos.^{15,16}

En este punto, solo faltaba la conversión del alquino **15** en el *E*-iodo vinil **16** e intentar su posterior acoplamiento con el haluro alílico **6**, conduciendo de este modo al derivado precursor **17** de la macrociclización para la obtención del cembrano **19**. Por lo cual, un gran número de intentos fueron realizados para sintetizar el *E*-iodo vinil **16** a partir del alquino **15**, mediante la reacción de Negishi (carboiodinación), usando diferentes equivalentes de los reactivos Me₃Al, Cp₂ZrCl₂ y **15**, así como también,

diferentes tiempos de reacción y de temperatura (Tabla 5.1), pero los productos de la reacción no superaron el 2% de rendimiento en todos los casos ensayados.

Tabla 5.1. Reacción de carboiodinación del alqueno **15** bajo diferentes condiciones

Reacción	Alquino 15 (eq)	Cp ₂ ZrCl ₂ (eq)	Me ₃ Al (eq)	Tiempo (h)	Temperatura (°C)	Solvente	Procedimiento
1	1.0	1.0	2.5	16	20	DCM	A
2	1.0	1.0	5.0	16	20	DCM	A
3	1.0	1.0	25.0	16	20	DCM	A
4	1.0	1.0	2.5	16	20	DCM	A
5	1.0	1.0	4.0	16	20	DCM	A
6	1.0	0.3	3.0	20	20	DCM	B
7	1.0	1.0	4.5	72	20	DCM	A
8	1.0	1.0	4.5	24	40 °C	DCE	A
9	1.0	1.5	4.5	24	20	DCE	A

Por lo anterior, se decidió evaluar las condiciones óptimas de reacción, la efectividad y los rendimientos de la reacción de carboiodinación **15**→**16** utilizando tres sustratos modelo. Para ello, se utilizaron los compuestos 5-metil-1-hexin-3-ol (**15a**), 1-heptin-3-ol (**15b**) y alcohol propargílico (**15c**) (Figura 5.8), los cuales presentan un rearrreglo hidroxialquino similar a **15**. Cada sustrato fue sometido separadamente a las mismas condiciones de reacción de carboiodinación descritas en la metodología (procedimiento A), lográndose obtener los productos *E*-iodo vinílicos **16a**, **16b** y **16c** con un rendimiento del 40%, 35% y 52%, respectivamente (Figura 5.8).

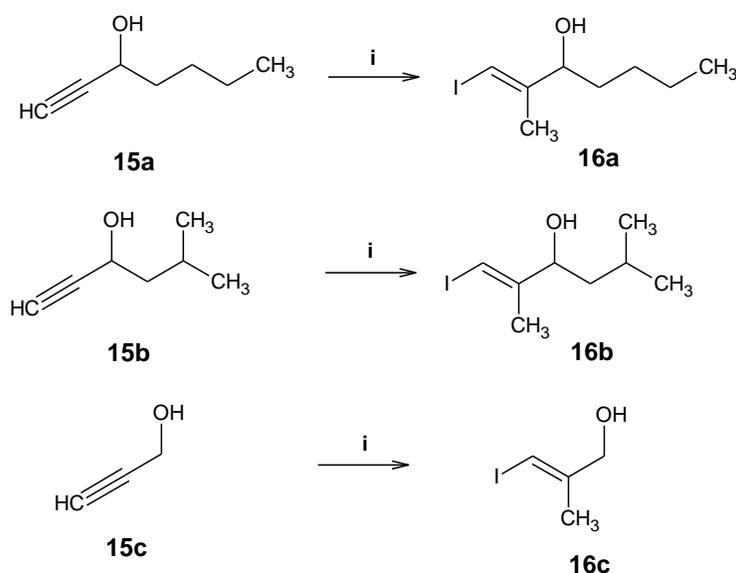


Figura 5.8. Reacciones de carboiodinación con los sustratos modelo **15a**, **15b** y **15c**

Reactivos y condiciones: *i*. 1. Me₃Al, Cp₂ZrCl₂, 2. I₂/THF.

Nuestra estrategia sintética se basó en un acoplamiento sp²-sp³ entre el cloruro alílico **6** y el *E*-iodo vinil **16**, en la ruta para la obtención del cembrano **19** (Figura 5.3). A pesar del bajo rendimiento obtenido en la producción de **16**, se decidió seguir adelante con el acoplamiento sp²-sp³ utilizando el sustrato modelo **16c** y el cloruro alílico **6** (Figura 5.9) para evaluar la viabilidad del acoplamiento carbono-carbono, luego de diferentes pruebas y análisis utilizando reactivos de cobre, zinc y paladio, se pudo establecer que la mejor

opción para el acoplamiento y obtención del modelo **17a** era a través de la reacción de Heck utilizando el ioduro alílico **6a** obtenido a partir de **6** mediante la reacción de Finkelstein y el *E*-iodo vinilo **16c** (Figura 5.9), lo cual nos permitió comprobar que la reacción de acoplamiento carbono-carbono sp^2-sp^3 es exitosa.

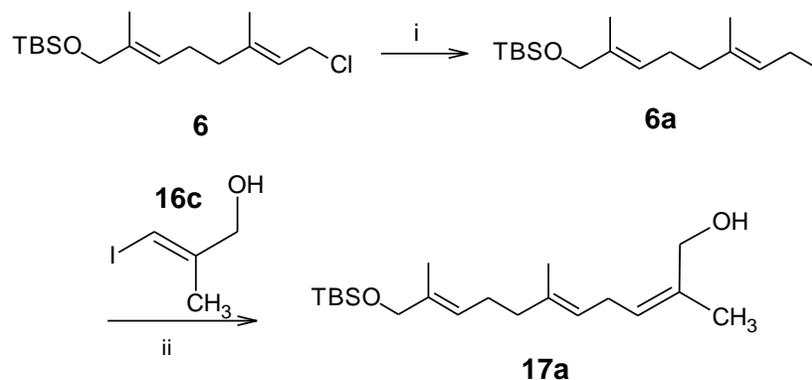


Figura 5.9. Reacción de Heck para acoplar **16c** y **6a**

Reactivos y condiciones: *i.* NaI/acetona. *ii.* Tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0)/éter

Sobre la base de lo anteriormente expuesto, se estableció una secuencia sintética exitosa para la obtención de los compuestos *E*-iodo vinil **16** y el cloruro alílico **6**, compuestos claves en el proceso de macrociclización para la obtención del diterpeno **17** (Figura 5.2), sin embargo, el bajo rendimiento en la obtención de **16** limitó el siguiente paso de macrociclización, aunque los análisis con un compuesto modelo permitieron establecer que la reacción de Heck para la macrociclización era exitosa. Por este motivo se espera a futuro continuar con este proyecto sintético y realizar el paso final de macrociclización para acoplar las dos estructuras obtenidas y así obtener la estructura tipo cembrano con las características funcionales y estructurales que le confieren las propiedades de agente *antifouling*.

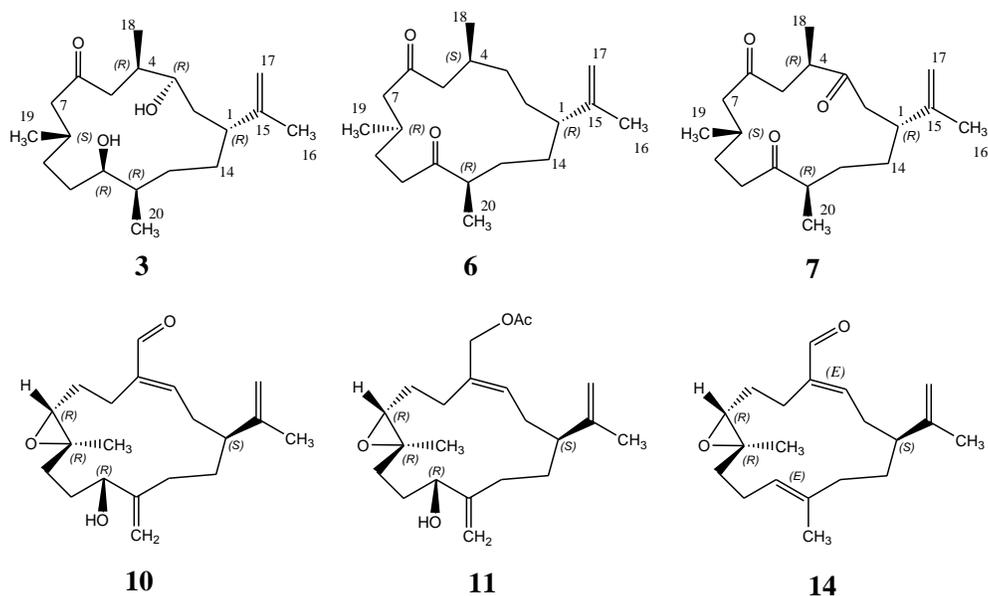
En conclusión una aproximación sintética del cembrano **19** es descrita en este capítulo. La estrategia fue desarrollada a partir de materiales de partida comercialmente disponibles, económicos y sencillos. La síntesis concisa del C_{10} -alílico **6** fue desarrollada en cinco pasos utilizando como precursor el geraniol **1**, para la obtención del C_9 -alcohol propargílico **16** se realizó una reacción de adición conjugada entre el bromuro de 3-butenilmagnesio y el ácido hidroxitetróico **8** produciendo **9**, el cual fue posteriormente convertido en el alcohol alílico **11**. Una ruptura oxidativa del doble enlace del alqueno terminal en el éter TBDPS **12** condujo al aldehído **14** y finalmente, la posterior adición del bromuro de acetileno al aldehído **14** produjo el correspondiente alcohol propargílico **15**. Un gran número de intentos fueron desarrollados para realizar la iodometilación del triple enlace en **15** para producir **16**, pero los rendimientos de la reacción no superaron el 2.0%, por lo cual no se pudo proseguir con el paso final de macrociclización entre el cloruro alílico **6** y el *E*-iodo vinílico **16** y de este modo obtener el cembrano **19**. Aunque en un modelo realizado utilizando el derivado **6a** obtenido mediante la reacción de Finkelstein con el sustrato *E*-iodo vinílico **16c**, la reacción mostró éxito en el acoplamiento. Finalmente, se logró desarrollar una ruta sintética que permitiera obtener los precursores **15** y **6** con altos rendimientos y en cantidades del orden de gramos, los cuales están en la ruta para la obtención de la estructura tipo cembrano con propiedades *antifouling* **19**, lográndose de este modo cumplir con uno más de los objetivos propuestos en esta tesis.

Nuevos intentos para lograr la conversión de **15** en **16** con mejores rendimientos están siendo realizados en este momento en nuestro grupo de investigación, para lograr concluir la síntesis total de este compuesto, ya que la estrategia sintética ha sido desarrollada en más de un 90%.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

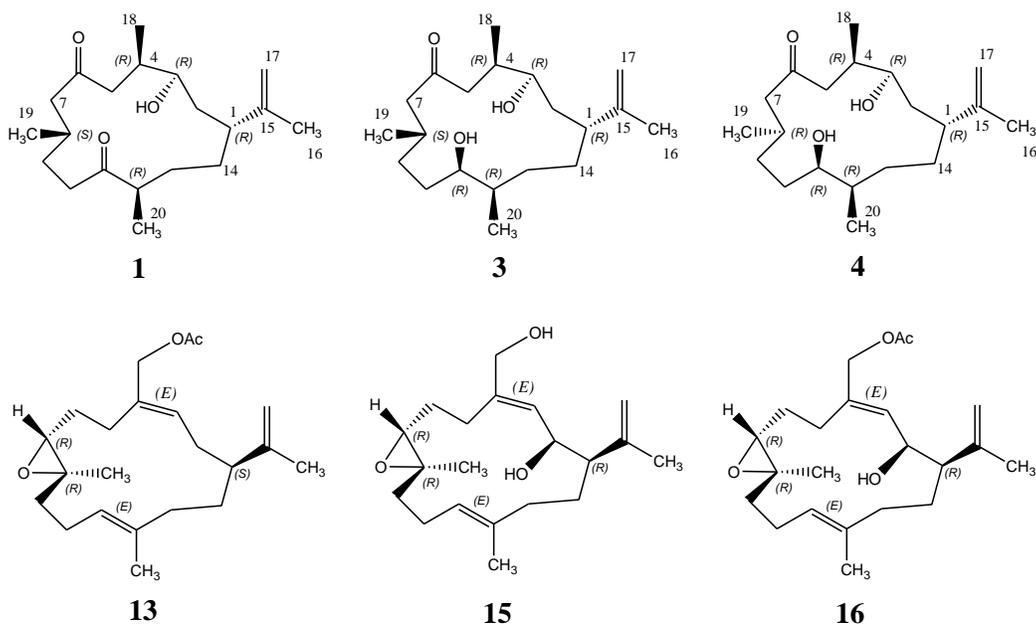
A partir del octocoral *P. flagellosa* se aislaron ocho compuestos tipo cembrano con actividad *antifouling* (1-8), entre estos, los compuestos 2, 4 y 6 se reportan por primera vez en la literatura. Adicionalmente, se reportaron o se revisaron la estereoquímica relativa y absoluta de los compuestos 1, 3, 5, 7 y 8 con la completa asignación de sus datos de RMN. Para el octocoral *E. knighti* se reportan ocho compuestos (9-16), de los cuales tres (9-11) son cembranos reportados por primera vez en la literatura. Las estereoestructuras fueron establecidas mediante el análisis detallado de los datos espectroscópicos obtenidos de los diferentes experimentos de RMN mono y bidimensionales, la configuración absoluta de los cembranos fue deducida a partir de los experimentos NOESY, para algunos compuestos se realizó rayos-X y mediante el uso del método modificado de Mosher.

Todos los cembranos naturales (1-16) fueron evaluados en los ensayos de IQS e inhibición del biofilm bacteriano, encontrándose que los compuestos 3, 6, 7, 10, 11 y 14 fueron los compuestos más activos en los dos bioensayos, lo que los hace excelentes agentes *antifouling* y a su vez pueden ser considerados como potenciales aditivos ambientalmente amigables en las pinturas comerciales *antifouling*, debido a que no son tóxicos. Es importante mencionar, que algunos cembranos naturales reportados en esta tesis presentan mejores valores de inhibición de QS y de biofilm bacteriano que los reportados para la mayoría de los compuestos aislados previamente de organismos marinos.

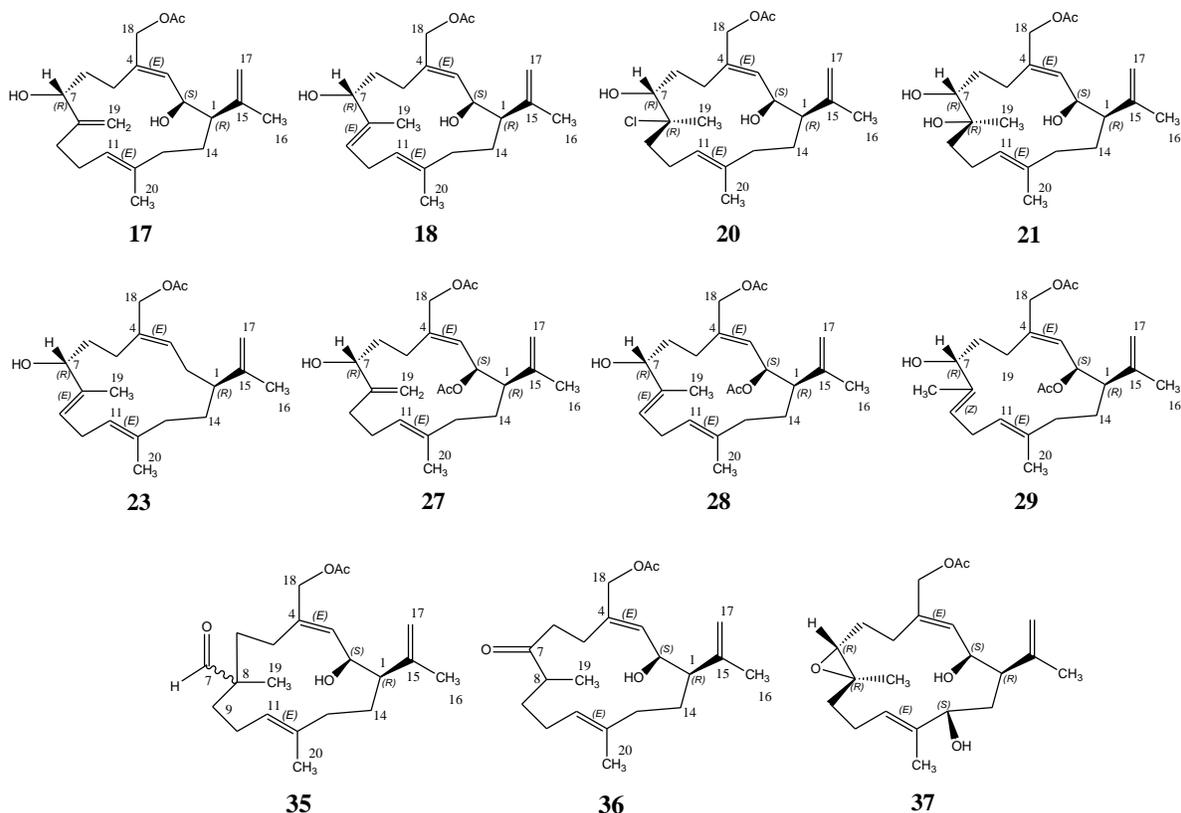


Se seleccionaron seis compuestos naturales como cabezas de serie (1, 3, 4, 13, 15 y 16) debido a la alta actividad que presentaron en uno o en los dos ensayos contra el *microfouling*, por su alta concentración en los gorgónidos, así como por la variedad de grupos funcionales reactivos presentes en sus estructuras, con el propósito de inducir o mejorar sus propiedades *antifouling*, mediante transformaciones químicas aplicadas

selectivamente en diferentes grupos funcionales reactivos del núcleo cembrano. Como resultado, se obtuvieron treinta y cuatro análogos de cembranos (**17-50**), siendo, la mitad de ellos notablemente activos en los bioensayos de IQS contra la cepa biosensora *C. violaceum* y en la inhibición del biofilm bacteriano contra las cepas *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *V. harveyi*, todo esto sin interferir con el crecimiento bacteriano, por lo cual se puede asumir que la inhibición del pigmento violaceína y del biofilm bacteriano (expresión del fenotipo) es causado por la interrupción del sistema de comunicación bacteriano (QS). De este modo se evita un efecto bactericida, lo cual representa un resultado importante, ya que no hay una presión selectiva en las bacterias a desarrollar resistencia a este tipo de compuestos. Es importante resaltar que de los 34 análogos semi-sintéticos obtenidos, solamente los compuestos **26-30** y el compuesto **46**, han sido previamente reportados en la literatura química, lográndose de este modo obtener veintiocho análogos nuevos tipo cembrano.



Todos los 34 análogos fueron evaluados en los ensayos *antifouling* mencionados anteriormente, encontrando un selecto grupo de cembranos estructuralmente relacionados (**17, 18, 20, 21, 23, 27, 28, 35-37**) como inhibidores de QS y del biofilm bacteriano, lo que los hace excelentes candidatos para ser usados como agentes activos en pinturas *antifouling* comerciales, ya que los compuestos inhibidores del biofilm e inhibidores de QS son a menudo considerados como potentes agentes *antifouling*. Este selecto grupo de análogos sintéticos tipo cembrano (**17-50**), junto con los compuestos naturales (**1-16**), pueden servir para posteriores estudios de actividad biológica, por ejemplo anticancerígena, antiinflamatoria y hasta como inhibidores de acetilcolinesterasa, ya que otros compuestos tipo cembrano estudiados previamente han exhibido estas actividades.



Sobre la base de los resultados *antifouling* de los cembranos naturales y sus análogos, se pudo establecer que el compuesto **28** fue el que presentó las mejores propiedades *antifouling* en los ensayos mencionados. Aprovechando la cantidad con la que fue obtenido el precursor “asperdiol” del octocoral *E. knighti*, se logró obtener el análogo **28** en cantidades del orden de gramos, para realizar los ensayos de campo.

Como resultado del ensayo *antifouling* de campo realizado en la Isla San Martín de Pajales (Caribe colombiano), se pudo establecer que los paneles tratados con el compuesto **28** inhibieron completamente el asentamiento del *macrofouling* durante el periodo de prueba de la formulación y es de resaltar que los cirripedios, uno de los principales organismos del *macrofouling* en donde se desarrolló el ensayo, no fueron encontrados en la parte frontal de los paneles cerámicos durante el periodo de prueba, sin embargo algunos cirripedios fueron observados a lo largo de la malla metálica donde se realizó el experimento. Adicionalmente, la formulación que contenía el cembrano **28** al 2.0% inhibió el *microfouling* en aproximadamente un 50% durante los seis meses que duró la prueba, inhibiendo principalmente las cianobacterias y las algas filamentosas (organismos del *microfouling*). También es importante mencionar que los paneles usados como blancos de referencia fueron completamente cubiertos por organismos del *fouling* como algas filamentosas, esponjas, tunicados, gusanos, poliquetos, tubícolas y cianobacterias, predominando en todos los tratamientos las algas.

Una aproximación sintética al cembrano con propiedades *antifouling* **19** es descrita en el capítulo V. La estrategia fue basada en la macrociclización del C₉-alcohol propargílico **16** y el cloruro C₁₀-alílico **6**, la cual se desarrolló a partir de materiales de partida comercialmente disponibles, económicos y sencillos. Se logró desarrollar una ruta sintética que permitiera obtener los precursores **15** y **6** con altos rendimientos y en cantidades del orden de gramos, compuestos que están en la ruta para la obtención de la estructura tipo cembrano con propiedades *antifouling*. El paso final de macrociclización no fue desarrollado debido al bajo

rendimiento en la obtención del compuesto **16**; sin embargo, se desarrolló una ruta sintética exitosa en la obtención de los compuestos **15** y **6**. Nuevos intentos para lograr la conversión de **15** en **16** con mejores rendimientos están siendo realizados en este momento en nuestro grupo de investigación, para lograr concluir la síntesis total de este compuesto, ya que la estrategia sintética ha sido desarrollada en más de un 90%.

Los compuestos naturales de origen marino con actividad *antifouling* tienen gran relevancia debido a que en muchos casos, los organismos mismos son quienes los producen como defensas químicas para protegerse de la colonización de otros organismos. Por esta razón se recomienda seguir con la búsqueda de cembranos, los cuales podrían ser una alternativa interesante en el desarrollo de pinturas *antifouling* y ambientalmente amigables.

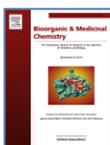
Se recomienda continuar con las transformaciones químicas a los compuestos tipo cembrano encontrados en gran cantidad, con el fin de obtener una mayor diversidad estructural de moléculas relacionadas, las cuales pueden servir para posteriores estudios biológicos. Adicionalmente, los 50 cembranos obtenidos pueden ser utilizados como una biblioteca de compuestos para realizar estudios de actividad frente a un gran número de dianas biológicas, por lo cual se recomienda continuar con los estudios de relación estructura-actividad *antifouling*, así como otros que puedan resultar de interés a nivel farmacológico e industrial.

Con base en los resultados obtenidos en el ensayo de campo, se recomienda continuar evaluando compuestos con estructuras similares al cembrano que presentó las mejores propiedades *antifouling*, para establecer el comportamiento del principio activo durante periodos más largos. Los parámetros que se recomiendan estudiar son: la velocidad de lixiviación del compuesto al medio marino, la velocidad de descomposición del principio activo en la matriz y la toxicidad del principio activo frente a diversos organismos del *fouling*.

Se recomienda continuar con la ruta de síntesis total del cembrano *antifouling*, ya que cerca del 90% de la síntesis ha sido realizada exitosamente y con excelentes rendimientos, restando solamente la conversión del compuesto **15** en **16** y posteriormente el paso final de macrociclización entre los compuestos C₁₀-alílico **6** y C₉-alcohol propargílico **16** para de este modo lograr obtener la molécula objetivo.

Finalmente, de acuerdo a los resultados obtenidos a lo largo de esta investigación se recomienda sintetizar moléculas sencillas (que se puedan sintetizar fácilmente en el laboratorio y con altos rendimientos), pero que contengan los grupos funcionales determinantes en la actividad *antifouling* establecida en los cembranos más activos, para ser evaluados como potenciales agentes *antifouling* y que puedan ser utilizados como principios activos en recubrimientos industriales.

PUBLICACIONES CIENTÍFICAS Y PARTICIPACIONES EN EVENTOS



Tello, E.; Castellanos, L.; Duque, C. **2012**. "Synthesis of cembranoid analogues and evaluation of their potential as quorum sensing inhibitors" *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 21, 242-256. DOI 10.1016/j.bmc.2012.10.022.



Tello, E.; Castellanos, L.; Arévalo-Ferro, C.; Duque, C. **2012**. "Disruption in Quorum sensing Systems and Bacterial Biofilm Inhibition by Cembranoid Diterpenes Isolated from the Octocoral *Eunicea knighti*". *Journal of Natural Products* 75, 1637-1642.



Tello, E.; Castellanos, L.; Arévalo-Ferro, C.; Rodríguez, J.; Jimenez, C.; Duque, C. **2011**. "Absolute stereochemistry of antifouling cembranoid epimers at C-8 from the Caribbean octocoral *Pseudoplexaura flagellosa*. Revised structures of plexaurones". *Tetrahedron* 67, 9112-9121.



Mora, J.; Arévalo-Ferro, C.; Ramos, F.A.; Tello, E.; Duque, C.; Lhullier, C.; Falkenberg, M.; Schenkel, E. P. **2011**. "Antifouling Activities against Colonizer Marine Bacteria of Extracts from Marine Invertebrates Collected in the Colombian Caribbean Sea and on the Brazilian Coast (Santa Catarina)" *Zeitschrift Für Naturforschung. C, Journal of Biosciences* 66, 515-526.



Silva, I.; Caon, T.; Luckemeyer, D.; Ramos, F. A.; Tello, E.; Arevalo-Ferro, C.; Schenkel, E. P.; Duque, C.; Simoes, C. **2011**. "Antiherpes screening of marine organisms from Colombian Caribbean Sea". *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 21(4), 608-614.



Tello, E.; Castellanos, L.; Nieto, F.; Puyana, M.; Duque, C. **2013**. "Antifouling activity of cembranoids *in vitro* and *in situ*, a model assay". *Biofouling* Sometido.



Castellanos, F.; Tello, E.; Umaña, A.; Castellanos, L. **2013**. "Bioprospeccion de extractos naturales marinos como inhibidores de acetilcolinesterasa". *Química Nova* Sometido.

CAPÍTULOS DE LIBRO



Duque, C. Tello, E.; Castellanos, L.; Fernández, M.; Arévalo-Ferro, C. "Bacterial Sensors in Microfouling Assays". En: ***State of the Art in Biosensors / Book 2***. Intech Open Science/open minds (Eds). **2012**. Capítulo 4. ISBN 980-953-307-691-6. DOI 10.5772/53756.

ARTÍCULOS EN PREPARACIÓN

Jiménez, L.; Tello, E.; Castellanos, L.; Daza, E. **2013**. "Correlación del potencial electrostático molecular MEP de cembranos, con su actividad *antifouling*" En preparación

Tello, E.; Castellanos, L.; Duque, C. Pattenden, G. **2013**. "Synthetic Studies towards Antifouling Cembranoids Related to Knighthol and Asperdiol". ***Tetrahedron*** En preparación.

Amaya, F.; Tello, C.; Duque, C.; Castellanos, L. **2013**. "Síntesis de análogos de cembranos con propiedades *antifouling*". En preparación

EVENTOS CIENTÍFICOS

International Symposium of Pharmacognosy and VIII SBFgnosia 2012, Brasil. Duque, C. Tello, C. "Colombian Caribbean Sea octocorals, a good source of compounds for industrial process (antibiotics and antifoulants)".

XI Congreso Colombiano de Fitoquímica 2011. Medellín, Colombia. Castellanos, F. A.; Tello, E.; Umaña, A.; Castellanos, L. "Bioprospección de extractos naturales marinos como inhibidores de acetilcolinesterasa".

II Simposio Taller, Las Ciencias del Mar en la Universidad Nacional de Colombia. 2011. Santa Marta, Colombia. Castellanos, F. A.; Tello, E.; Umaña, A.; Castellanos, L. "Bioprospección de extractos naturales marinos como inhibidores de acetilcolinesterasa".

XXIX Congreso Latinoamericano de Química 2010. Cartagena, Colombia. Tello, E.; Castellanos, L.; Arévalo-Ferro, C.; Zea, S.; Puyana, M.; Duque, C. "Diterpenos de tipo cembrano con actividad antifouling aislados del octocoral blando *Eunicea knighti*".

XIV Seminario Nacional de Ciencias y Tecnologías del Mar 2010. Colombia. Duque, C.; Correa, H.; Tello, E. "Composición química y actividad biológica vs aprovechamiento de recursos marinos y costeros".

XX Congreso Latinoamericano de Microbiología IX Encuentro Nacional de Microbiólogos 2010. Uruguay. Martínez, Y. R.; Tello, E.; Arévalo-Ferro, C. "inhibición del desarrollo de biopelículas bacterianas utilizando compuestos de origen marino".

COMPUESTOS TIPO CEMBRANO NATURALES Y ALGUNOS
ANÁLOGOS SINTÉTICOS COMO POTENCIALES AGENTES
ANTIFOULING

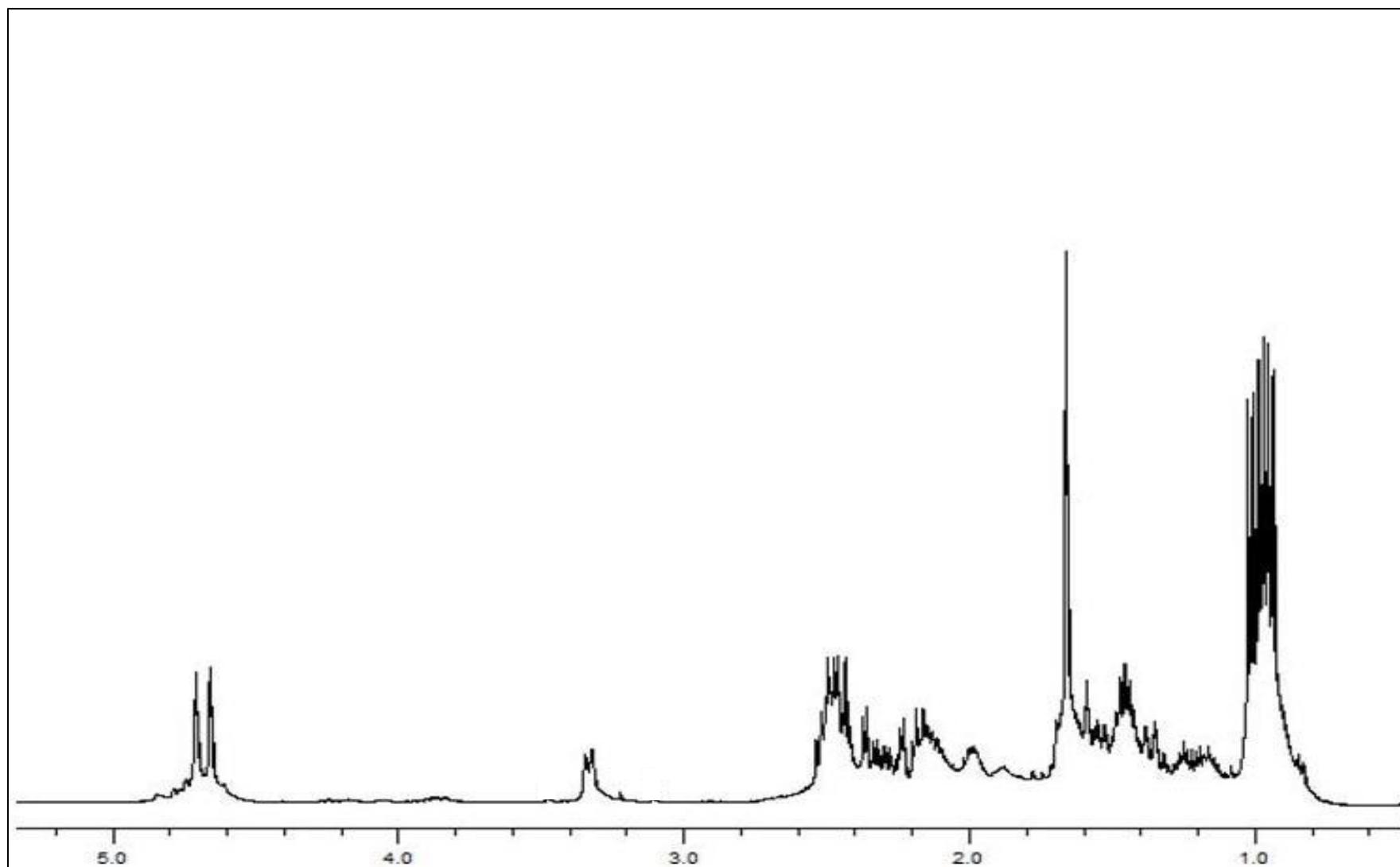
EDISSON TELLO CAMACHO

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS-QUÍMICA

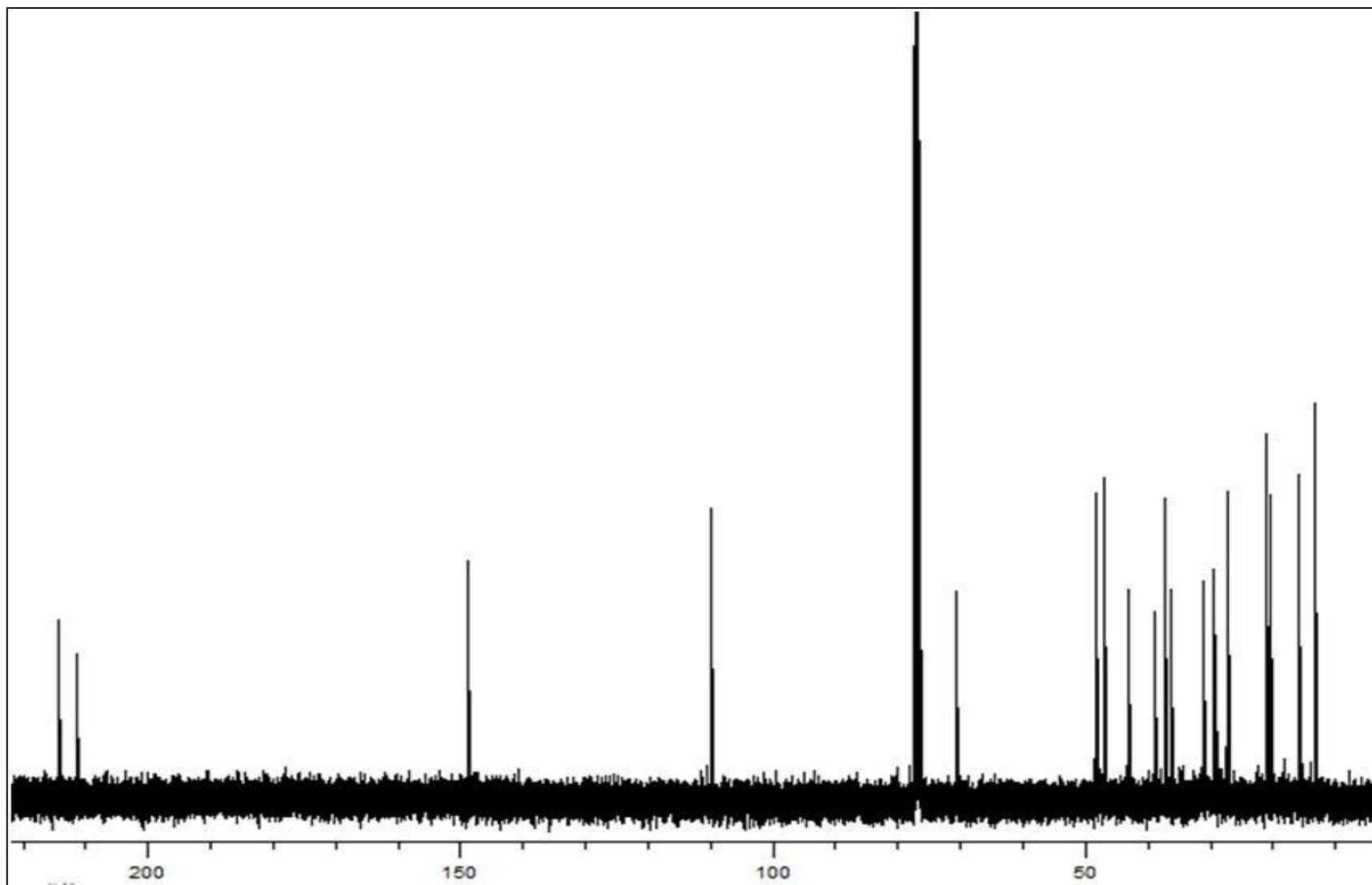
Tabla de Contenido

- S1.** Espectro de RMN ^1H de **1** en CDCl_3 a 400 MHz.
- S2.** Espectro de RMN ^{13}C de **1** en CDCl_3 a 100 MHz.
- S3.** Espectro de RMN ^1H de **2** en CDCl_3 a 400 MHz.
- S4.** Espectro de RMN ^{13}C de **2** en CDCl_3 a 100 MHz.
- S5.** Espectro de RMN ^1H de **3** en CD_2Cl_2 a 400 MHz.
- S6.** Espectro de RMN ^{13}C de **3** en CD_2Cl_2 a 100 MHz.
- S7.** Espectro de RMN ^1H de **49** en CDCl_3 a 400 MHz.
- S8.** Espectro de RMN ^{13}C de **49** en CDCl_3 a 100 MHz.
- S9.** Espectro de RMN ^1H de **4** en CDCl_3 a 400 MHz.
- S10.** Espectro de RMN ^{13}C de **4** en CDCl_3 a 100 MHz.
- S11.** Espectro de RMN ^1H de **5** en CDCl_3 a 400 MHz.
- S12.** Espectro de RMN ^{13}C de **5** en CDCl_3 a 100 MHz.
- S13.** Espectro de RMN ^1H de **6** en CDCl_3 a 400 MHz.
- S14.** Espectro de RMN ^{13}C de **6** en CDCl_3 a 100 MHz.
- S15.** Espectro de RMN ^1H de **7** en CDCl_3 a 400 MHz.
- S16.** Espectro de RMN ^{13}C de **7** en CDCl_3 a 100 MHz.

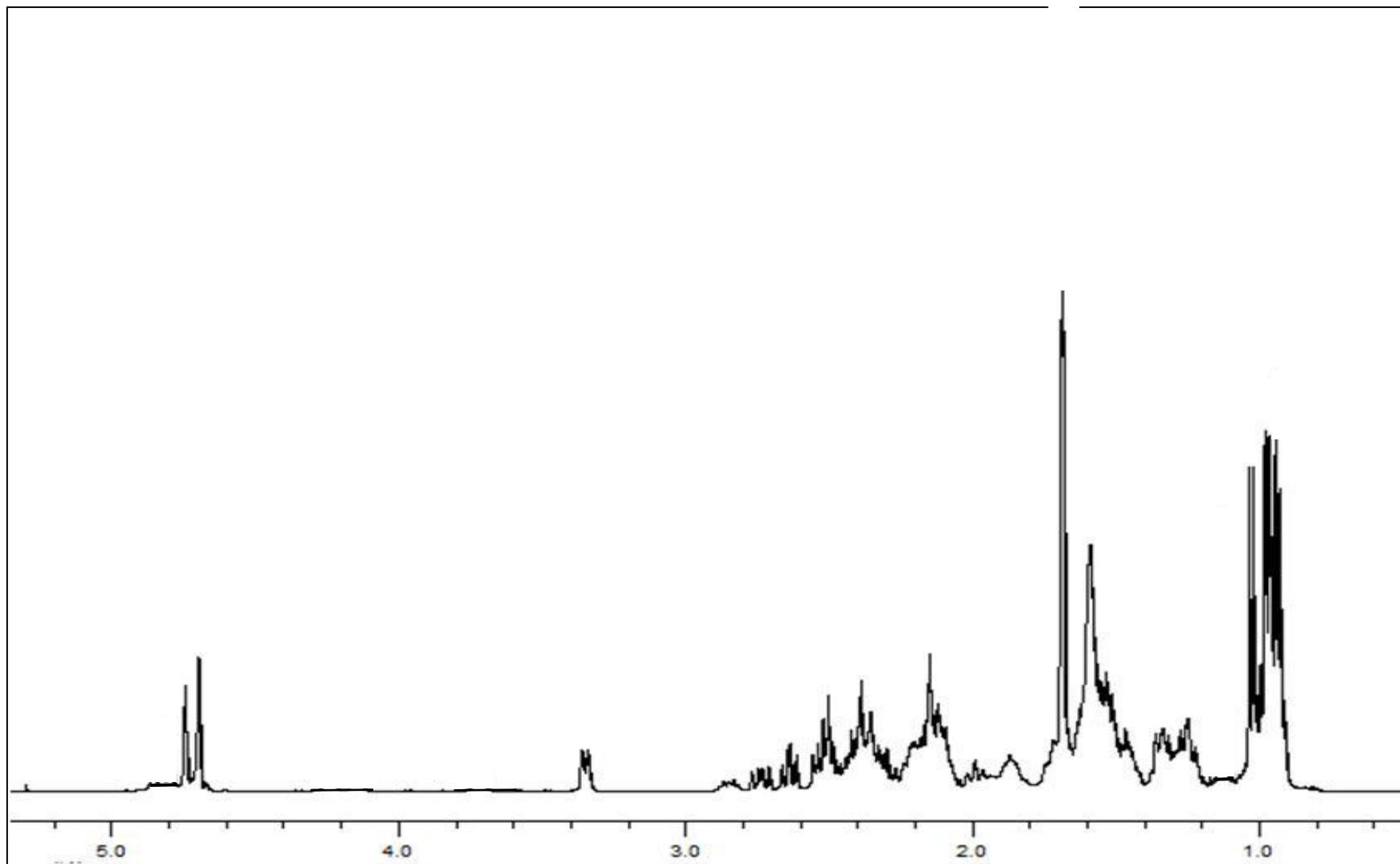
- S17.** Espectro de RMN ^1H de **8** en CDCl_3 a 400 MHz.
- S18.** Espectro de RMN ^{13}C de **8** en CDCl_3 a 100 MHz.
- S19.** Espectro de RMN ^1H de **9** en CDCl_3 a 400 MHz.
- S20.** Espectro de RMN ^{13}C de **9** en CDCl_3 a 100 MHz.
- S21.** Espectro de RMN ^1H de **10** en CDCl_3 a 400 MHz.
- S22.** Espectro de RMN ^{13}C de **10** en CDCl_3 a 100 MHz.
- S23.** Espectro de RMN ^1H de **11** en CDCl_3 a 400 MHz.
- S24.** Espectro de RMN ^{13}C de **11** en CDCl_3 a 100 MHz.
- S25.** Datos experimentales de los Compuestos **12-16**.
- S26.** Espectro de RMN ^1H de **17** en CDCl_3 a 400 MHz.
- S27.** Espectro de RMN ^{13}C de **17** en CDCl_3 a 100 MHz.
- S28.** Espectro de RMN ^1H de **18** en CDCl_3 a 400 MHz.
- S29.** Espectro de RMN ^{13}C de **18** en CDCl_3 a 100 MHz.
- S30.** Espectro de RMN ^1H de **20** en CDCl_3 a 400 MHz.
- S31.** Espectro de RMN ^{13}C de **20** en CDCl_3 a 100 MHz.
- S32.** Espectro de RMN ^1H de **21** en CDCl_3 a 400 MHz.
- S33.** Espectro de RMN ^{13}C de **21** en CDCl_3 a 100 MHz.
- S34.** Espectro de RMN ^1H de **27** en CDCl_3 a 400 MHz.
- S35.** Espectro de RMN ^{13}C de **27** en CDCl_3 a 100 MHz.
- S36.** Espectro de RMN ^1H de **28** en CDCl_3 a 400 MHz.
- S37.** Espectro de RMN ^{13}C de **28** en CDCl_3 a 100 MHz.
- S38.** Espectro de RMN ^1H de **29** en CDCl_3 a 400 MHz.
- S39.** Espectro de RMN ^{13}C de **29** en CDCl_3 a 100 MHz.
- S40.** Espectro de RMN ^1H de **35** en CDCl_3 a 400 MHz.
- S41.** Espectro de RMN ^{13}C de **35** en CDCl_3 a 100 MHz.
- S42.** Espectro de RMN ^1H de **45** en CDCl_3 a 400 MHz.
- S43.** Espectro de RMN ^{13}C de **45** en CDCl_3 a 100 MHz.
- S44.** Espectro de RMN ^1H de **49** en CDCl_3 a 400 MHz.
- S45.** Espectro de RMN ^{13}C de **49** en CDCl_3 a 100 MHz.



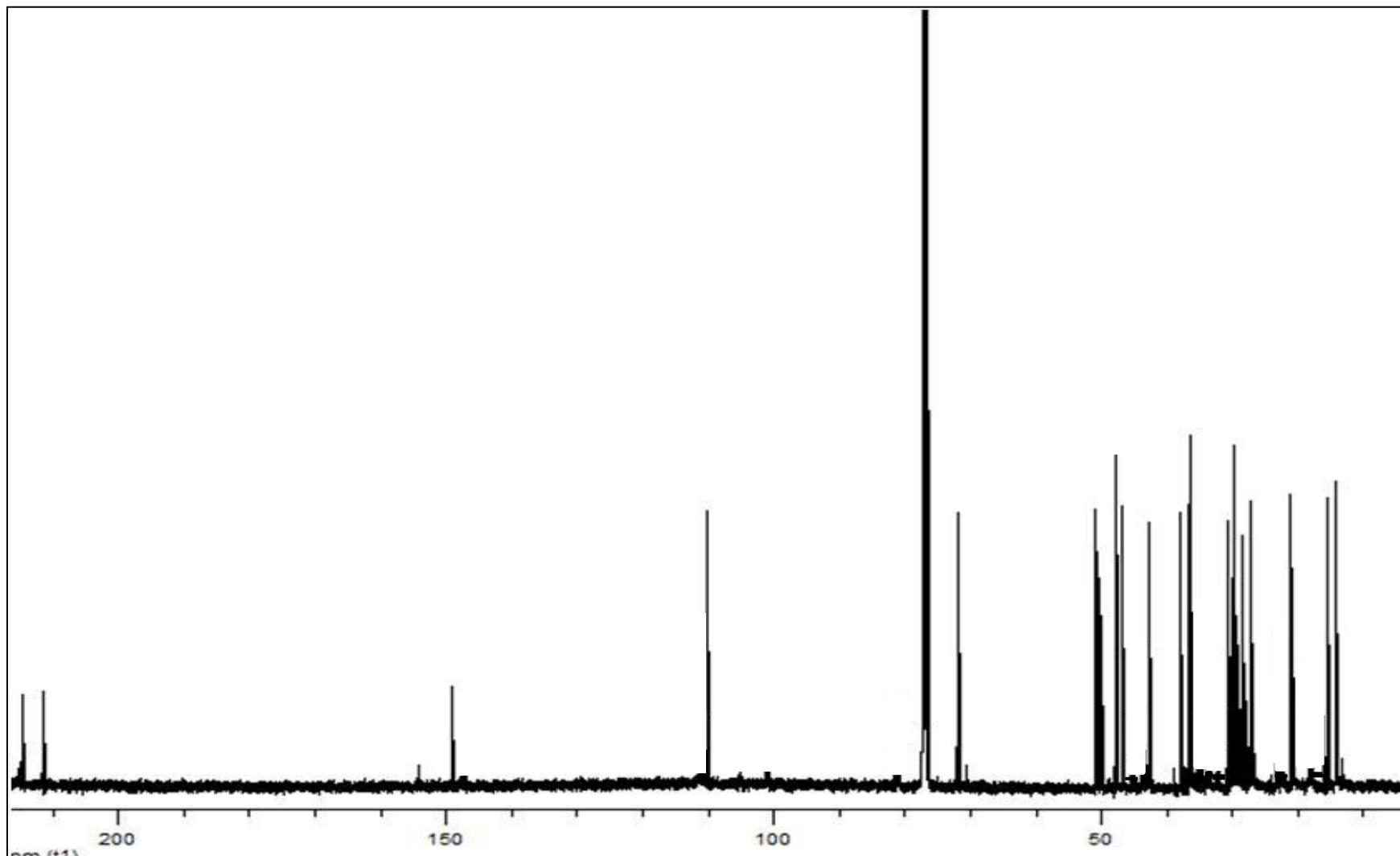
S1. ^1H NMR spectrum of **1** in CDCl_3 at 400 MHz.



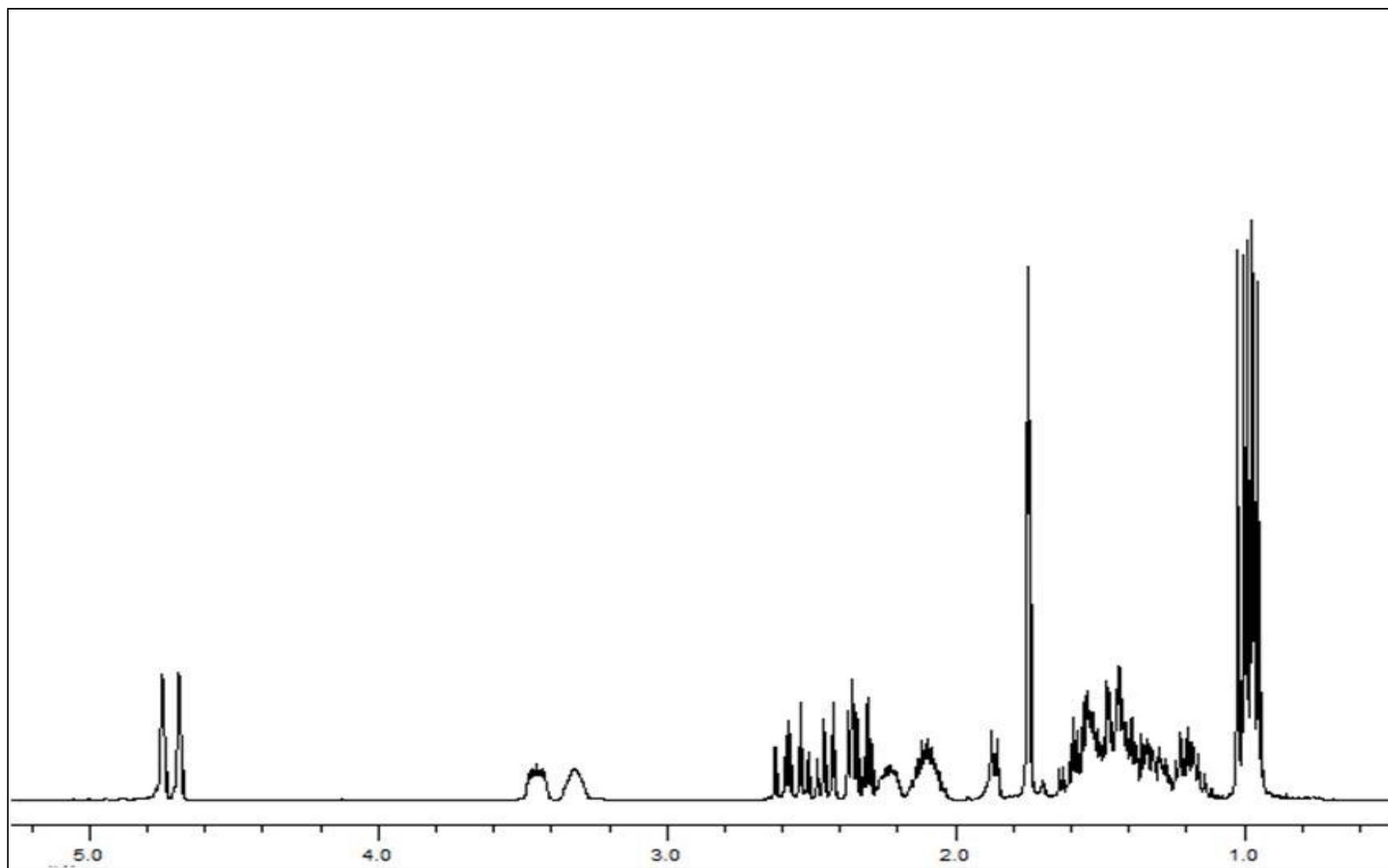
S2. ^{13}C NMR spectrum of **1** in CDCl_3 at 100 MHz.



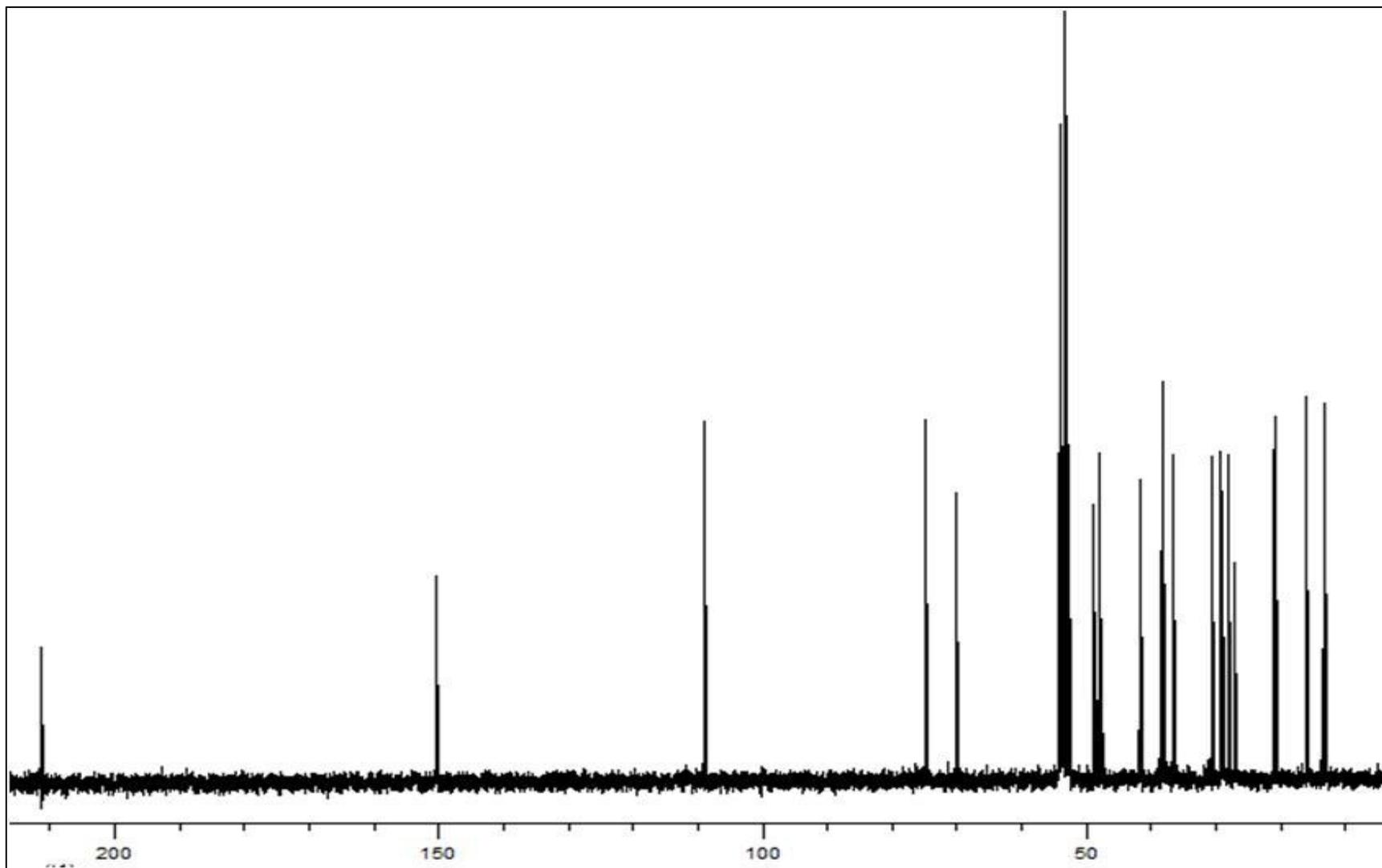
S3. ^1H NMR spectrum of **2** in CDCl_3 at 400 MHz.



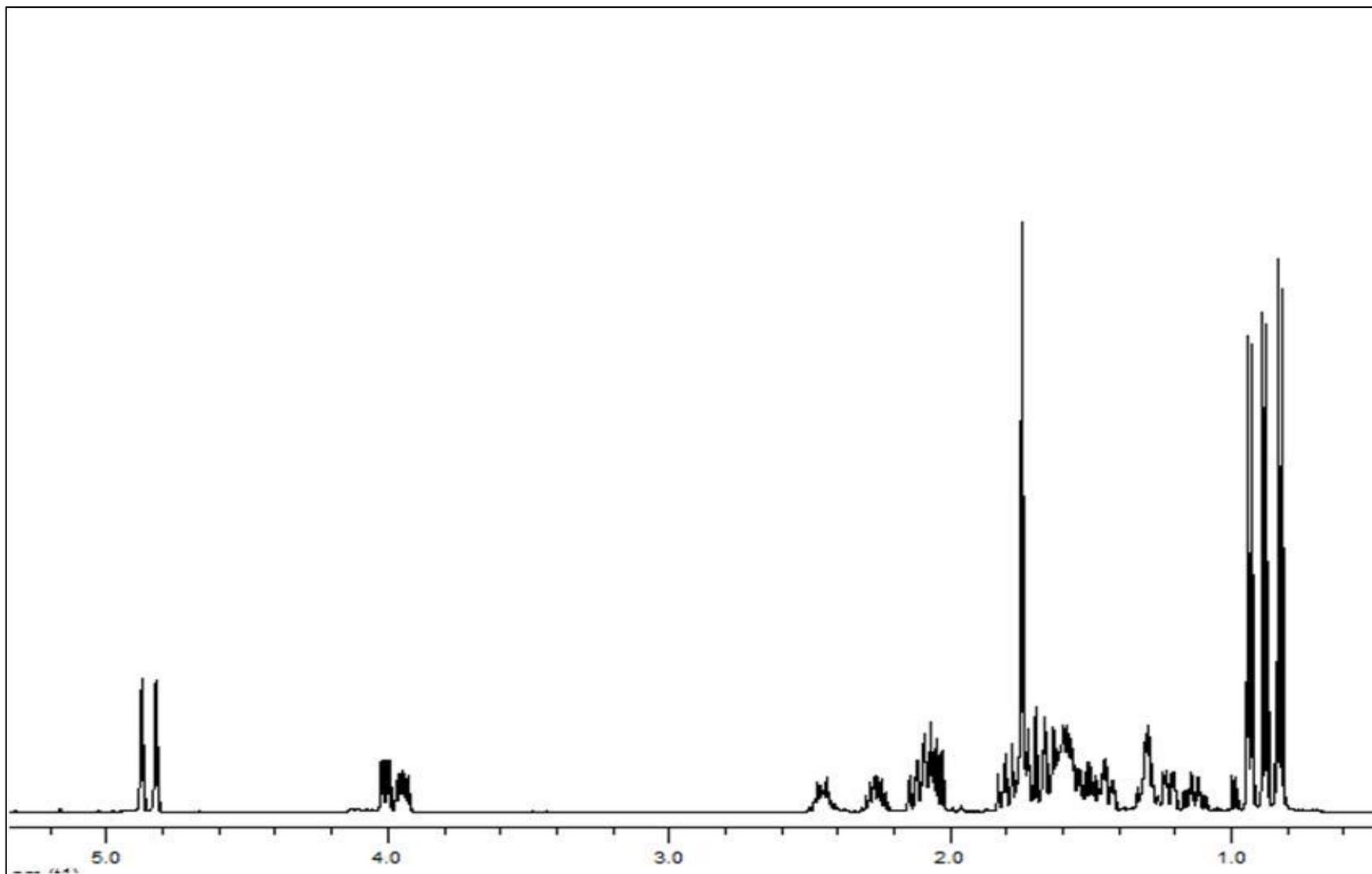
S4. ^{13}C NMR spectrum of **2** in CDCl_3 at 100 MHz.



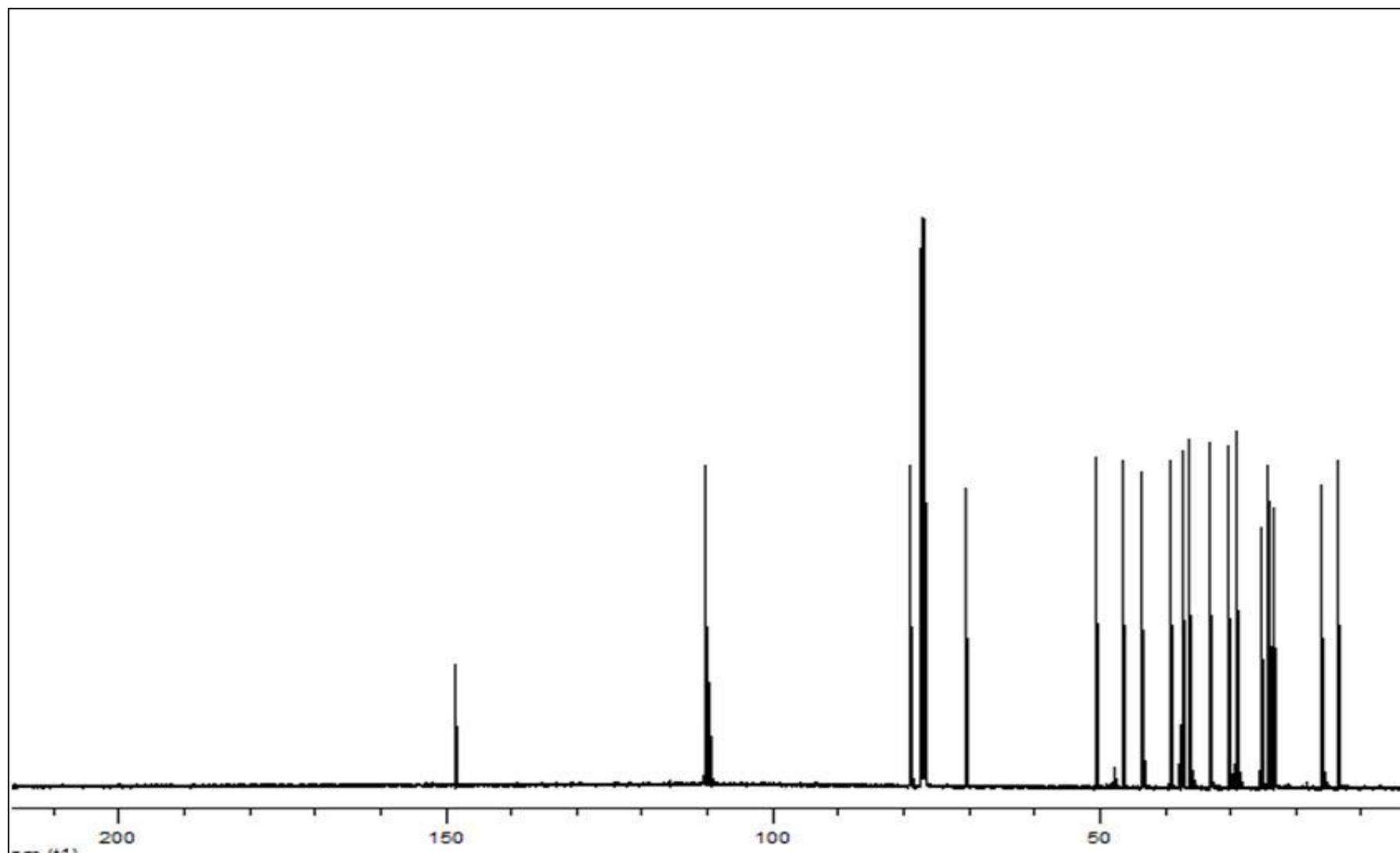
S5. ^1H NMR spectrum of **3** in CD_2Cl_2 at 400 MHz.



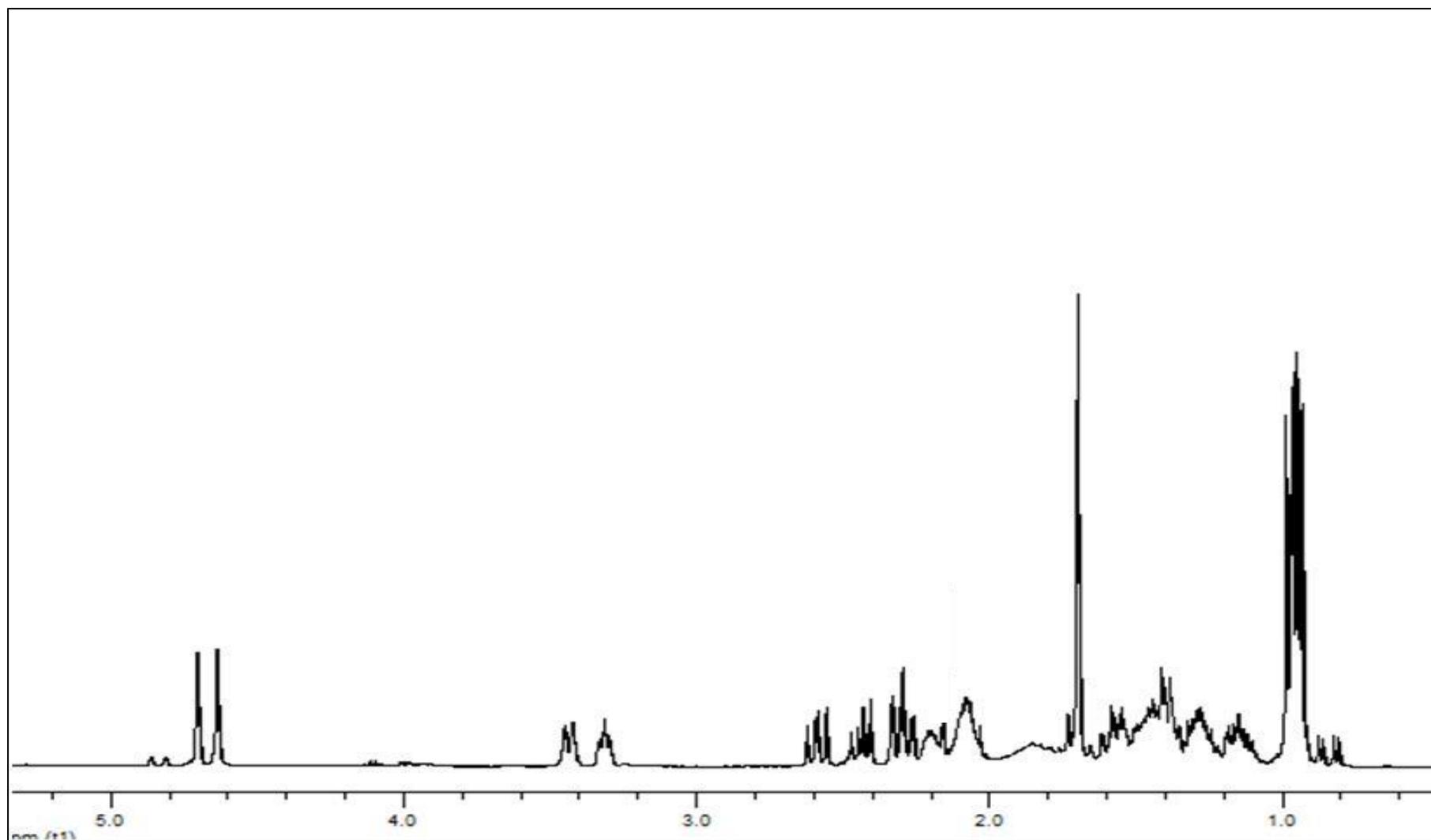
S6. ^{13}C NMR spectrum of **3** in CD_2Cl_2 at 100 MHz.



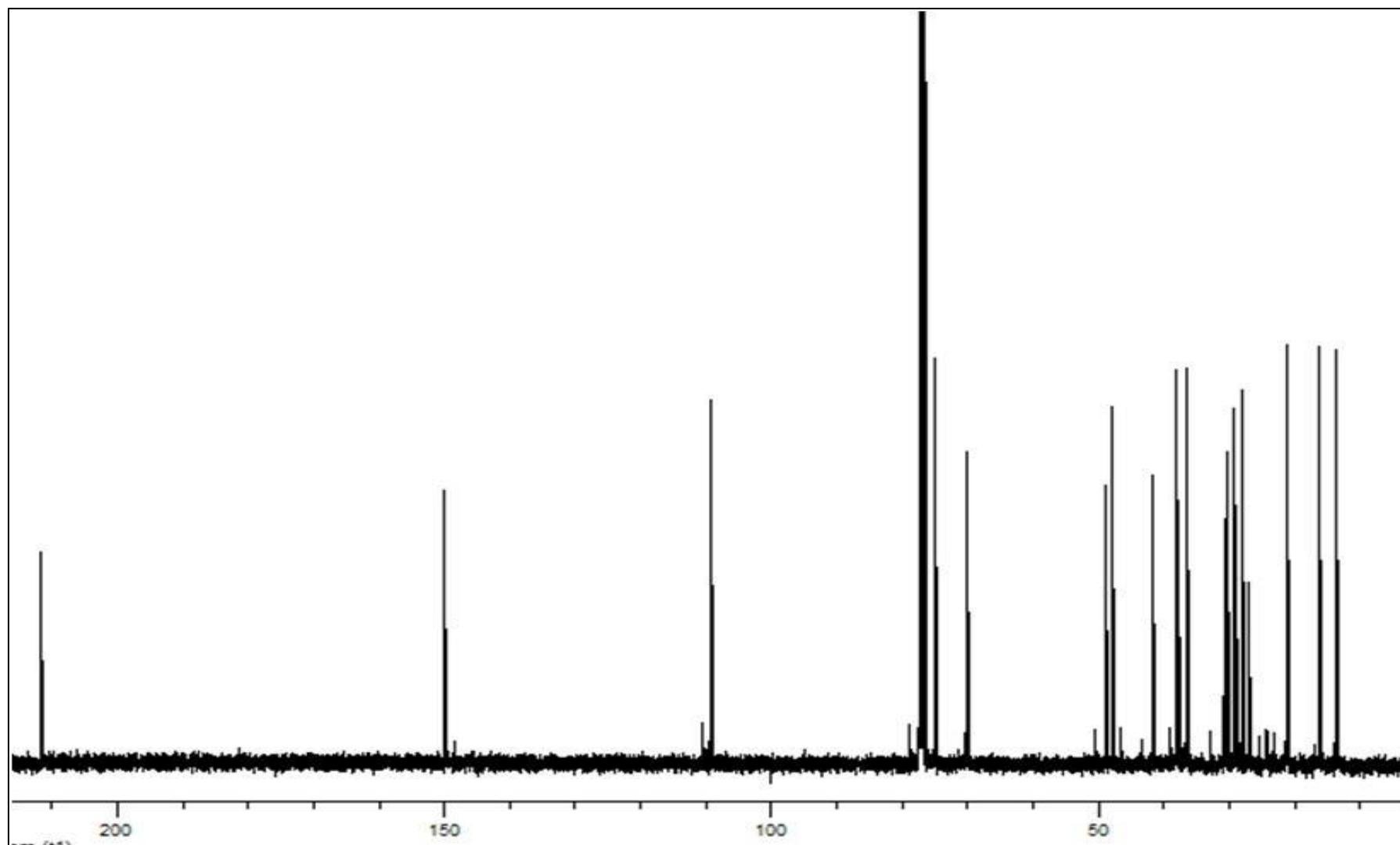
S7. ^1H NMR spectrum of **49** in CDCl_3 at 400 MHz.



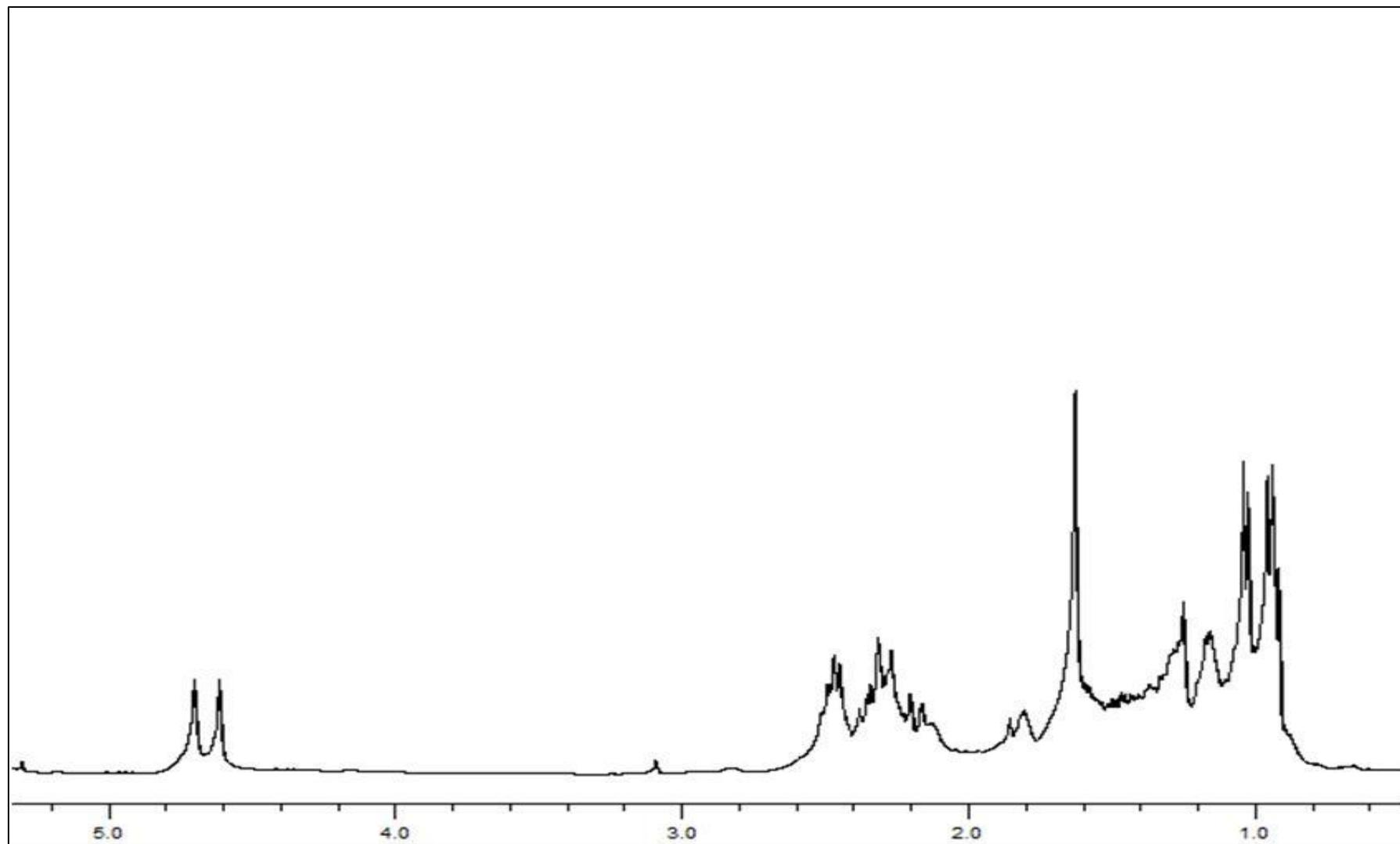
S8. ^{13}C NMR spectrum of **49** in CDCl_3 at 100 MHz



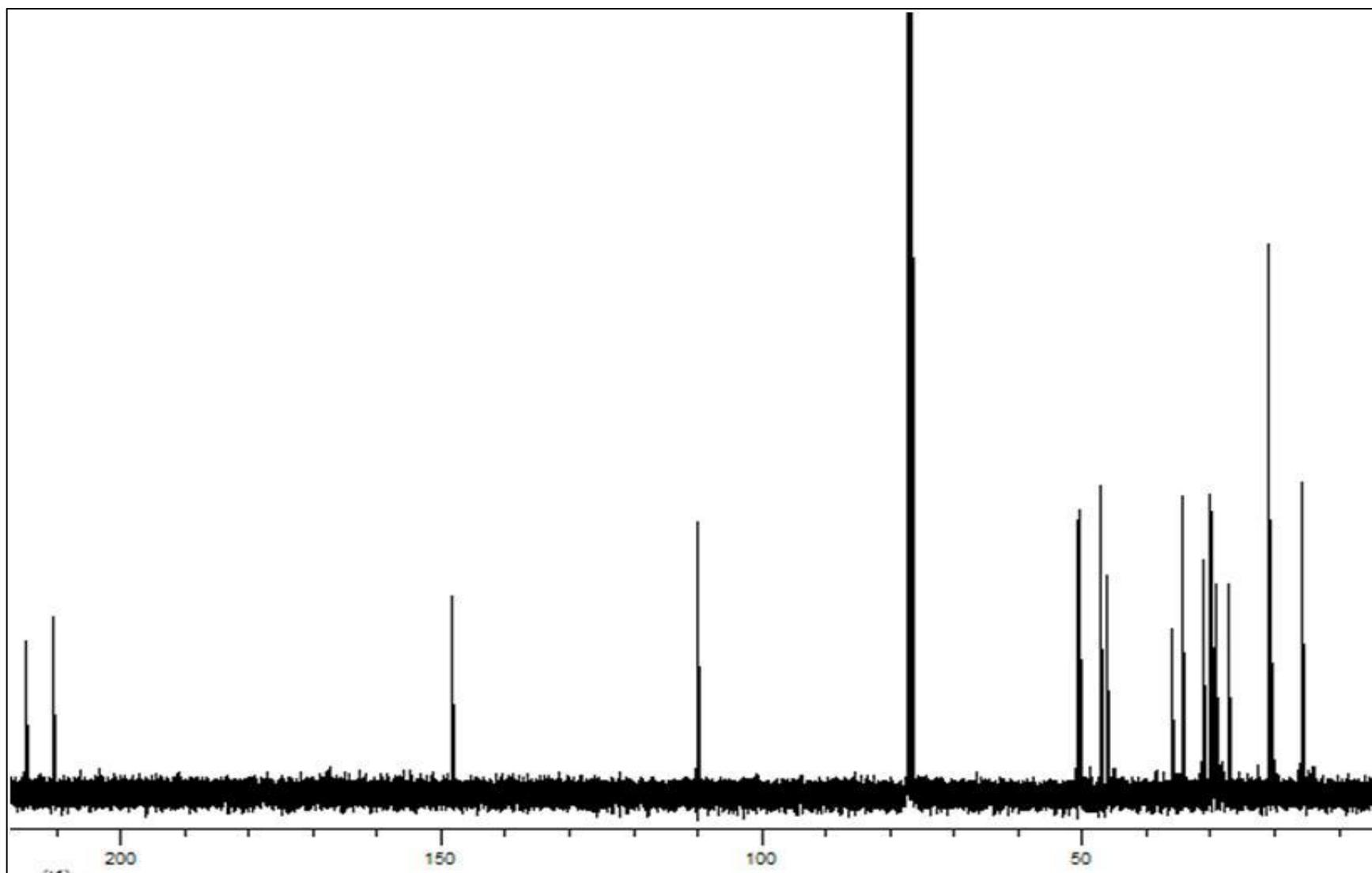
S9. ^1H NMR spectrum of **4** in CDCl_3 at 400 MHz.



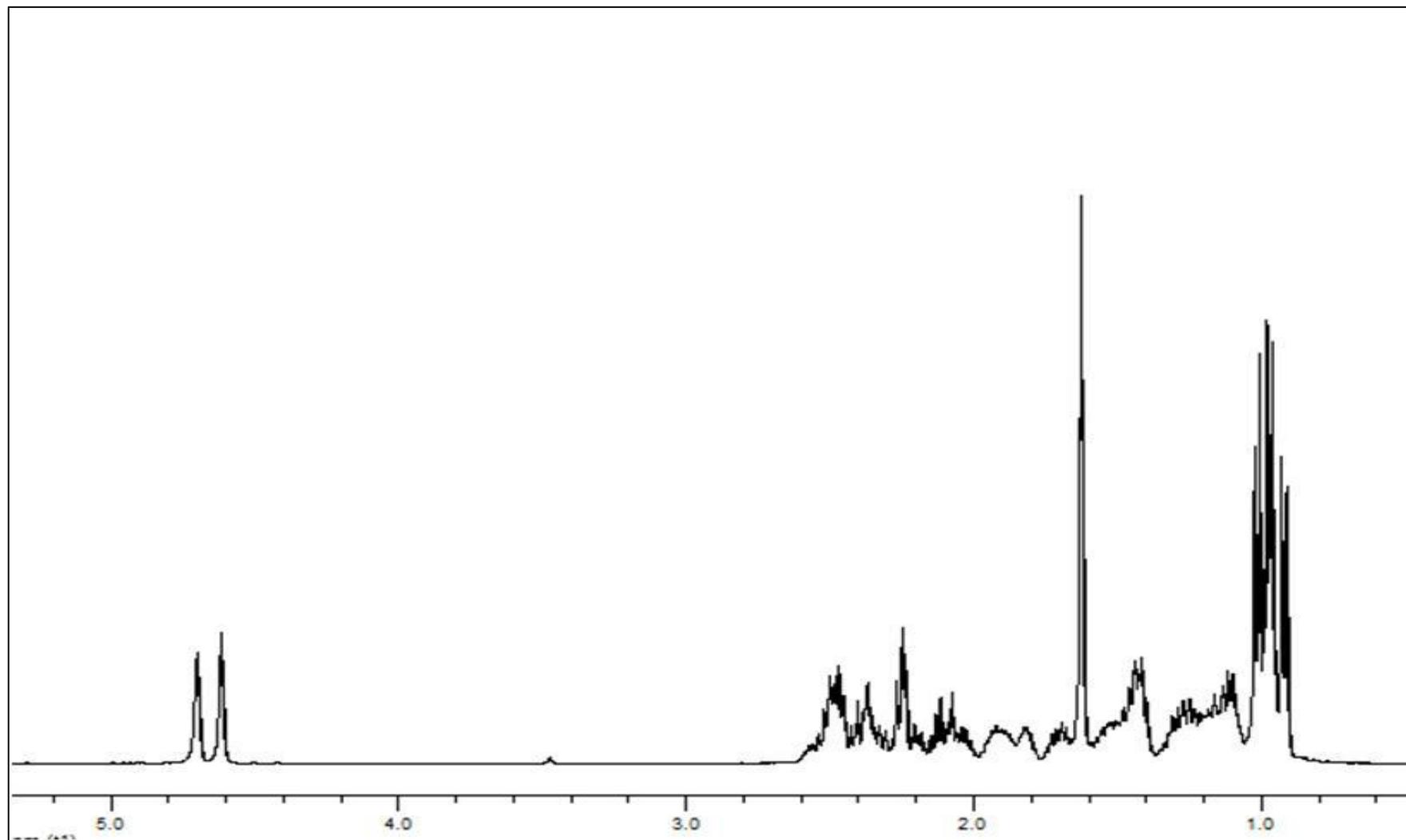
S10. ^{13}C NMR spectrum of **4** in CDCl_3 at 100 MHz.



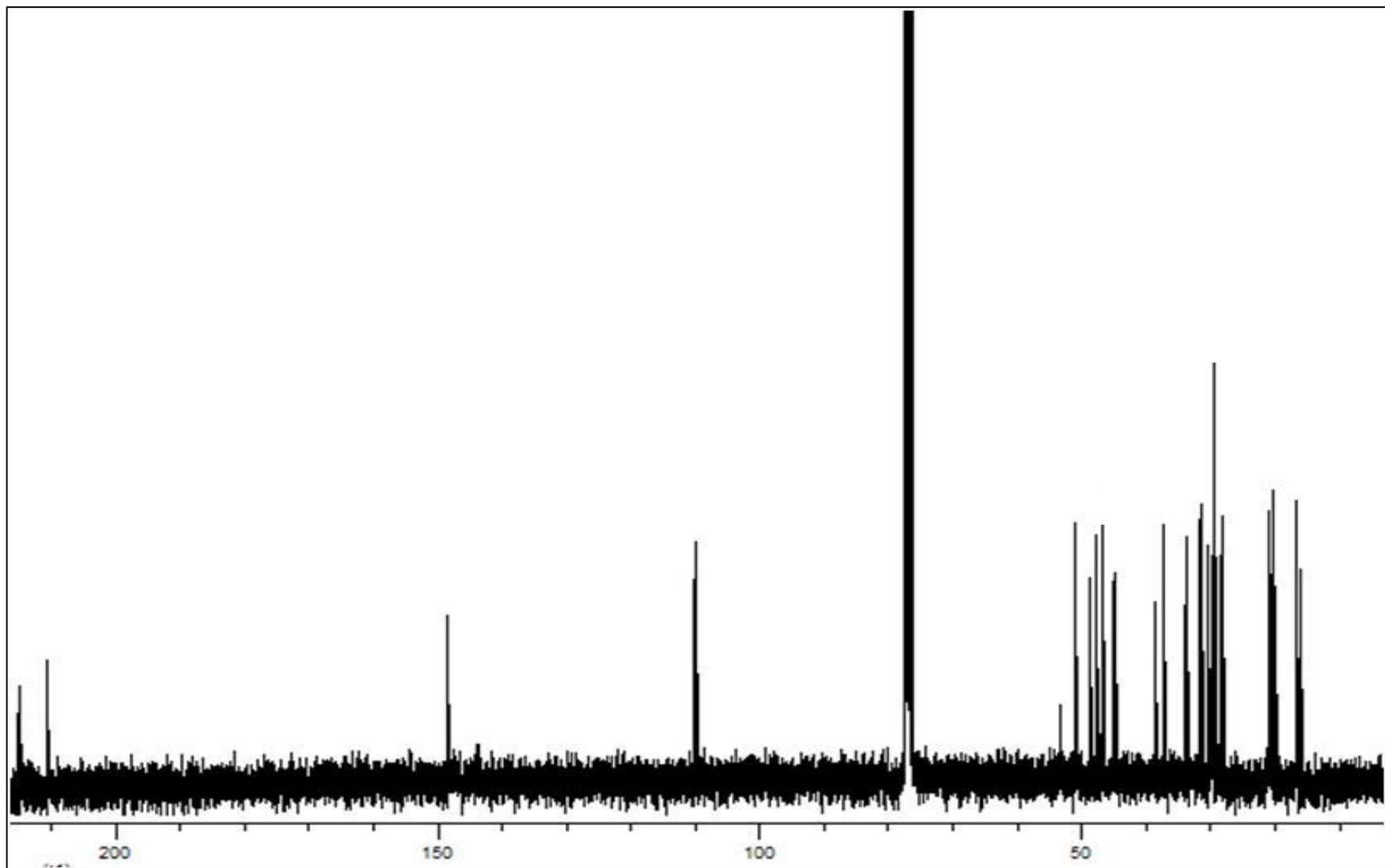
S11. ^1H NMR spectrum of **5** in CDCl_3 at 400 MHz.



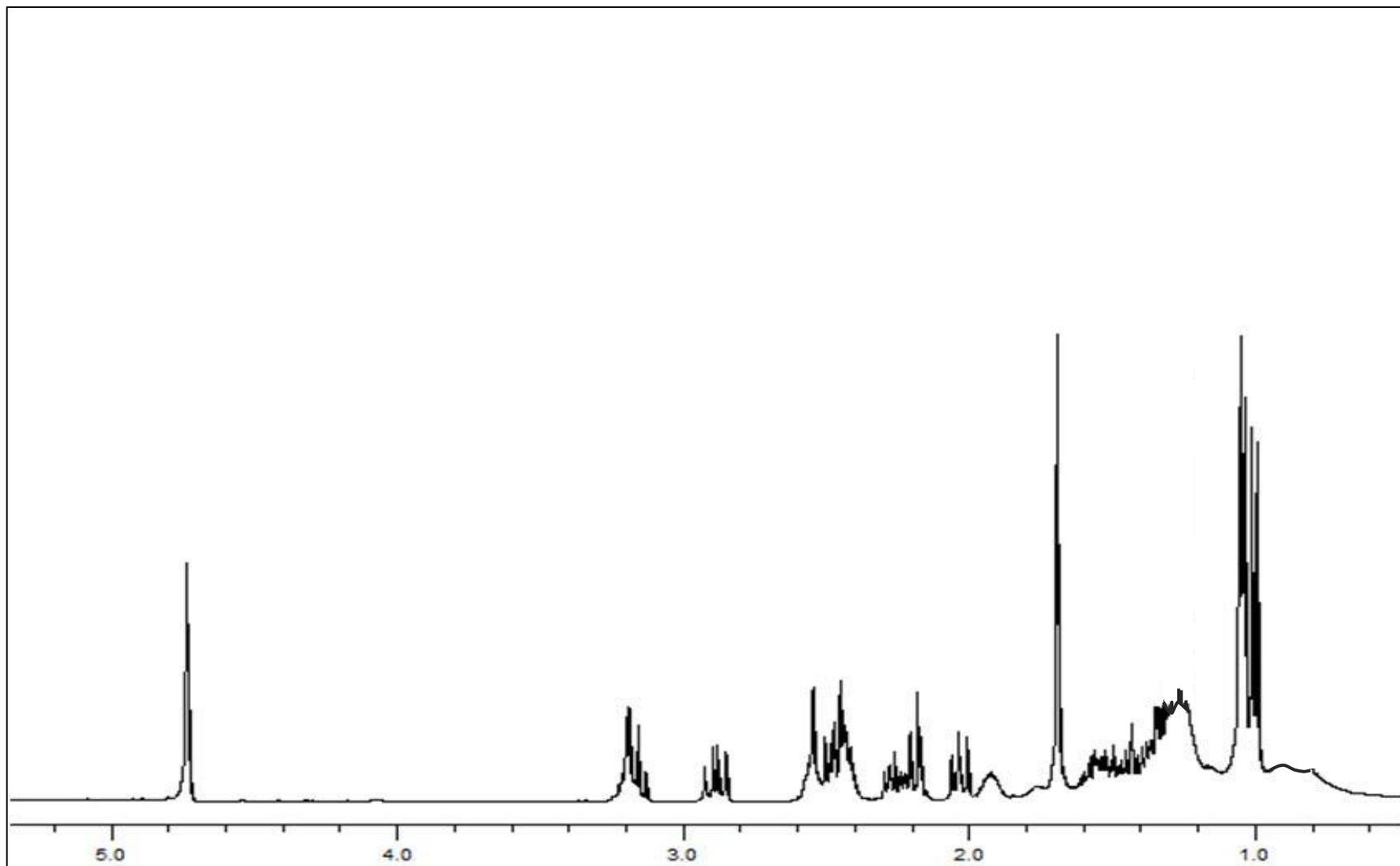
S12. ^{13}C NMR spectrum of **5** in CDCl_3 at 100 MHz.



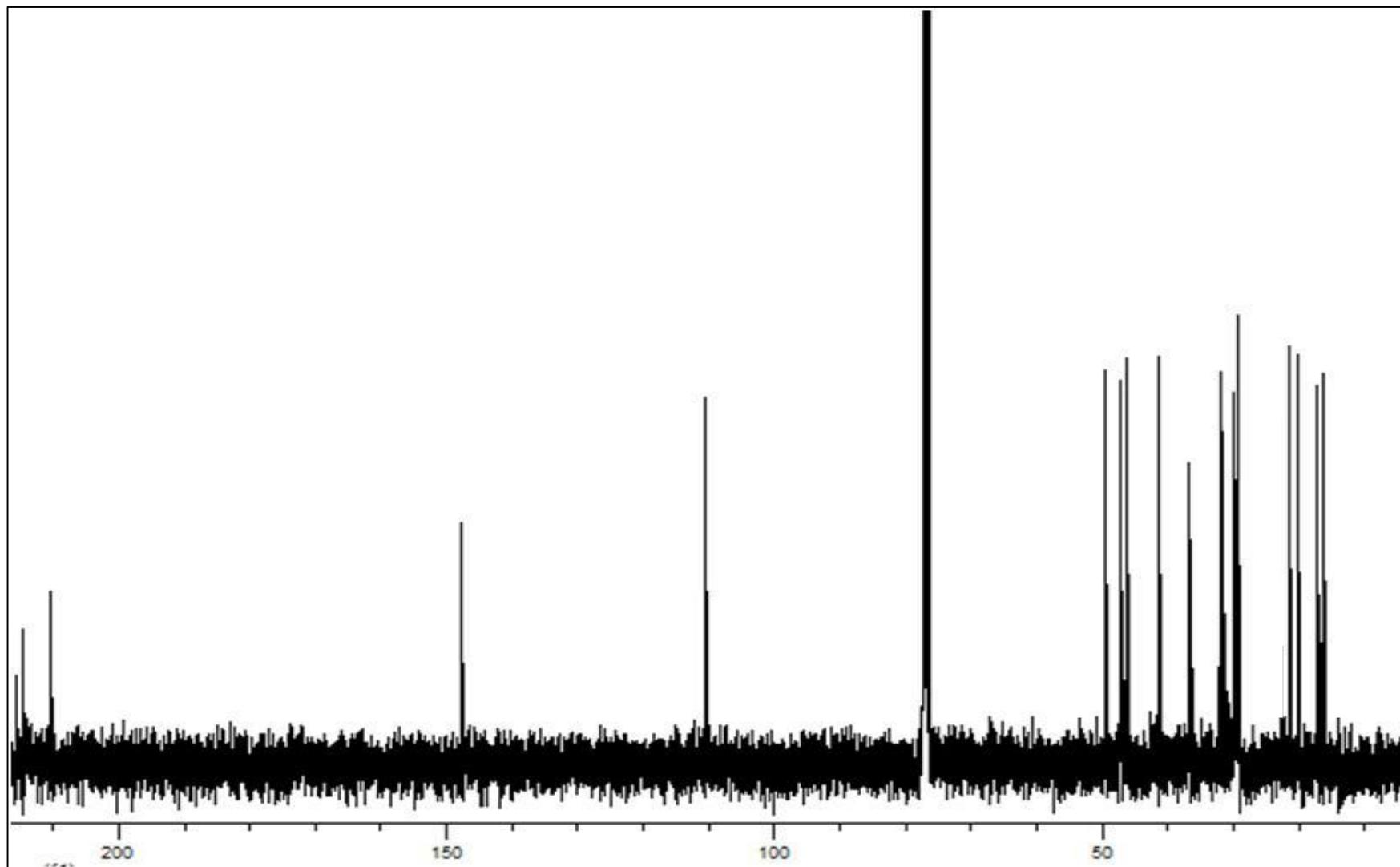
S13. ^1H NMR spectrum of **6** in CDCl_3 at 400 MHz.



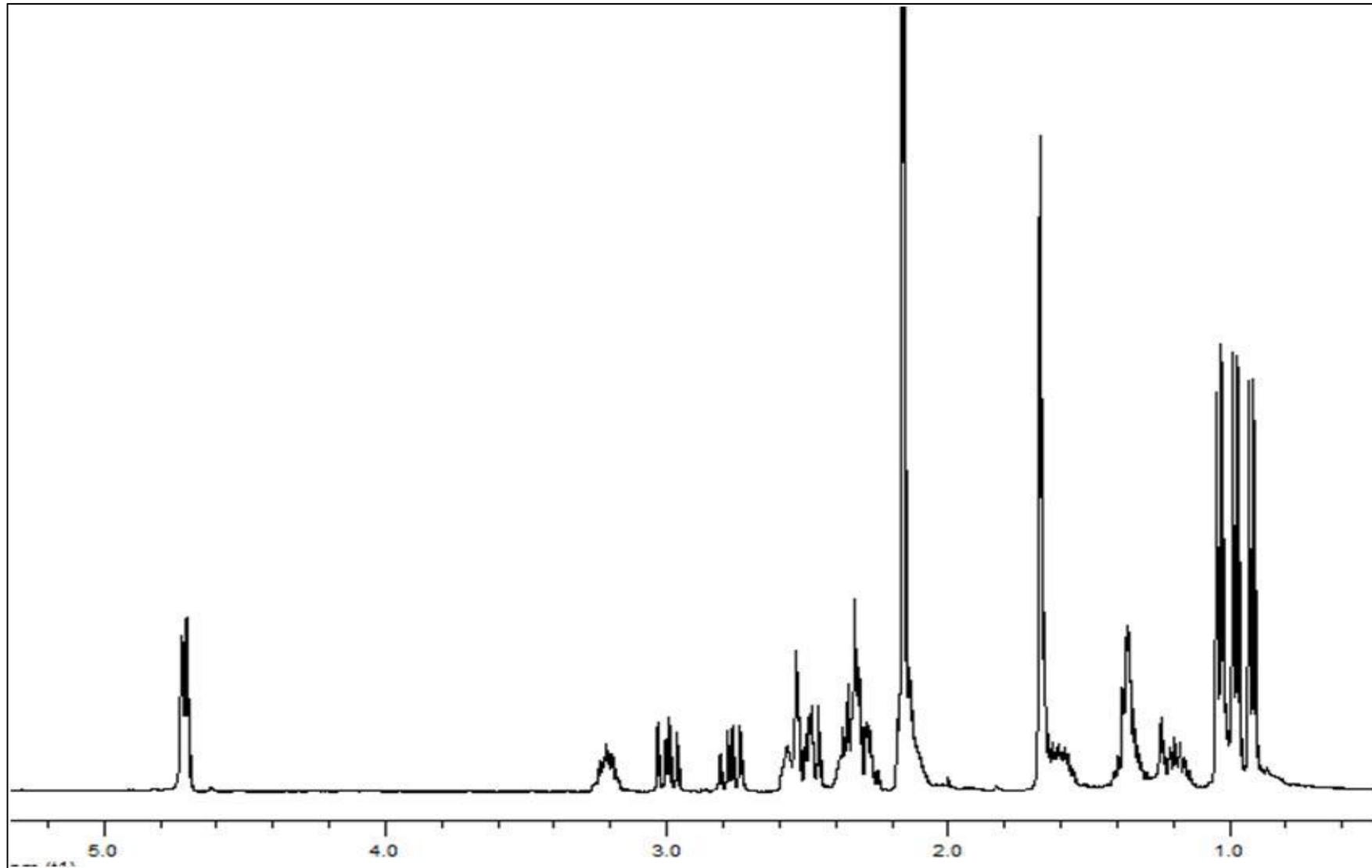
S14. ^{13}C NMR spectrum of **6** in CDCl_3 at 100 MHz.



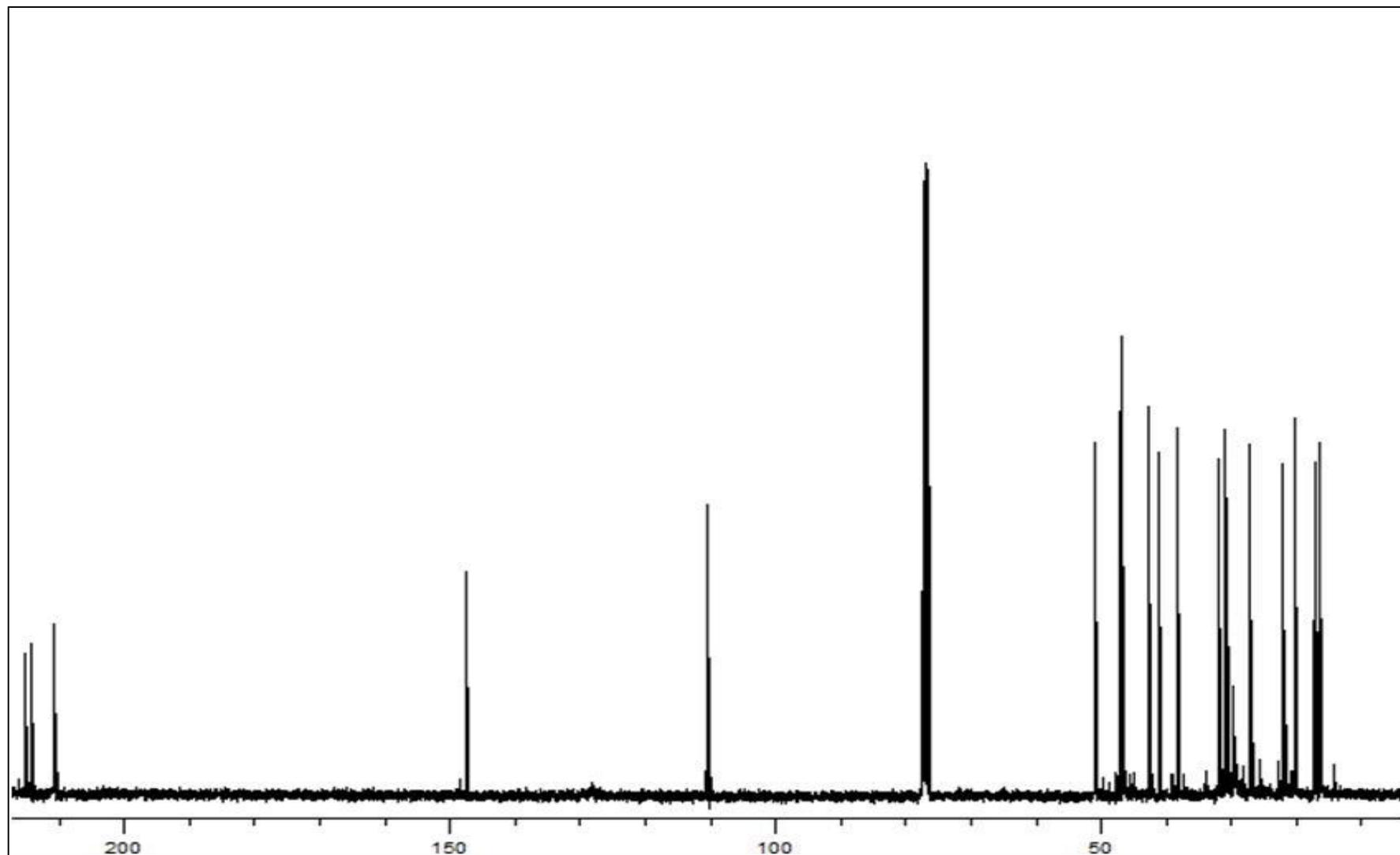
S15. ^1H NMR spectrum of **7** in CDCl_3 at 400 MHz.



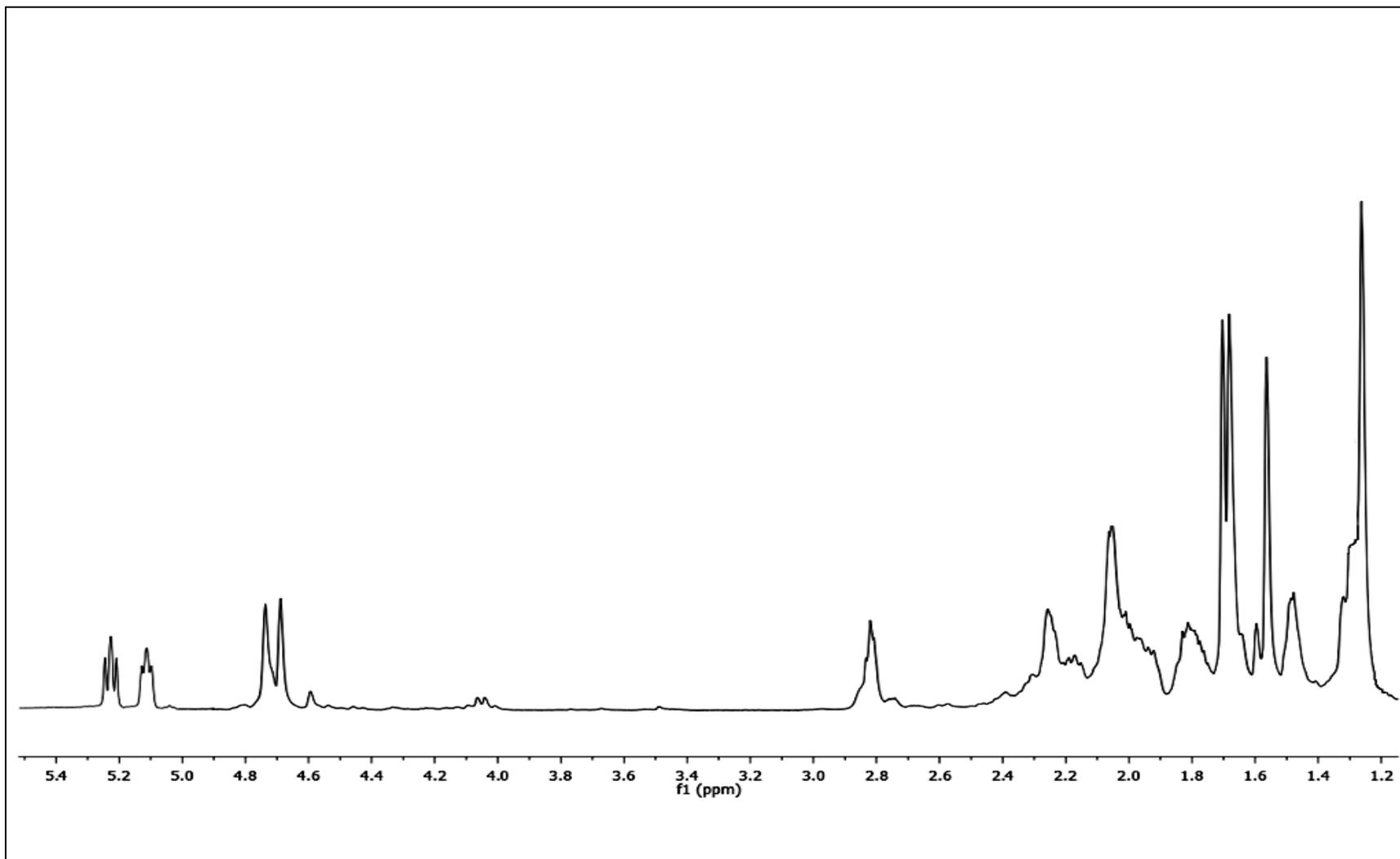
S16. ^{13}C NMR spectrum of **7** in CDCl_3 at 100 MHz.



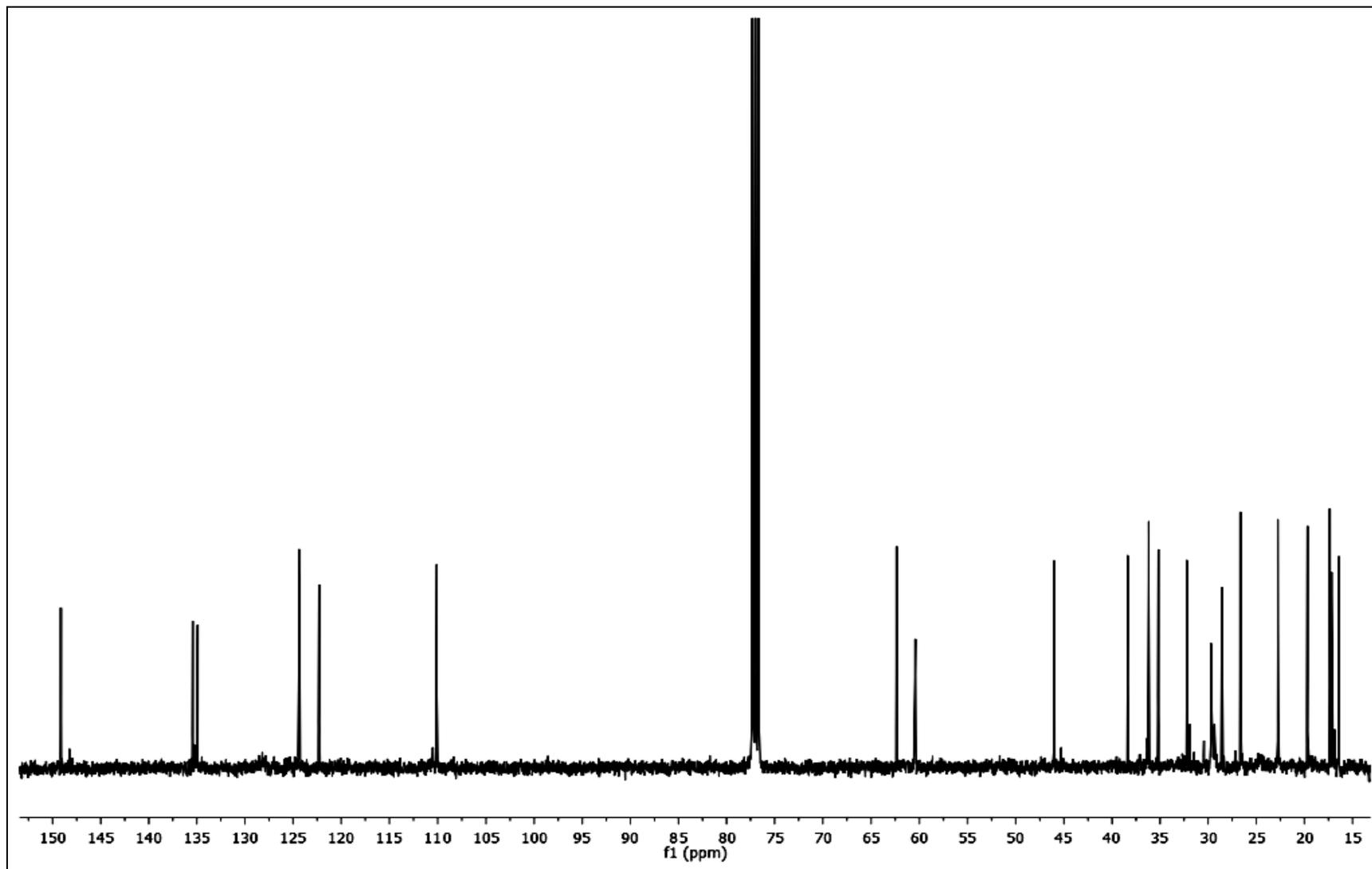
S17. ^1H NMR spectrum of **8** in CDCl_3 at 400 MHz.



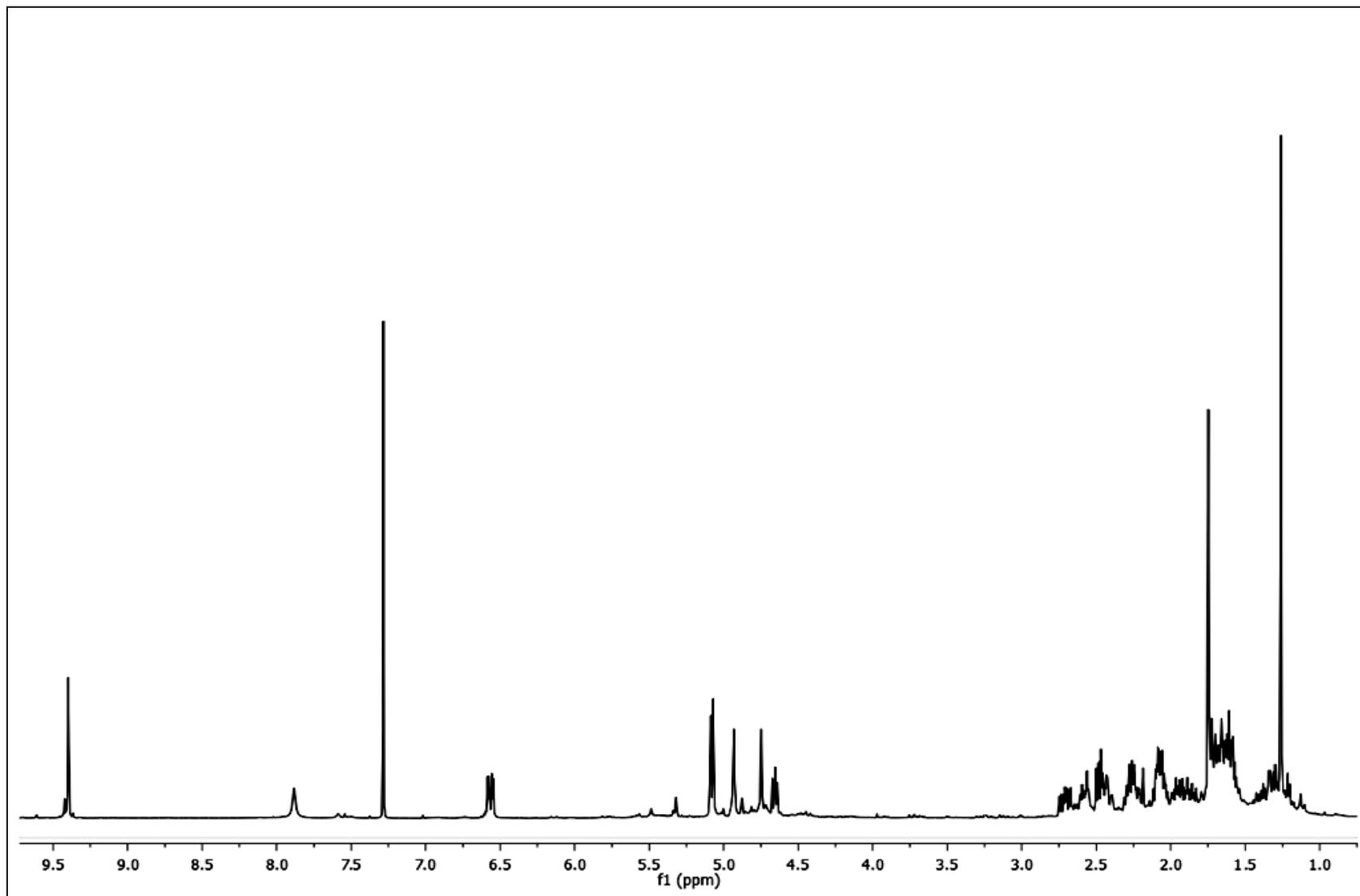
S18. ^{13}C NMR spectrum of **8** in CDCl_3 at 100 MHz.



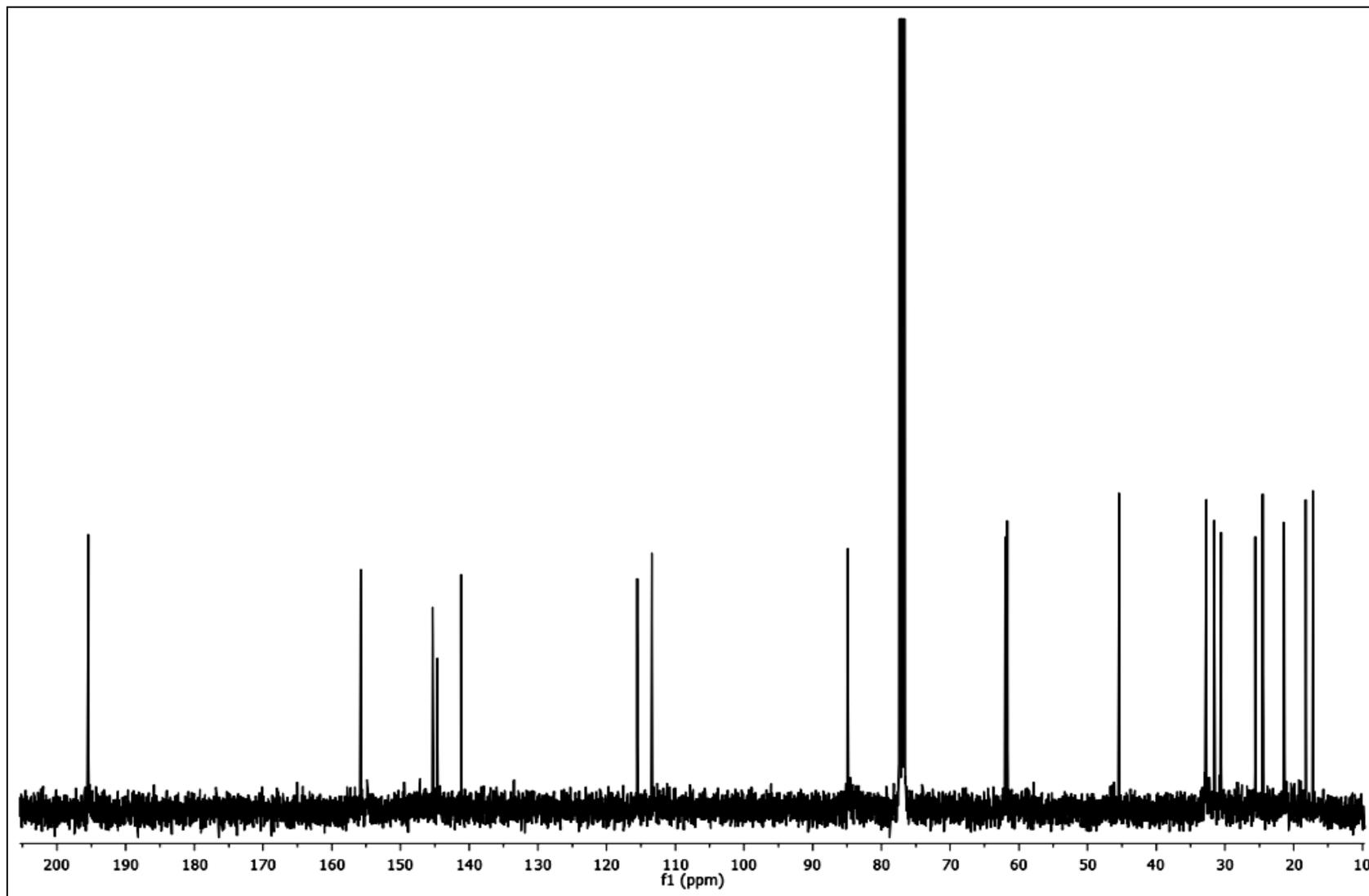
S19. Espectro de RMN ^1H de **9** en CDCl_3 a 400 MHz.



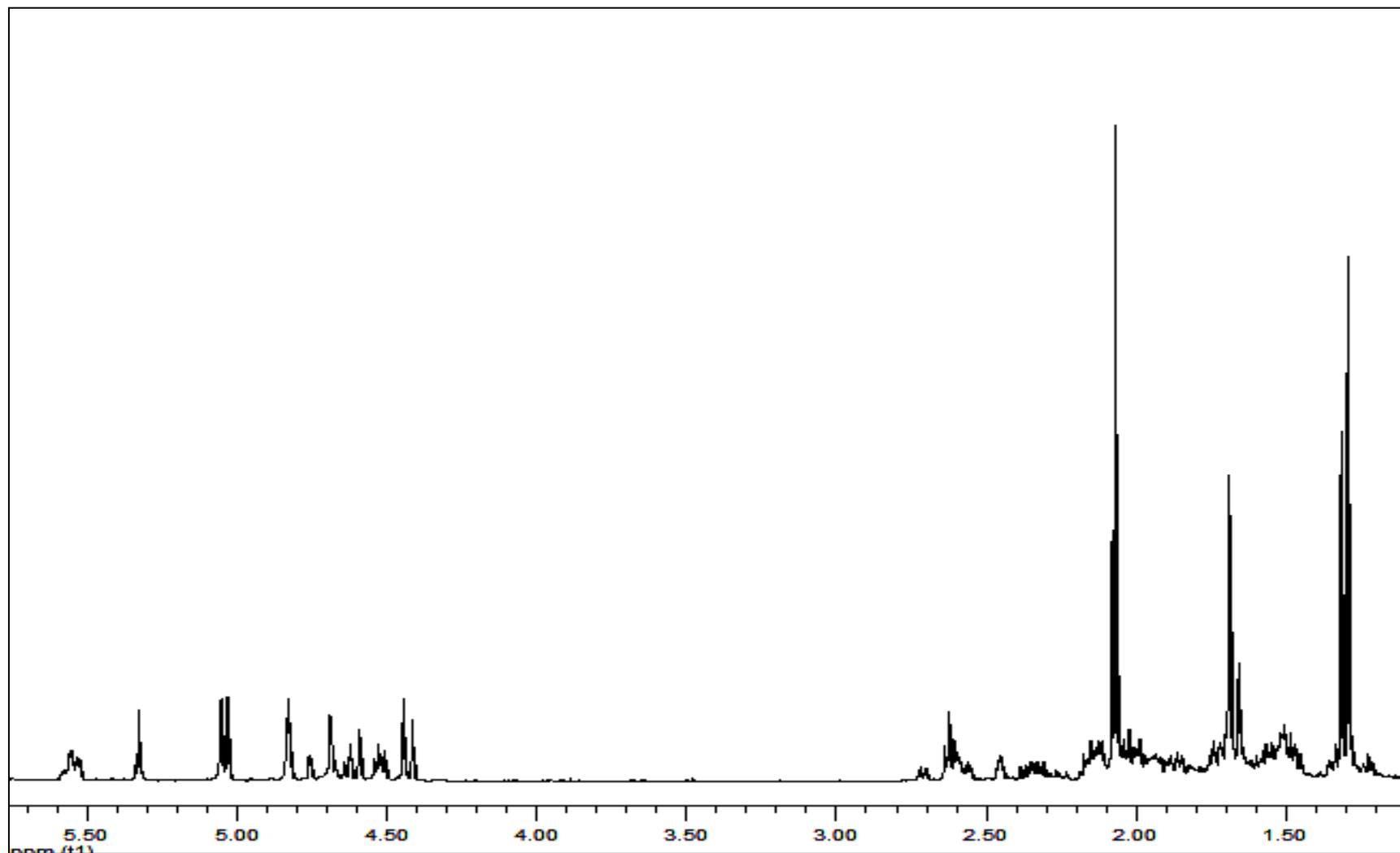
S20. Espectro de RMN ^{13}C de **9** en CDCl_3 a 100 MHz.



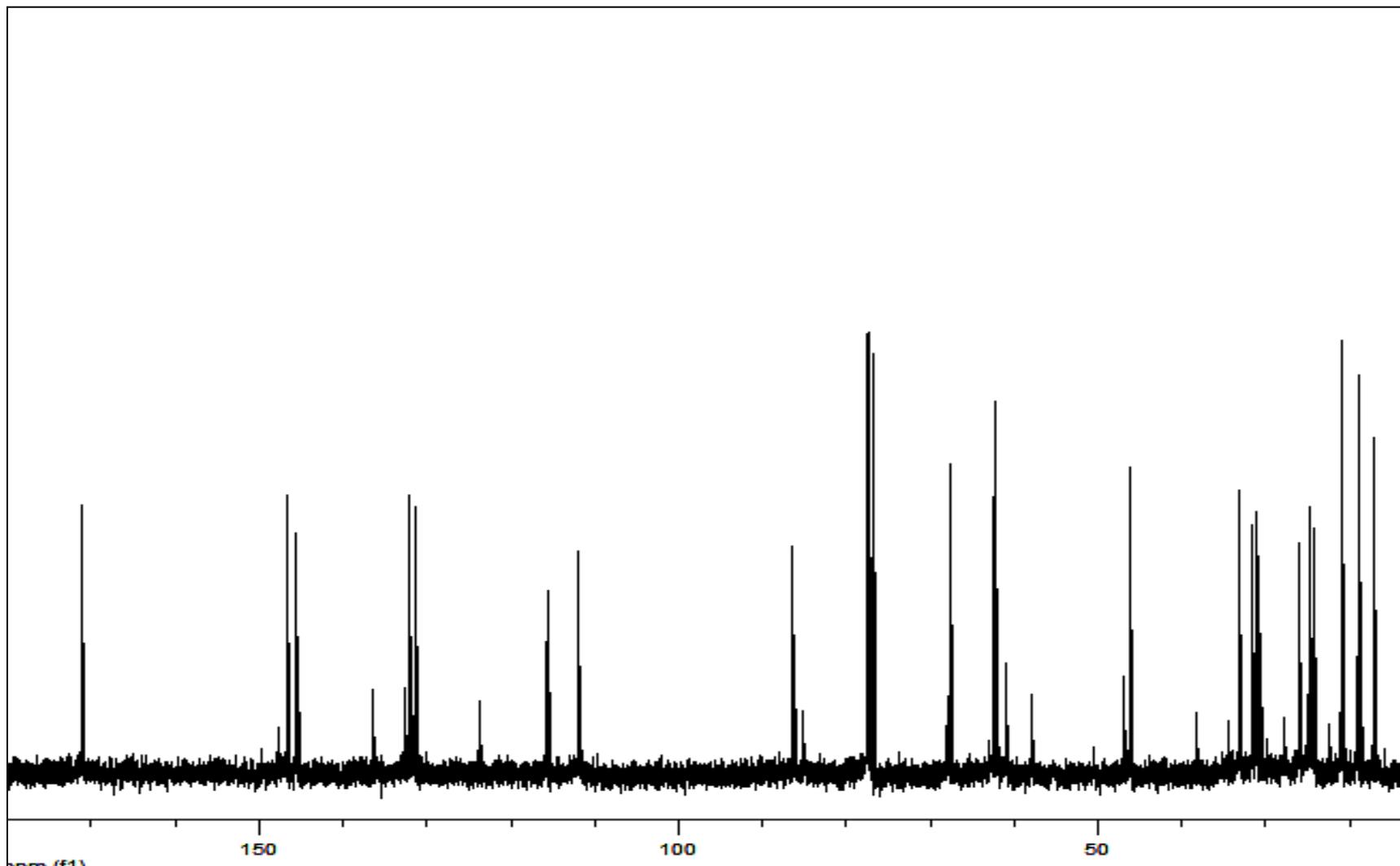
21. Espectro de RMN ^1H de **10** en CDCl_3 a 400 MHz.



S22. Espectro de RMN ^{13}C de **10** en CDCl_3 a 100 MHz.



S23. Espectro de RMN ^1H de **11** en CDCl_3 a 400 MHz.



S24. Espectro de RMN ^{13}C de **11** en CDCl_3 a 100 MHz

S25. Datos experimentales de los Compuestos 12-16

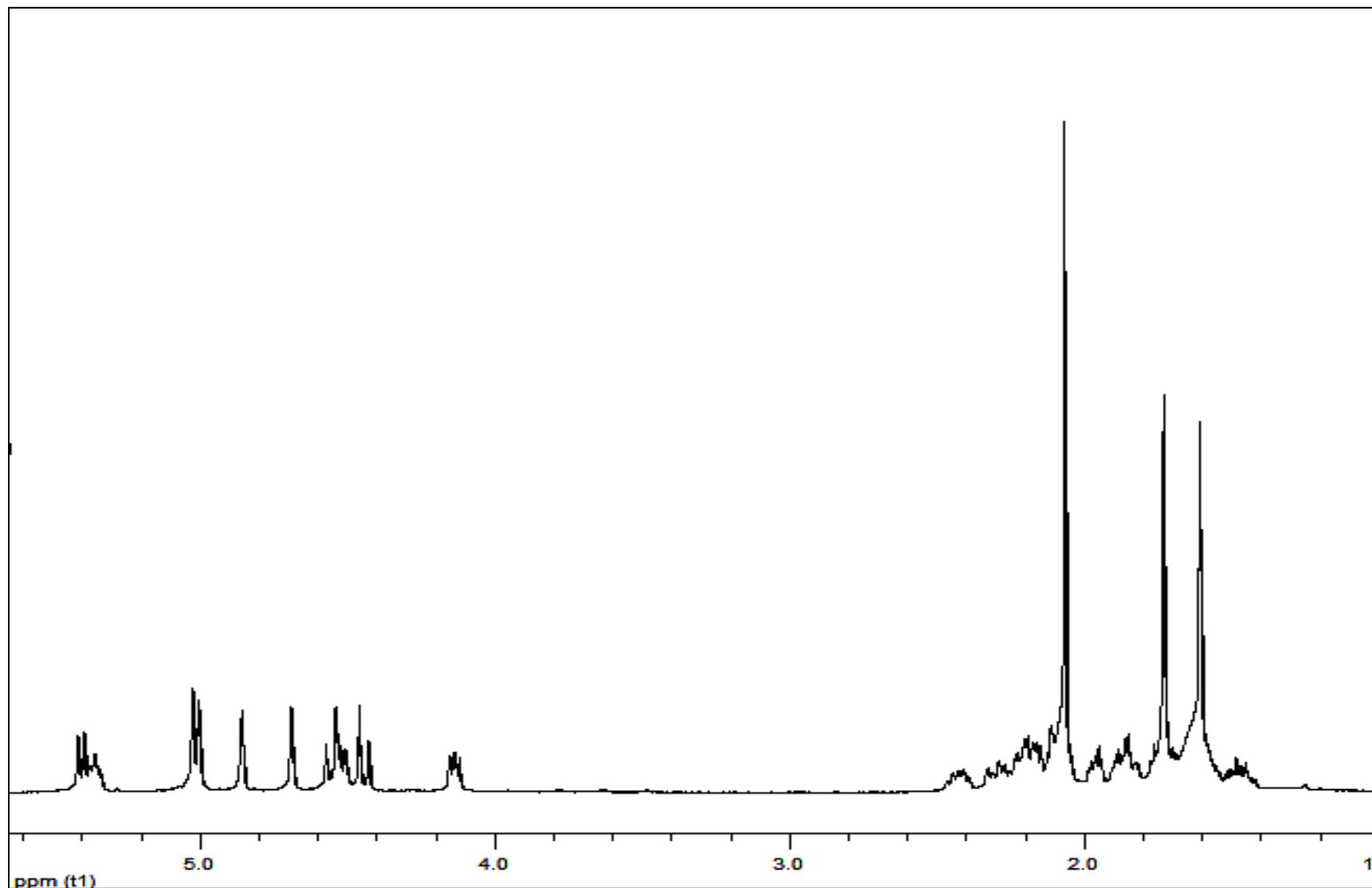
Knightol (12): Aceite incoloro; $[\alpha]_D^{25}$ -30.0 (c 0.27, CHCl₃); Los datos de IR, RMN, y EM son consistentes con los valores de la literatura.

Acetato de Knightol (13): Aceite incoloro; $[\alpha]_D^{25}$ -63.3 (c 0.25, CHCl₃); Los datos de IR, RMN, y EM son consistentes con los valores de la literatura.

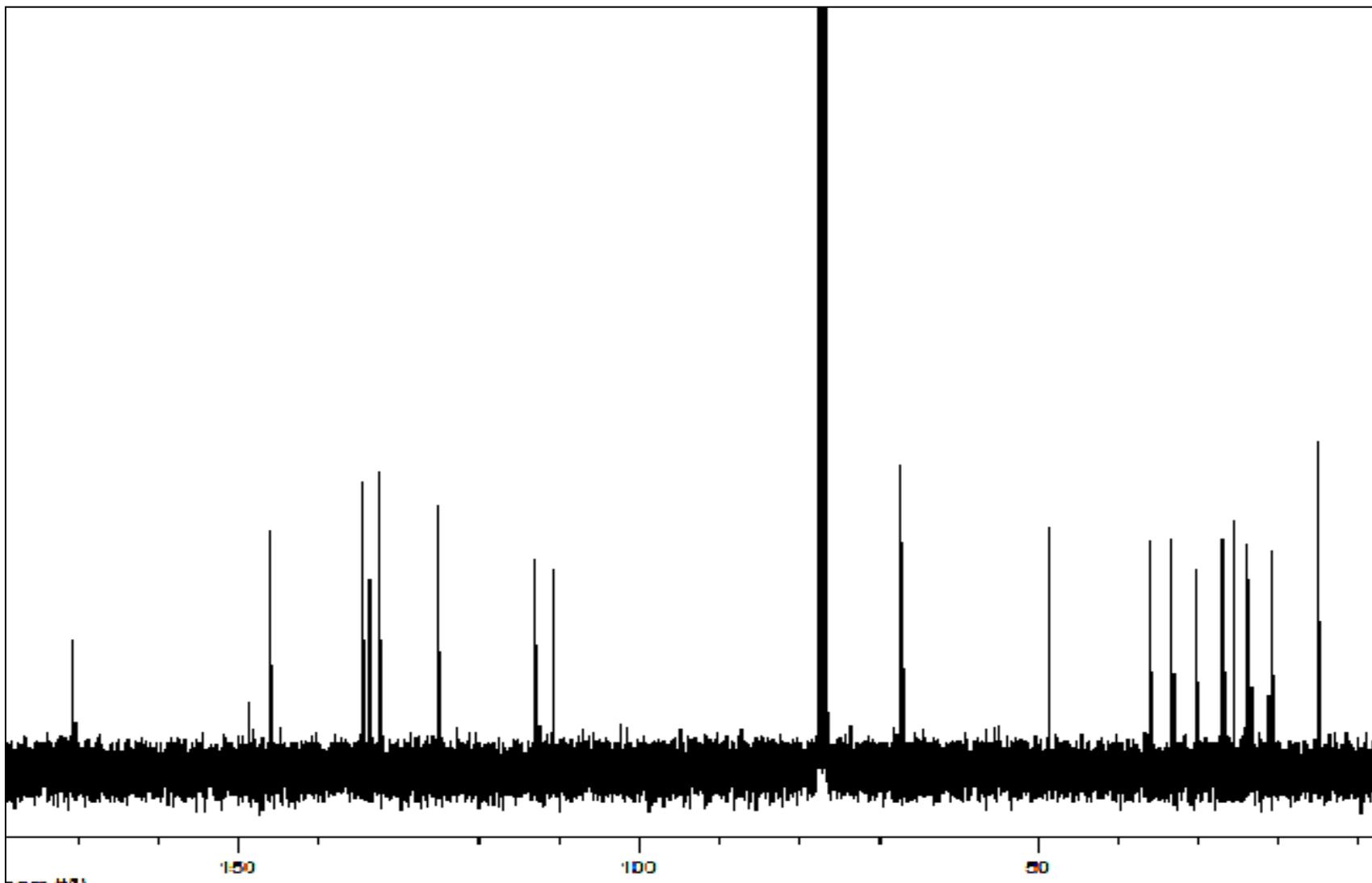
Knightal (14): Aceite incoloro; $[\alpha]_D^{25}$ +8.0 (c 0.25, CHCl₃); Los datos de IR, RMN, y EM son consistentes con los valores de la literatura

Asperdiol (15): Agujas blancas; $[\alpha]_D^{25}$ -98.0 (c 0.27, CHCl₃); Los datos de IR, RMN, y EM son consistentes con los valores de la literatura

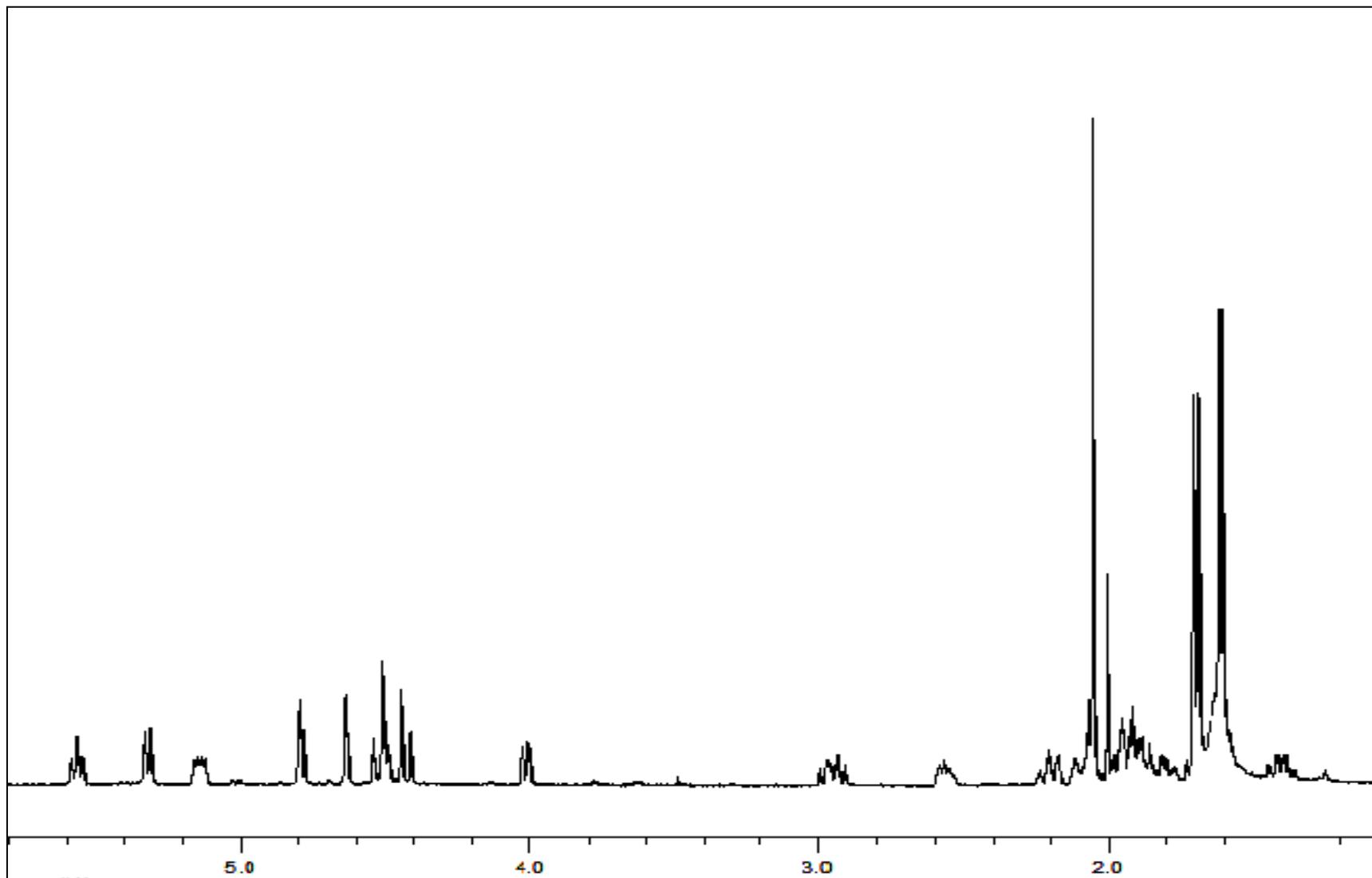
Acetato de Asperdiol (16): Aceite incoloro; $[\alpha]_D^{25}$ -60.0 (c 0.27, CHCl₃); Los datos de IR, RMN, y EM son consistentes con los valores de la literatura.



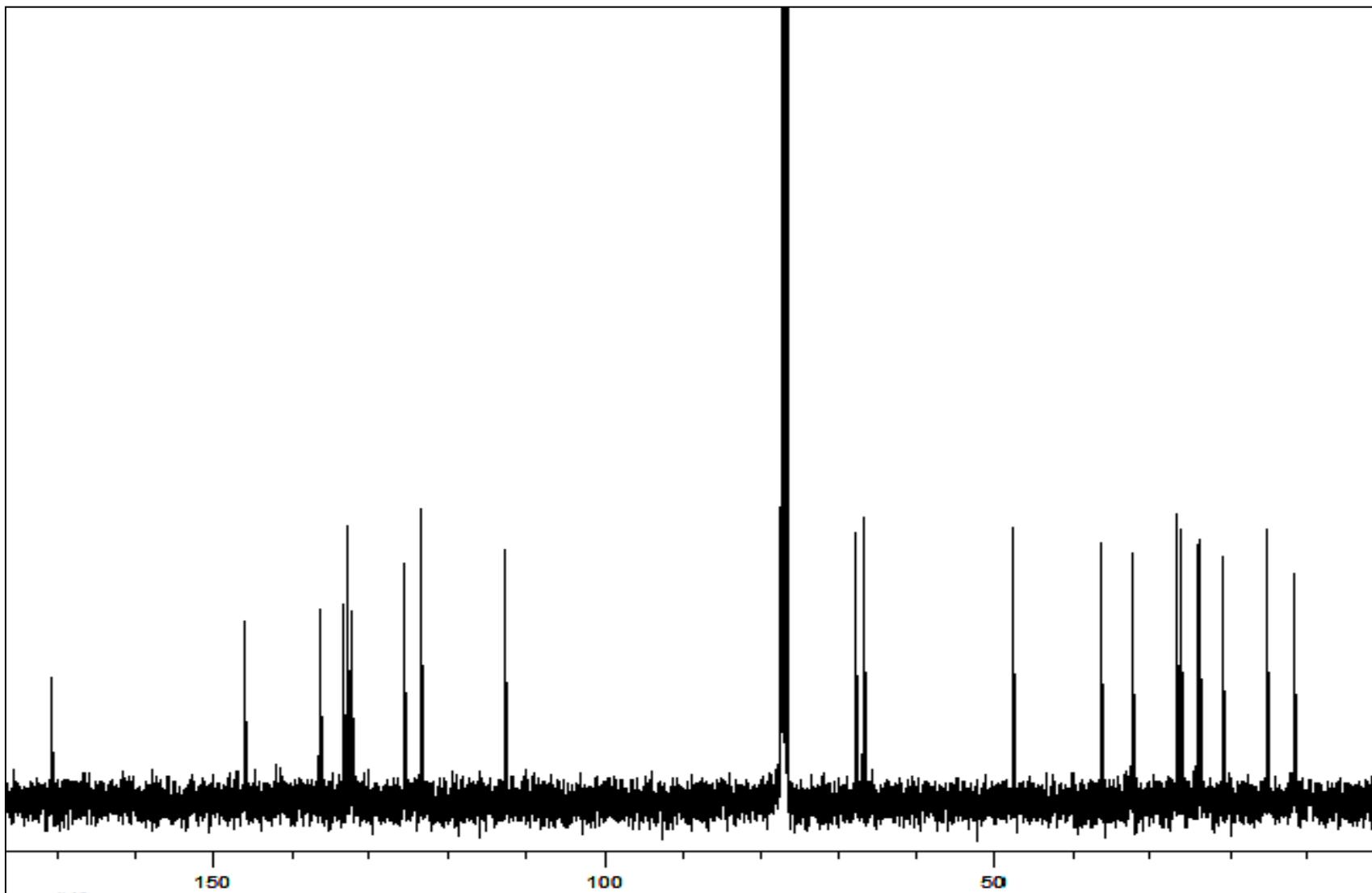
S26. Espectro de RMN ^1H de **17** en CDCl_3 a 400 MHz.



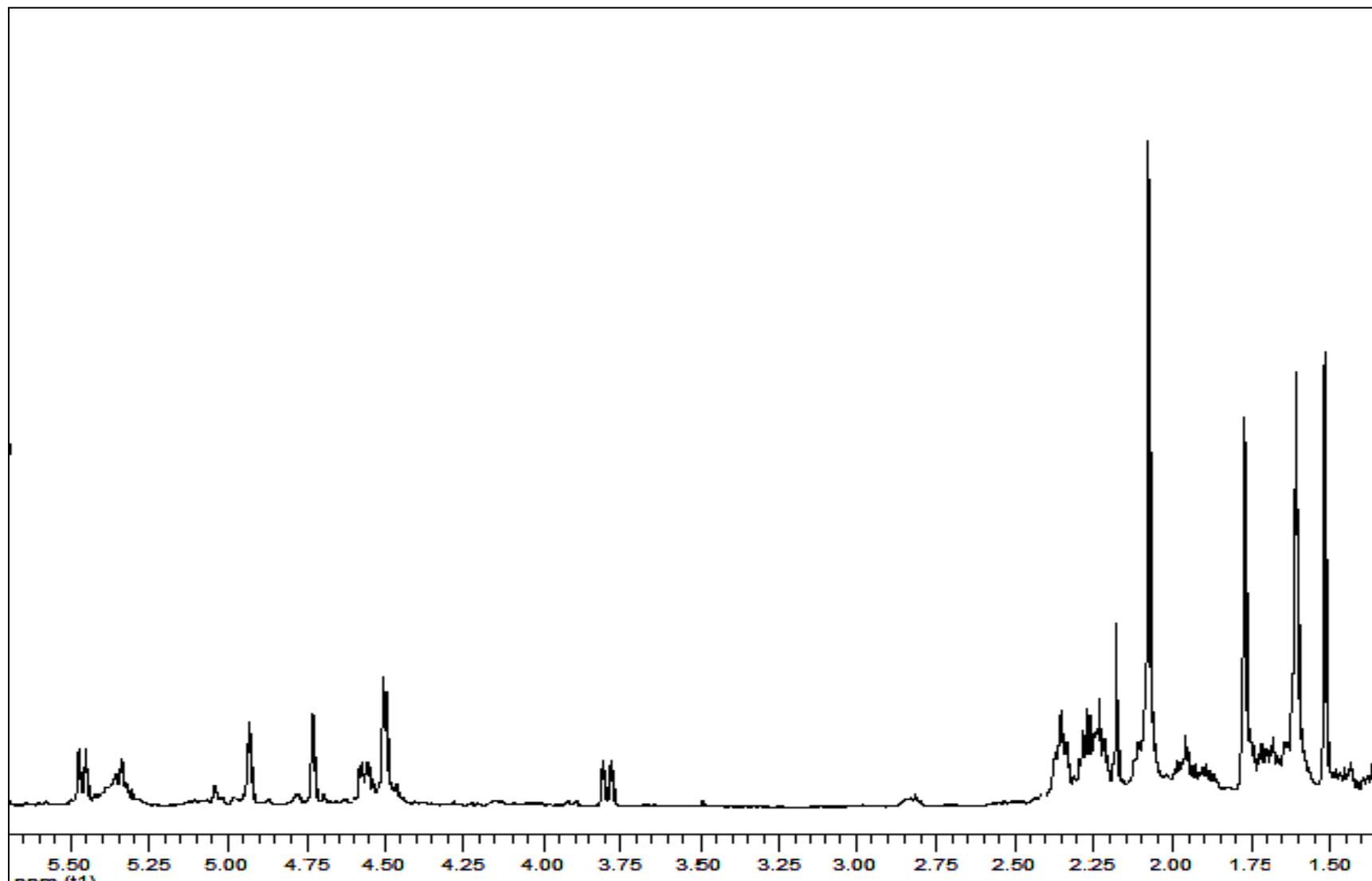
S27. Espectro de RMN ^{13}C de **17** en CDCl_3 a 100 MHz.



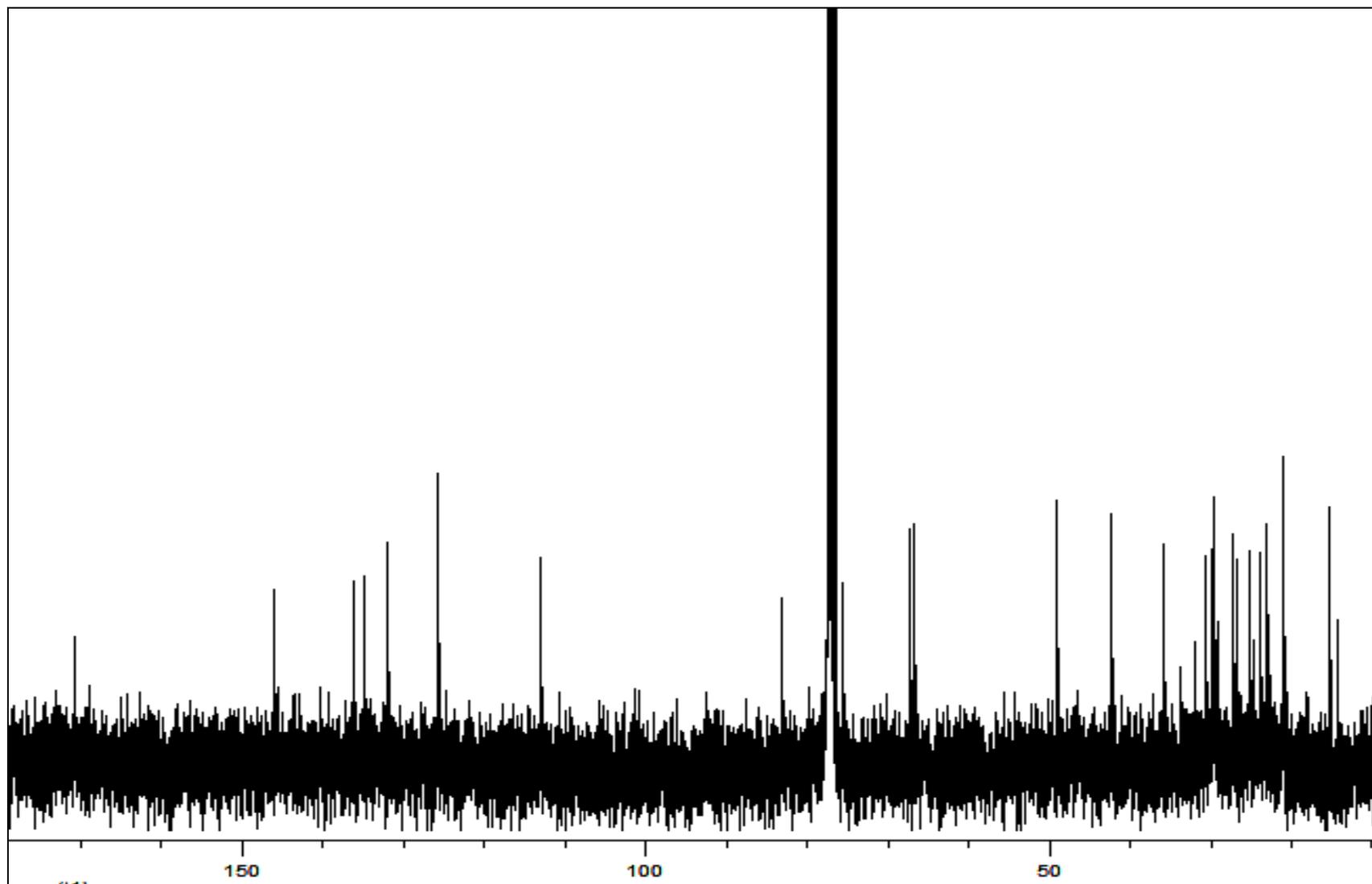
S28. Espectro de RMN ^1H de **18** en CDCl_3 a 400 MHz.



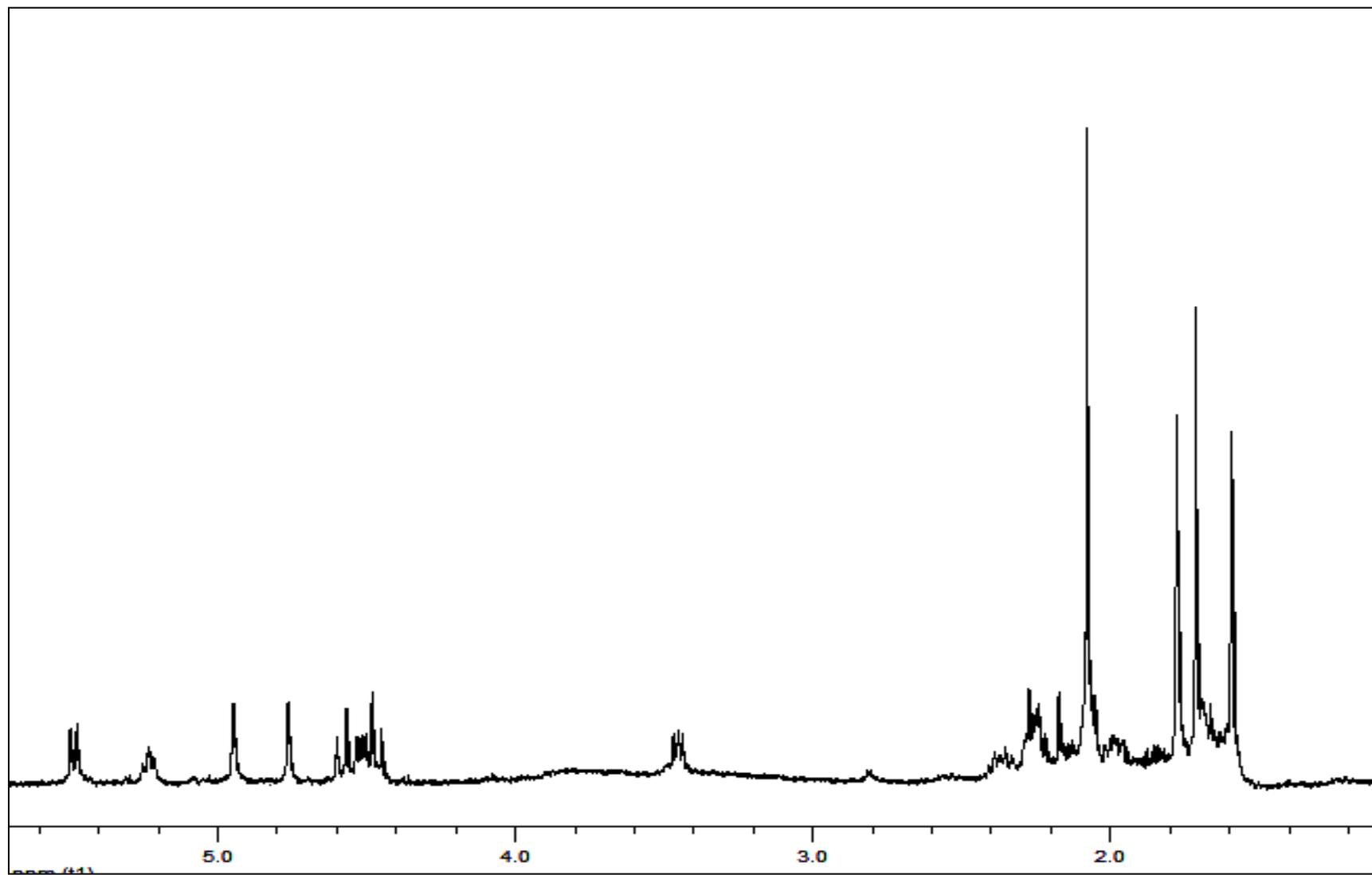
S29. Espectro de RMN ^{13}C de **18** en CDCl_3 a 100 MHz.



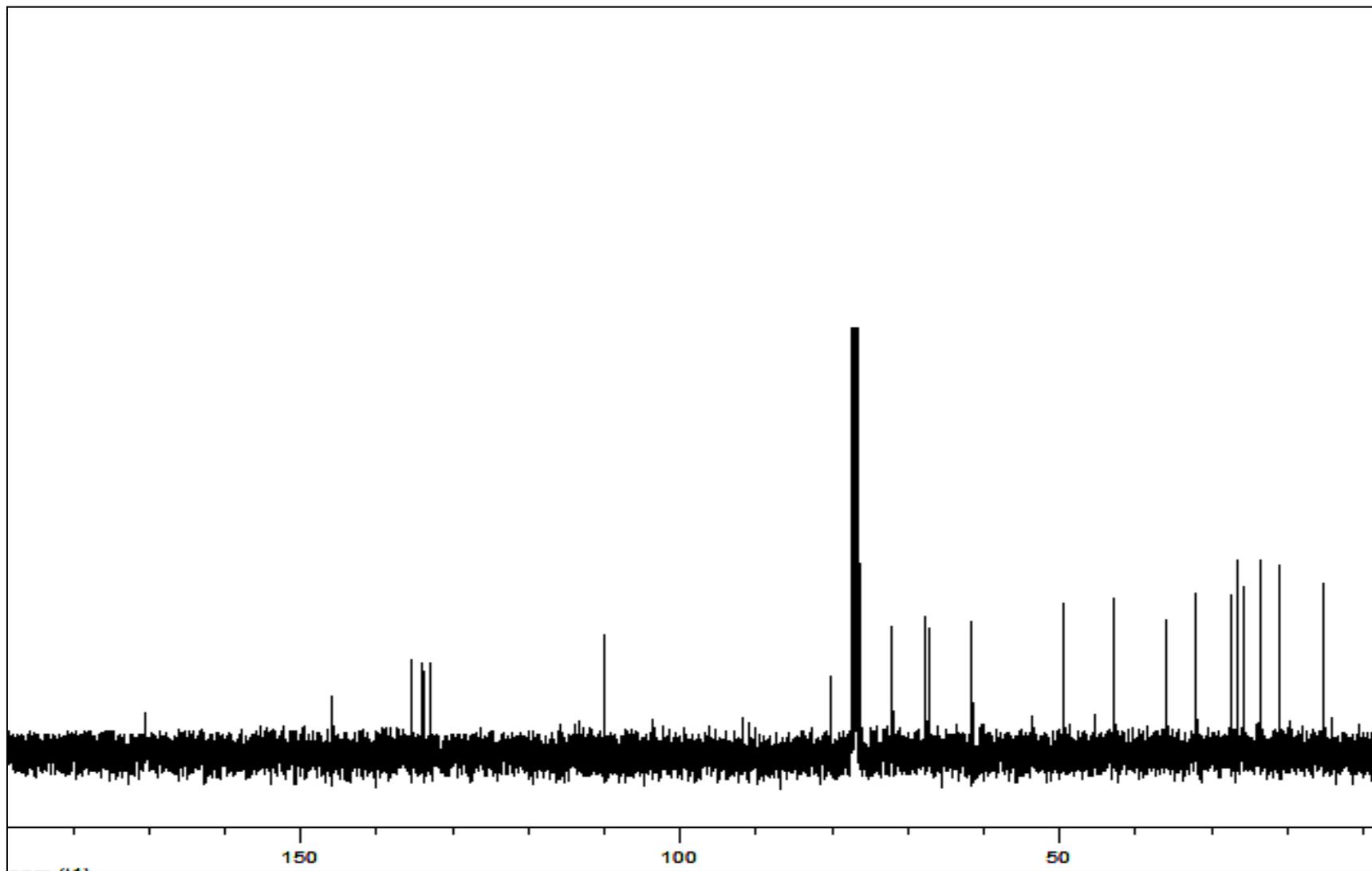
S30. Espectro de RMN ^1H de **20** en CDCl_3 a 400 MHz.



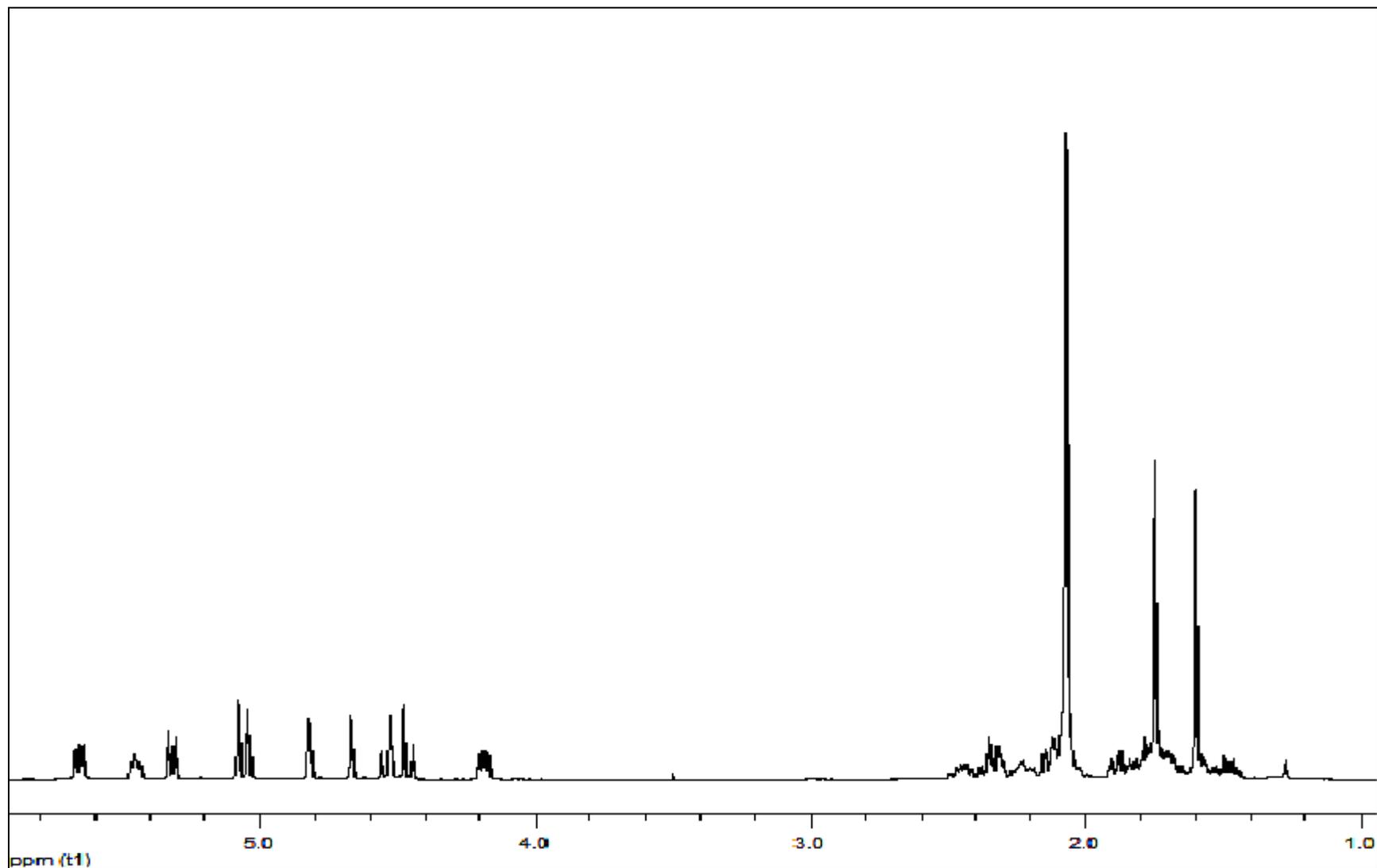
S31. Espectro de RMN ^{13}C de **20** en CDCl_3 a 100 MHz.



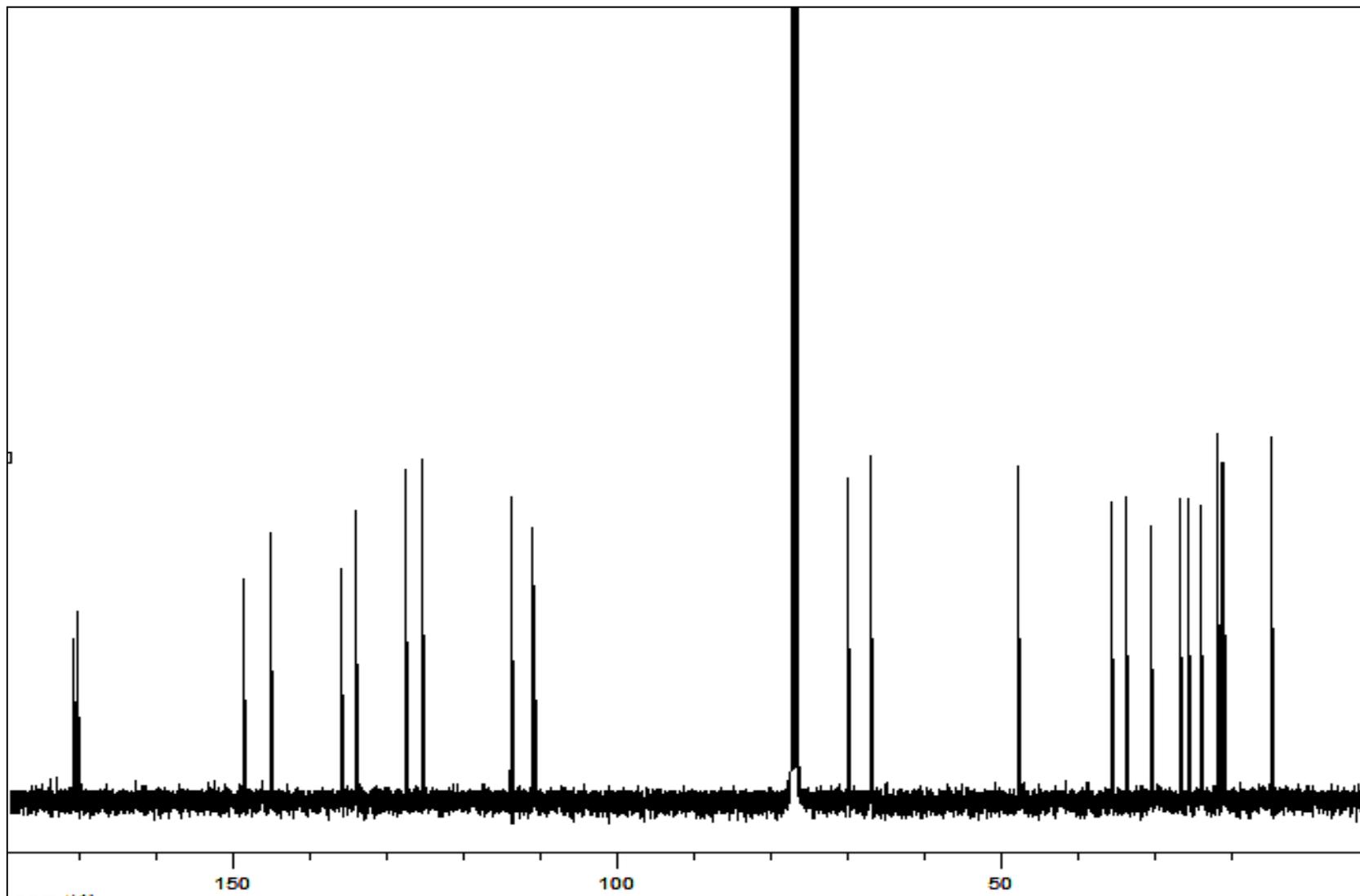
S32. Espectro de RMN ^1H de **21** en CDCl_3 a 400 MHz.



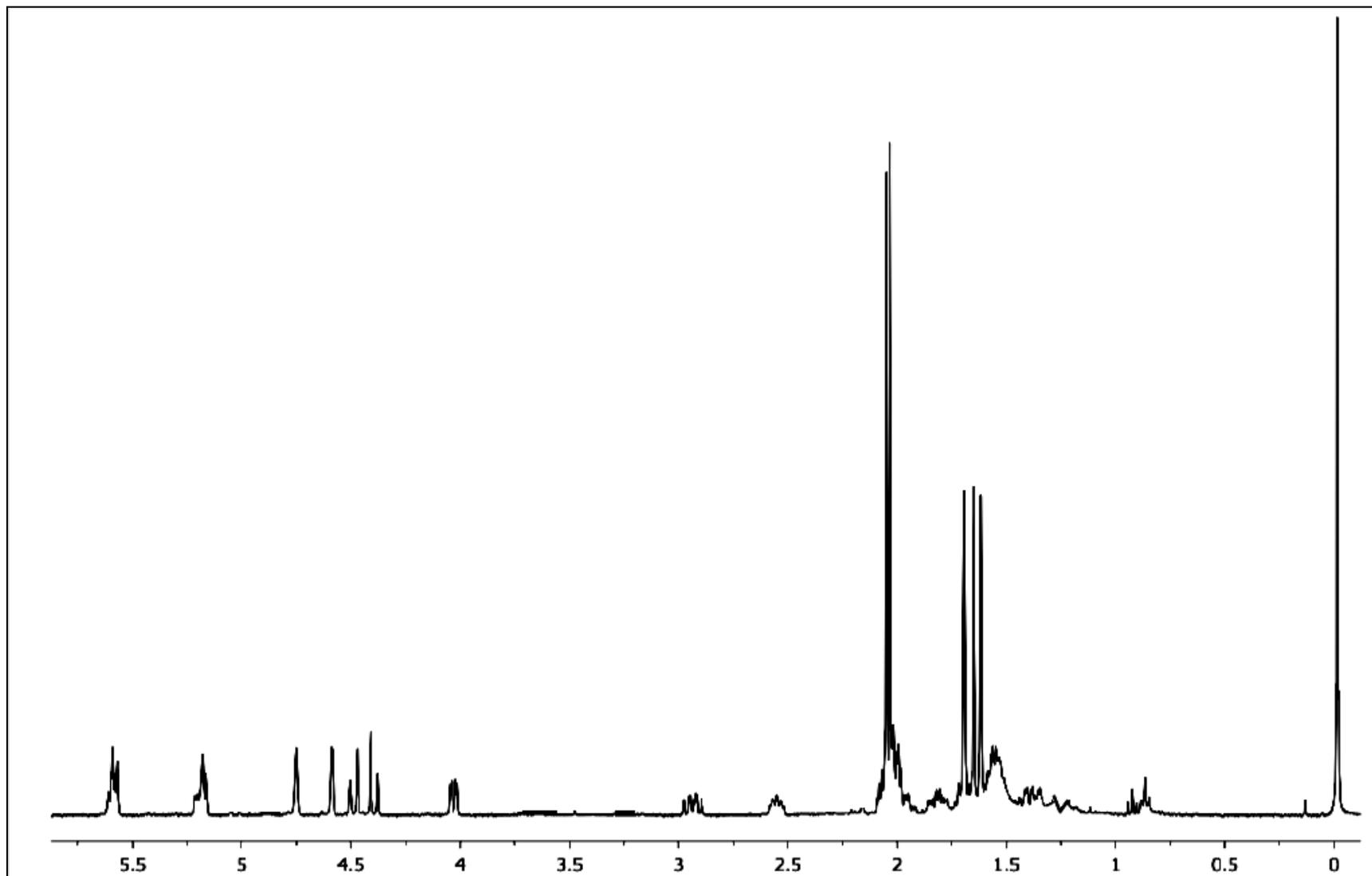
S33. Espectro de RMN ^{13}C de **21** en CDCl_3 a 100 MHz.



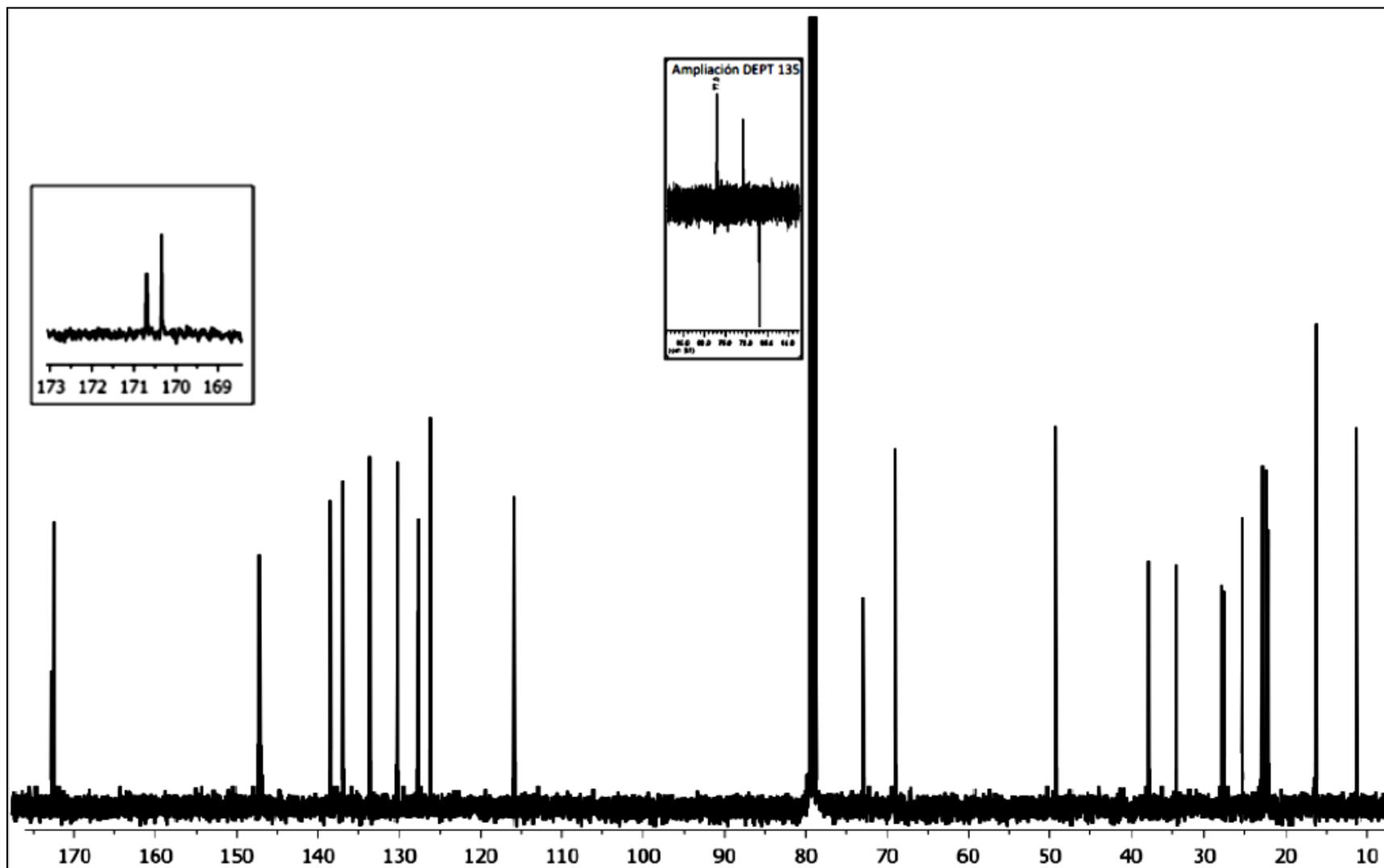
S34. Espectro de RMN ^1H de **27** en CDCl_3 a 400 MHz.



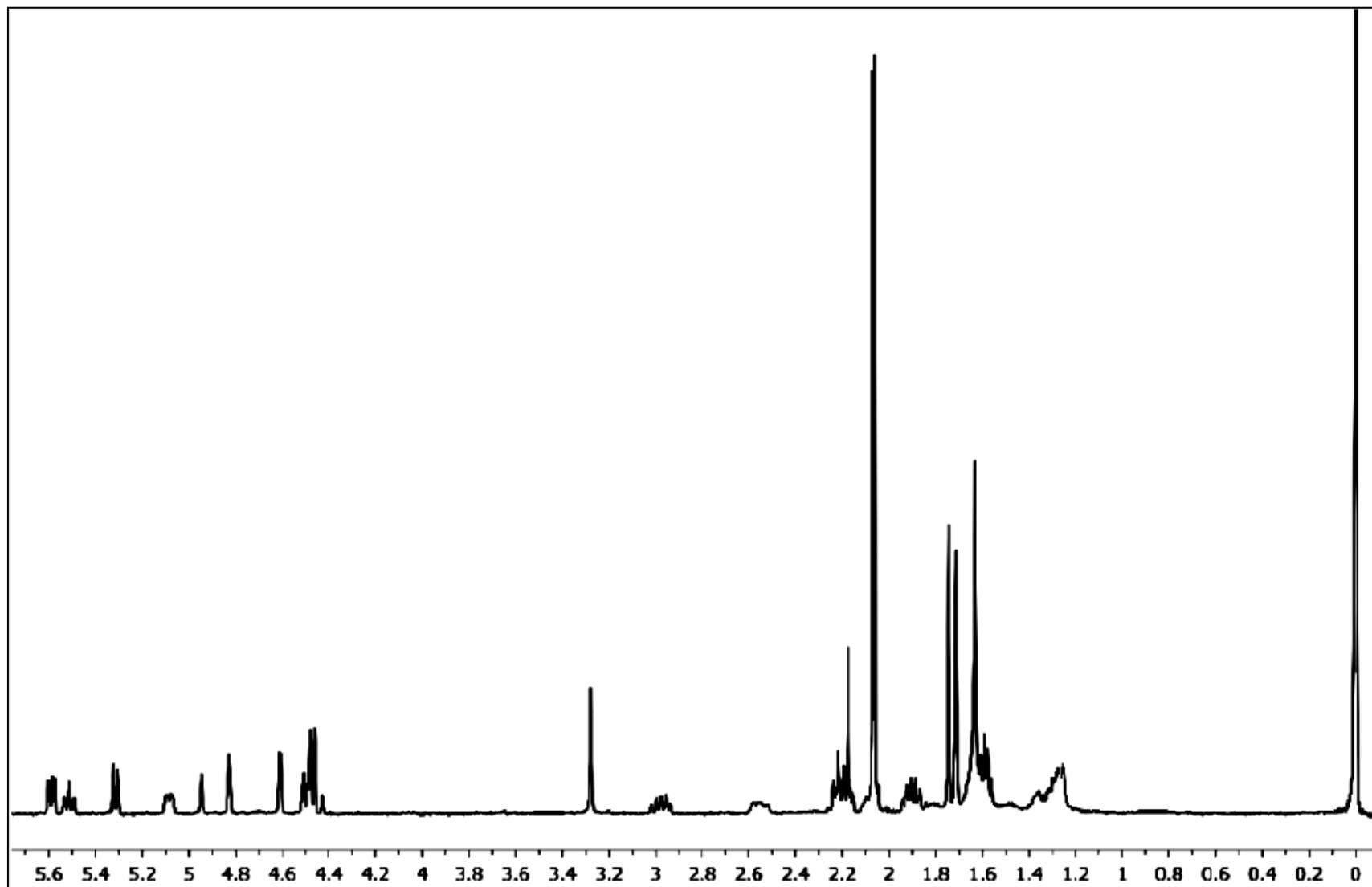
S35. Espectro de RMN ^{13}C de **27** en CDCl_3 a 100 MHz.



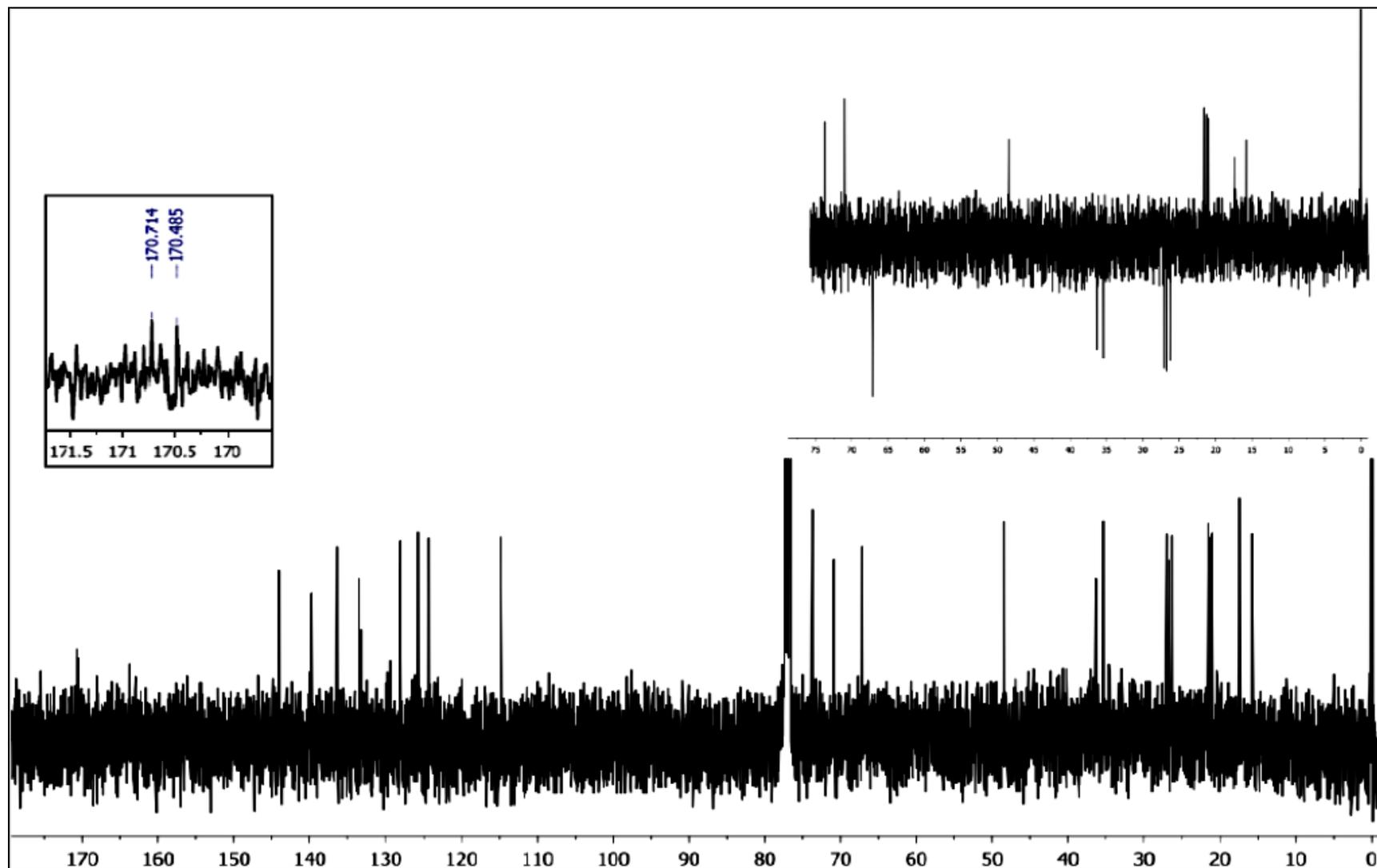
S36. Espectro de RMN ^1H de **28** en CDCl_3 a 400 MHz.



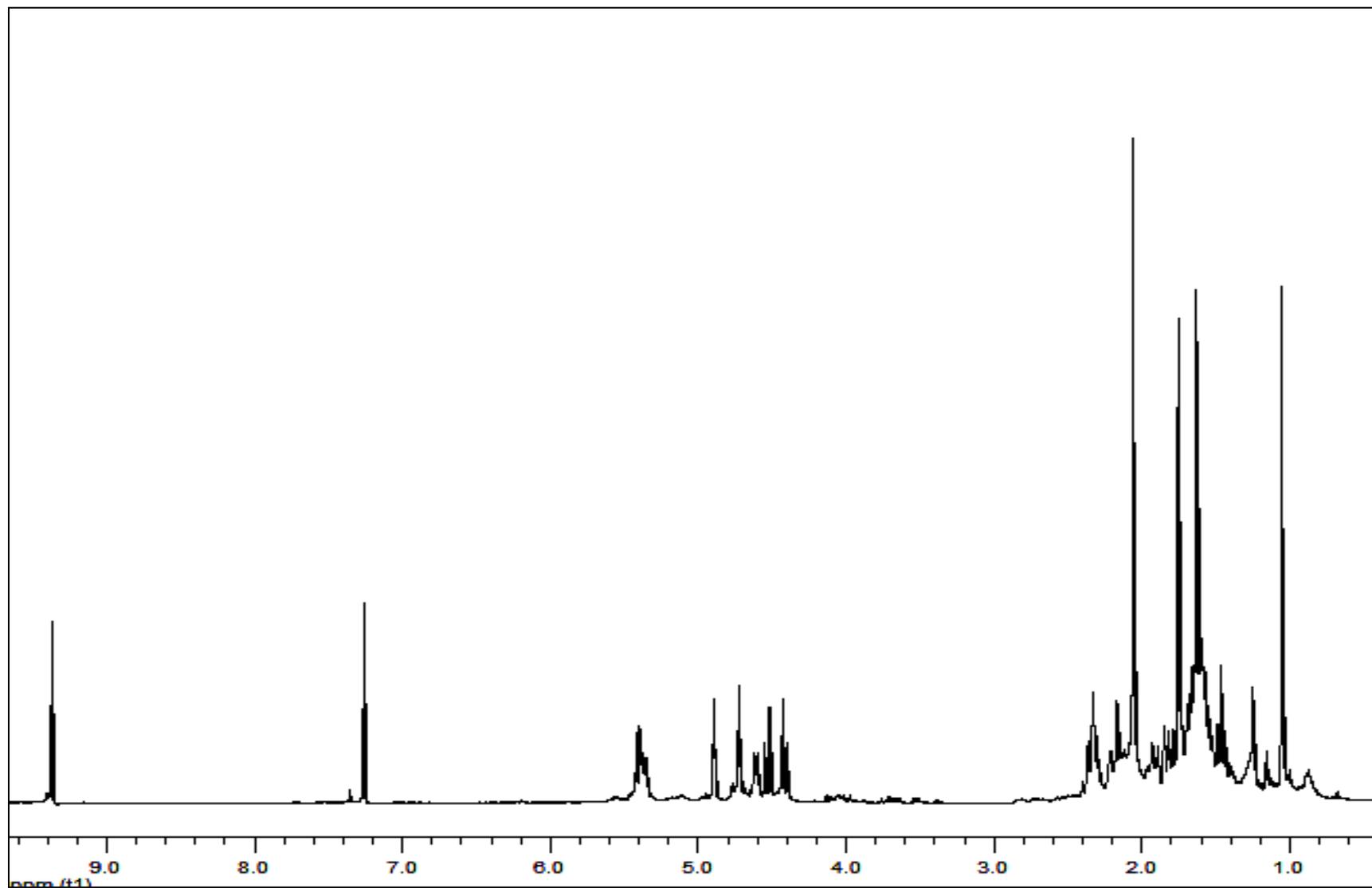
S37. Espectro de RMN ^{13}C de **28** en CDCl_3 a 100 MHz.



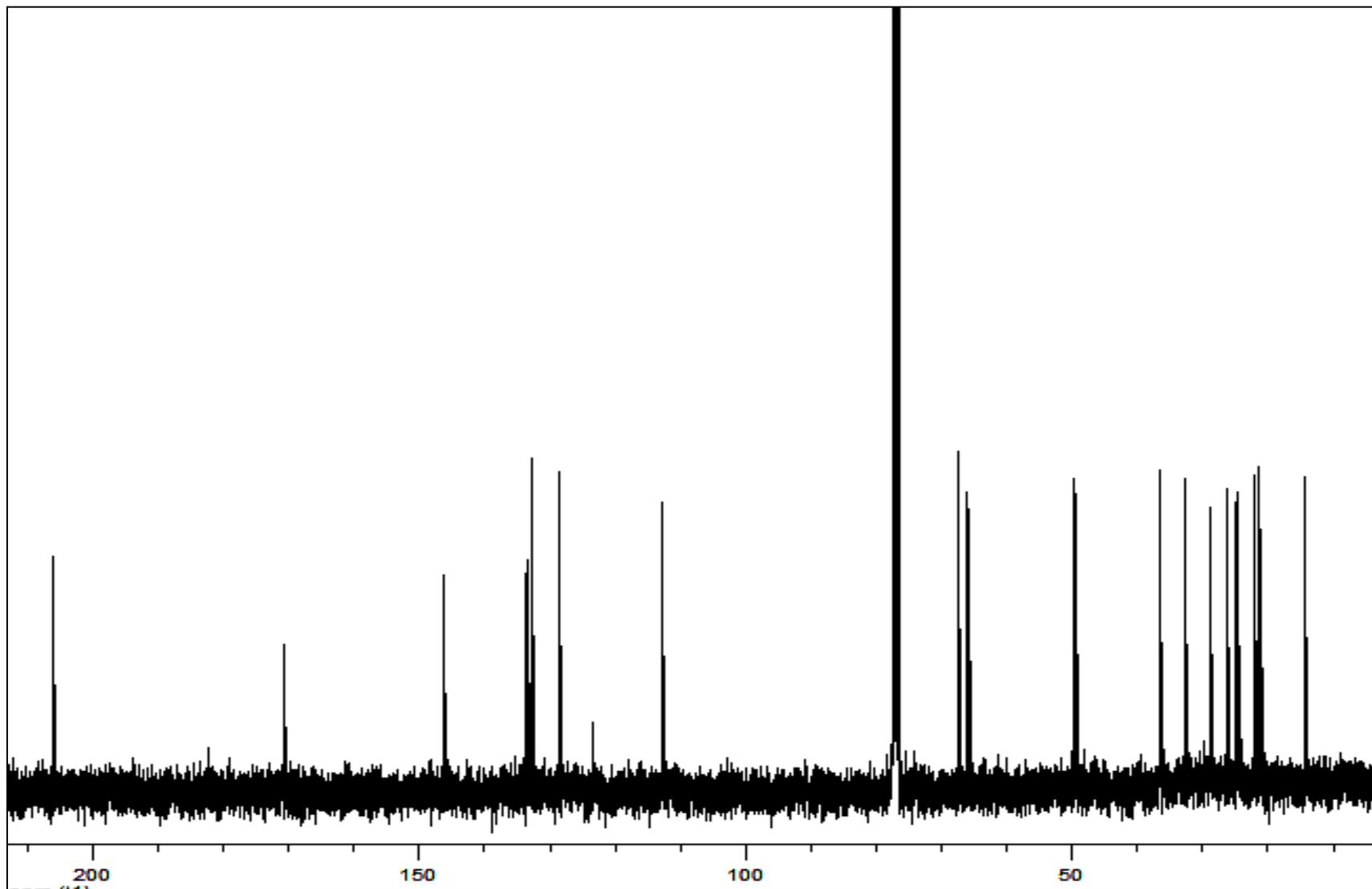
S38. Espectro de RMN ^1H de **29** en CDCl_3 a 400 MHz.



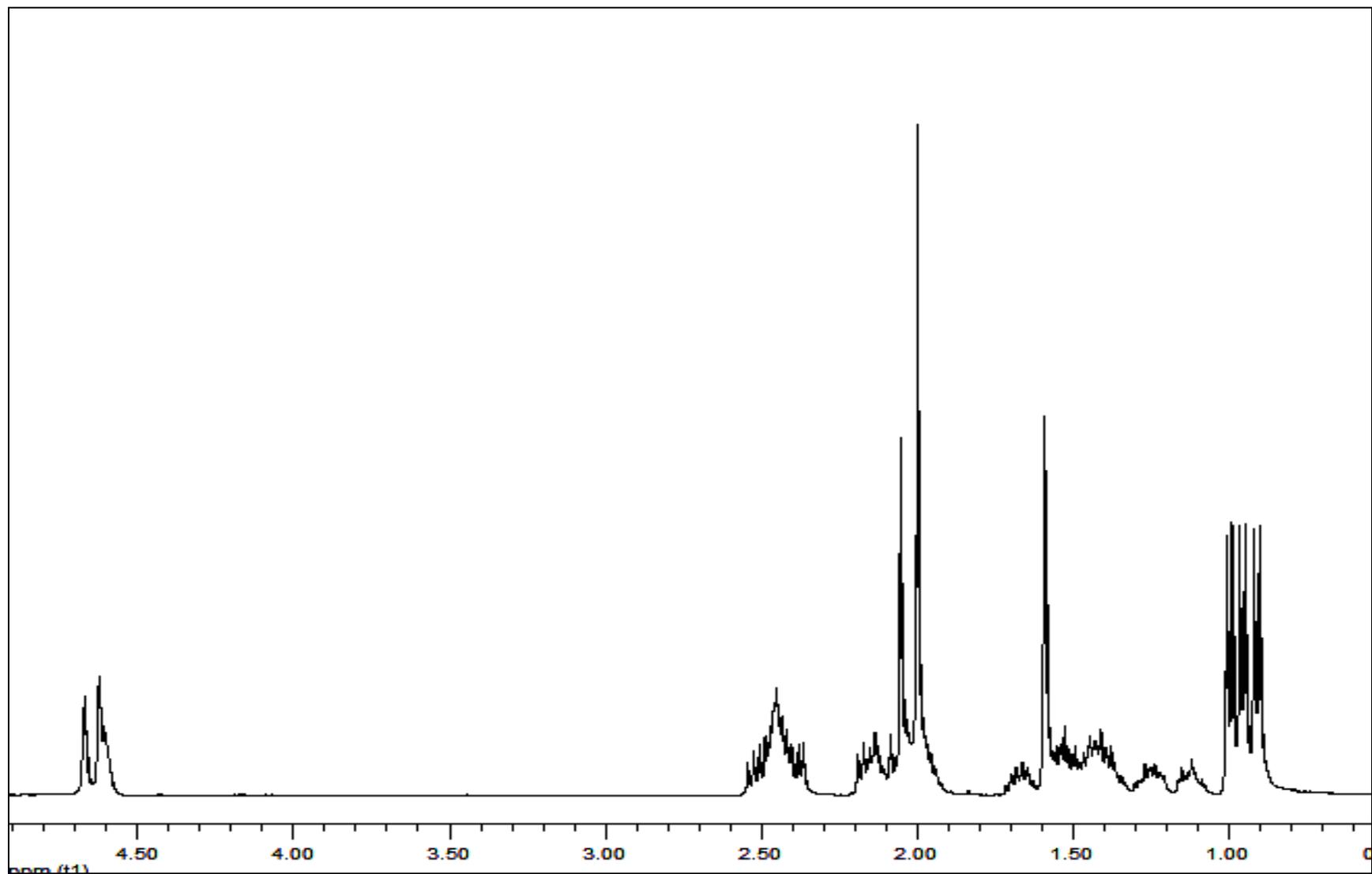
S39. Espectro de RMN ^{13}C de **29** en CDCl_3 a 100 MHz.



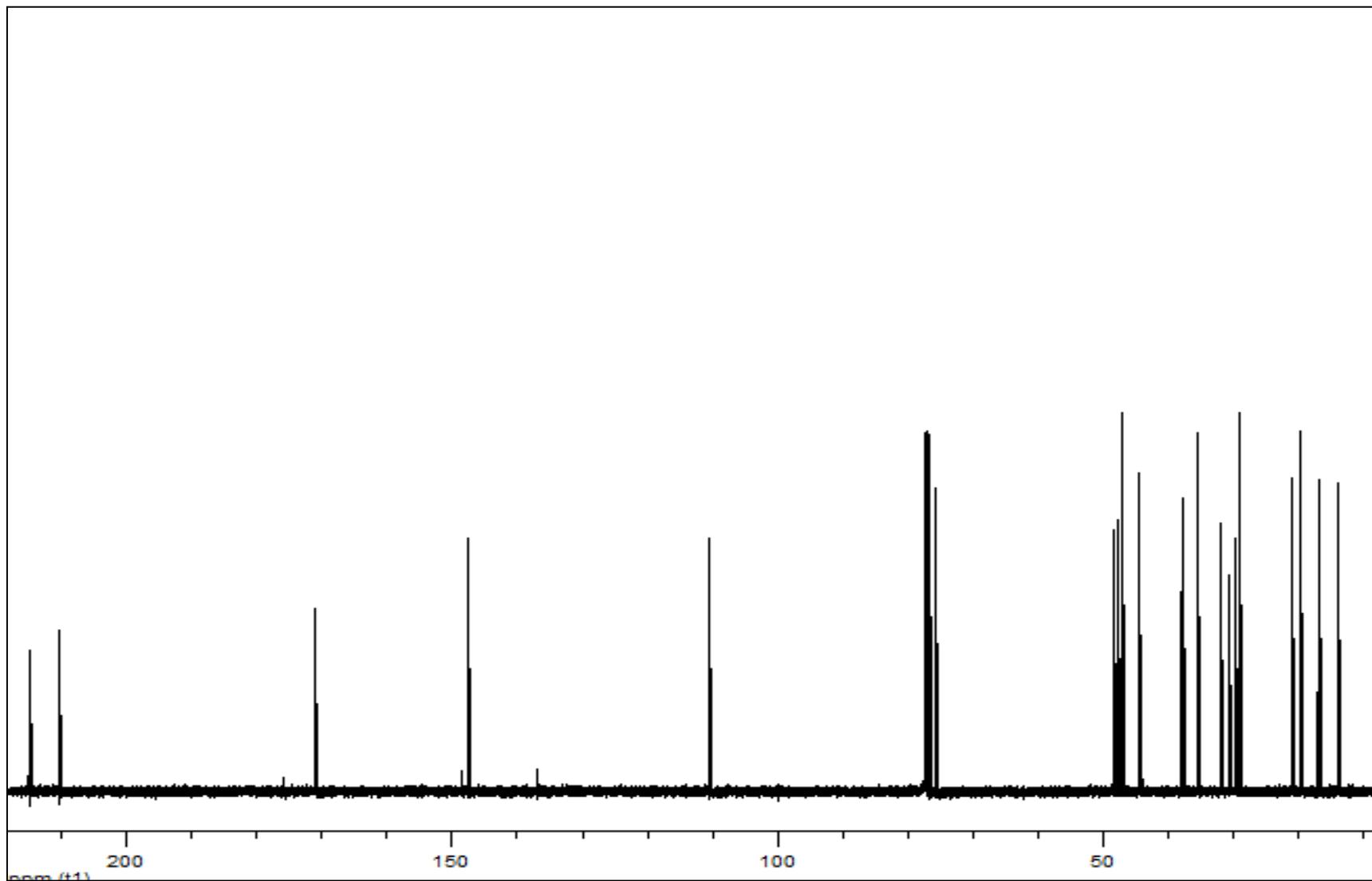
S40. Espectro de RMN ^1H de **35** en CDCl_3 a 400 MHz.



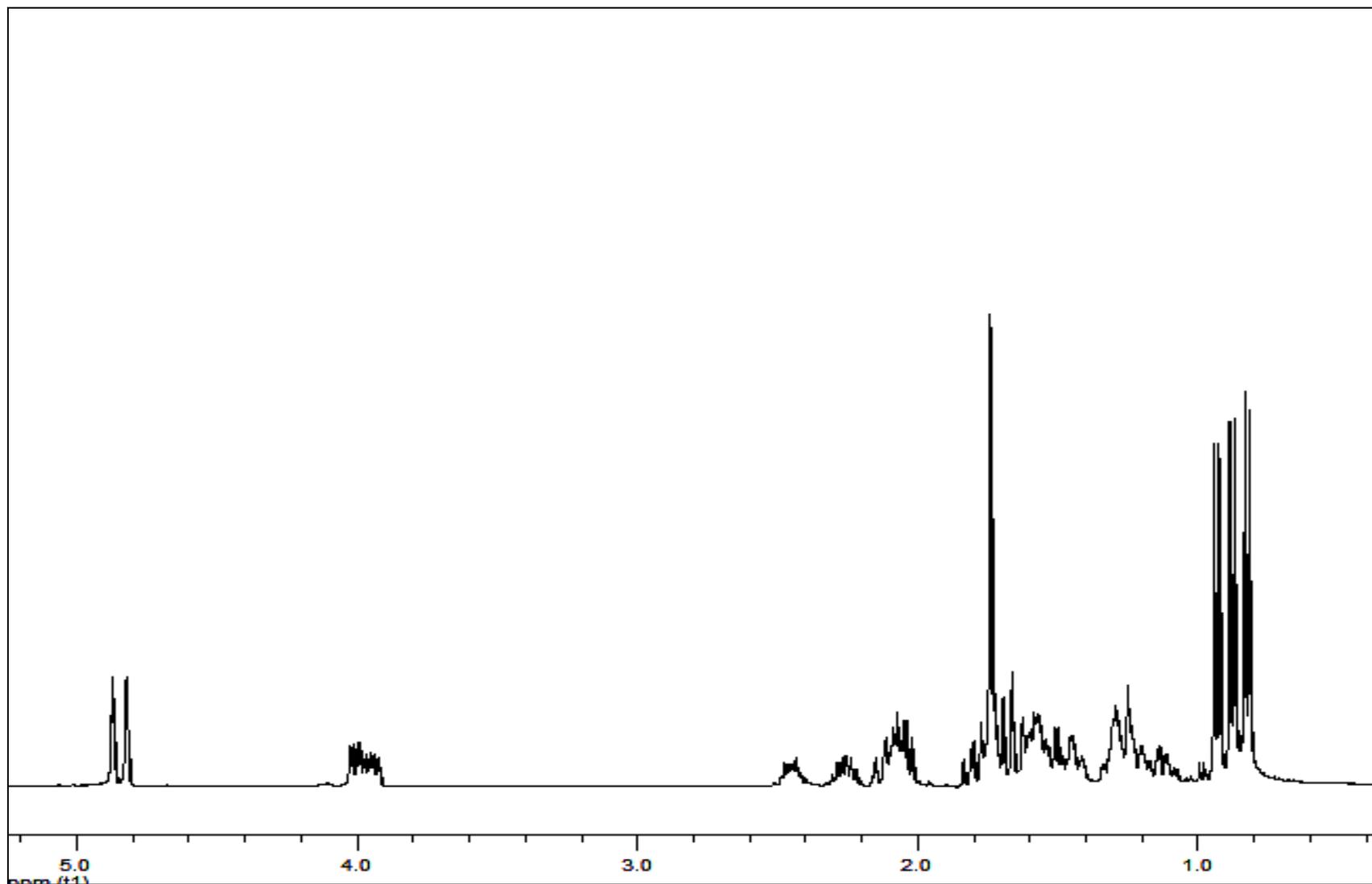
S41. Espectro de RMN ^{13}C de **35** en CDCl_3 a 100 MHz.



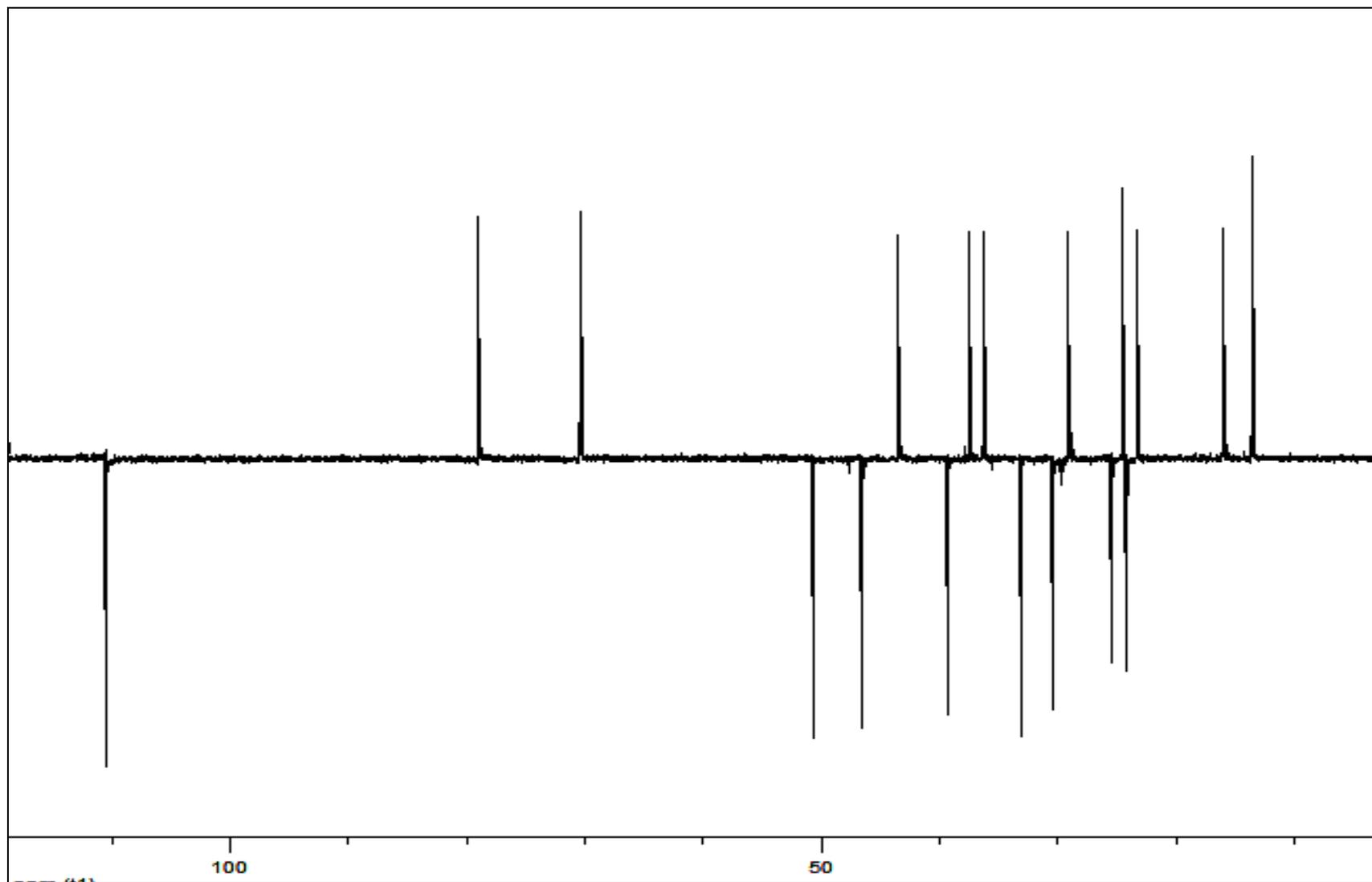
S42. Espectro de RMN ^1H de **45** en CDCl_3 a 400 MHz.



S43. Espectro de RMN ^{13}C de **45** en CDCl_3 a 100 MHz.



S44. Espectro de RMN ^1H de **49** en CDCl_3 a 400 MHz.



S45. Espectro DEPT de **49** en CDCl₃ a 100 MHz.