



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Síntesis de Alquilglicerolípidos y determinación de su actividad *antifouling*

Clara Milena Barragán Avilez

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de ciencias, Departamento de química
Bogotá, Colombia
2015

Síntesis de alquilglicerolípidos y determinación de su actividad *antifouling*

Clara Milena Barragán Avilez

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título
de:

Magister en Ciencias-Química

Director (a):

Ph.D. Humberto Mayorga Wandurraga

Línea de Investigación:

Productos Naturales

Grupo de Investigación:

Estudio y Aprovechamiento de Productos Naturales Marinos y Frutas de Colombia

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de química

Bogotá, Colombia

2015

A mis padres y a mi familia

Agradecimientos

A la universidad Nacional de Colombia, por la formación académica y personal.

Al grupo de investigación “Estudio y Aprovechamiento de Productos Naturales Marinos y Frutas de Colombia”, del departamento de Química, y al Laboratorio de investigaciones y asesorías en microbiología, del departamento de farmacia, por acogerme en sus instalaciones donde se llevó a cabo el trabajo.

A los profesores Humberto Mayorga Wandurraga, Edelberto Silva Gómez, Leonardo Castellanos Hernández y Freddy Ramos Rodríguez por su orientación, por compartir su conocimiento, por su apoyo en todo momento, por su paciencia, por su apoyo y por su amistad.

A mi familia, por apoyarme todo este tiempo, especialmente a mis padres y a la Toli por expresarme siempre y de mil maneras su amor, a pesar de la distancia, un gracias no es suficiente pero todo mi agradecimiento es para ustedes, estaré eternamente en deuda.

A las manitas, por todos esos momentos de risas, que me hicieron olvidar las situaciones más difíciles y por supuesto a mi morsa hermosa.

A todos los compañeros del grupo de marinos, por todos los momentos académicos y agradables, porque cada instante vivido, quedara en mi memoria.

Resumen

Se sintetizaron 4 compuestos de la familia de los alquilglicerolípidos (AQG) caracterizados por poseer un esqueleto de glicerol, al cual, mediante un enlace tipo éter se le une una cadena alifática. A estos se les ha hallado diferentes actividades biológicas que los hacen de gran interés, farmacológico, médico, industrial y químico. Los AQG 1-O-dodecilglicerol (C12:0) **1**, 1-O-tetradecilglicerol (C14:0) **2**, 1-O-hexadecilglicerol (C16:0) **3** y 1-O-octadecilglicerol (C18:0) **4**, fueron sintetizados asimétricamente con la estereoquímica que presentan en la naturaleza, de acuerdo a la síntesis propuesta por Magnusson *et al.*, partiendo del reactivo quiral (*R*)-solketal con los respectivos bromuros de alquilo para **1**, **2** y **3**, y el ester metílico en el caso de **4**. La finalidad del estudio fue evaluar el comportamiento de los compuestos sintetizados frente a los microorganismos, así se estableció una metodología mediante ensayos biológicos, que consistió en evaluar la capacidad antibacteriana, como primera aproximación, mediante ensayo de difusión en agar y microdilución en caldo. Determinamos la concentración inhibitoria mínima de cada uno de los compuestos contra 14 cepas bacterianas (aislados clínicos), y posteriormente fueron evaluados en el ensayo de actividad IQS frente al biosensor *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532, el cual fue un experimento indicador del potencial antifouling de los compuestos. Los resultados obtenidos, presentaron que el 1-O-dodecilglicerol fue el más efectivo en la inhibición del crecimiento de bacterias como *L. innocua* y *S. aureus* principalmente, y presentó actividad IQS significativa. Las bacterias fueron susceptibles diferencialmente a cada AQG y los compuestos mostraron ser bacteriostáticos, pero no bactericidas.

Su baja toxicidad hacia el medio ambiente puede abrir la posibilidad de nuevos estudios de actividad biológica-estructura y el conocimiento sobre su modo de acción, incluyendo la síntesis de nuevas variantes estructurales y otras posibilidades contra el *fouling*.

Palabras clave: Alquilglicerolípidos, Síntesis asimétrica, Actividad antibacteriana, Inhibición del *quórum sensing*, *Fouling*.

Abstract

Four compounds of the alkylglycerolipids family (AKG) characterized by having a glycerol backbone which by ether link is joined to an aliphatic chain were synthesized. They have been found with different biological activities, this make them of great interest pharmacological, medical, industrial and chemical. The AKG 1-O-dodecylglycerol (C12:0) **1**, 1-O-tetradecylglycerol (C14:0) **2**, 1-O-hexadecylglycerol (C16:0) **3** and 1-O-octadecylglycerol (C18:0) **4**, were asymmetric synthesized with the stereochemistry that occurs in nature, according to the proposed method by Magnusson *et al.* from chiral reagent (*R*)-solketal and the alkyl bromides respectively for **1**, **2** and **3**, and the methyl ester in the case of **4**. The aim of the study was evaluate the behavior of the synthesized compounds against microorganisms, thus a methodology was established for biological assays to test the antibacterial ability as a first approximation, by agar diffusion assay and broth microdilution. We determined the minimal inhibitory concentration of each compounds against 14 bacterial strains (clinical isolation), and then they were tested in the QSI assay against *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532 as biosensor, which was an indicator experiment of potential antifouling compounds. The results showed that 1-O-dodecylglycerol was the most effective in bacterial growth inhibiting against *L. innocua* and *S. aureus* mainly, and had significant QSI activity. The bacteria were differentially susceptible to each AKG, and the compounds showed to be bacteriostatic, but not bactericides.

Its low toxicity to the environment can open the possibility of new researches in biological activity-structure of AKG and the knowledge about its action mode, including synthesis of new structural variants and others possibilities against *fouling*.

Keywords: Alkylglycerolipids, Asymmetric synthesis, Antibacterial activity, *Quorum sensing* inhibition, *Fouling*.

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Lista de figuras y esquemas	XIII
Lista de tablas	XV
Lista de Símbolos y abreviaturas	XVI
Introducción	1
Hipótesis	3
Objetivo general.....	4
Objetivos específicos.....	4
Bibliografía	4
1. Estado del arte: Generalidades y características de los alquilglicerolípidos.....	7
1.1 Presencia y distribución de alquilglicerolípidos	10
1.2 Importancia, actividad biológica y beneficios.....	12
Bibliografía	16
2. Síntesis y purificación de alquilglicerolípidos.....	19
2.1 Introducción	20
2.2 Materiales y métodos	21
2.3 Síntesis de Alquilgliceroles.....	22
2.3.1 Obtención y elucidación por RMN de 1, 2, 3 y 4	26
2.4 Resultados y discusión.....	29
2.5 Conclusiones	34
Bibliografía	35
3. Actividad antifouling de los alquilglicerolípidos sintetizados.....	37
3.1 Introducción	38
3.2 Materiales y métodos	42
3.2.1 Cepas bacterianas.....	42
3.2.2 Cultivo y medios de cultivos	43
3.2.3 Ensayo por difusión en agar.....	43
3.2.4 Concentración inhibitoria mínima (CIM).....	44

3.3	Resultados y discusión.....	47
3.3.1	Ensayo de difusión en agar.....	47
3.3.2	Ensayo de CIM.....	49
3.3.3	Ensayo de actividad IQS.....	54
3.4	Conclusiones.....	58
Bibliografía.....		58
4.	Conclusiones y recomendaciones.....	63
4.1	Conclusiones.....	63
4.2	Recomendaciones.....	63
A.	Anexo: Espectros de RMN ^1H y ^{13}C del compuesto 1.....	65
B.	Anexo: Espectros de RMN ^1H y ^{13}C del compuesto 2.....	66
C.	Anexo: Espectros de RMN ^1H y ^{13}C del compuesto 3.....	67
D.	Anexo: Espectros de RMN ^1H y ^{13}C del compuesto 4.....	68
E.	Anexo: Espectro de CLAE-MS/ESI del compuesto 1.....	69
F.	Anexo: Espectro de CLAE-MS/ESI del compuesto 2.....	69
G.	Anexo: Espectro de CLAE-MS/ESI del compuesto 3.....	70
H.	Anexo: Espectro de CLAE-MS/ESI del compuesto 4.....	70

Lista de figuras y esquemas

	Pág.
Figura 1.1 Cadenas alifáticas unidas por enlace tipo éter.	7
Figura 1.2 Numeración de los carbonos de la molécula del glicerol.	8
Figura 1.3 Configuración de un alquilglicerol: 1- <i>O</i> -alquil- <i>sn</i> -glicerol.	8
Figura 1.4 Estructura química de alquilgliceroles no esterificados, mono-esterificados y di-esterificados.	8
Figura 1.5 Variedad funcional de AQQ naturales. (a) 1- <i>O</i> -alquil- <i>sn</i> -glicerol, (b) 1- <i>O</i> -(alquil-enil)- <i>sn</i> -glicerol, (c) 1- <i>O</i> -alquil-2,3-diacil- <i>sn</i> -gliceroles, (d) plasmanil-fosfolípidos. ...	9
Figura 1.6 Numeración de los carbonos de la molécula del glicerol.	10
Esquema 2.1 Reacción general de síntesis de AQQ: reactivos y condiciones.	22
Esquema 2.2 Paso 1: alquilación del reactivo quiral (2)	23
Esquema 2.3 Paso 2: hidrólisis ácida con <i>p</i> -TsOH (THF/agua).	24
Esquema 2.4 Secuencia de reacciones para obtención de AQQ a partir del ácido graso o el éster.	24
Esquema 2.5 Reacción general de reducción: reactivos y condiciones.	25
Esquema 2.6 Reacción general de mesilación: reactivos y condiciones.	25
Esquema 2.7 Reacción de obtención de AQQ 4 con reactivo quiral.	26
Figura 2.1 Espectros de RMN de ¹ H y ¹³ C para 1	27
Figura 2.2 Estructura del compuesto 1	30
Figura 2.3 Estructura del compuesto 2	30
Figura 2.4 Estructura del compuesto 3	31
Figura 2.5 Estructura del compuesto 4	32
Figura 3.1 Placa de 96 pozos para CIM.	45
Figura 3.2 Cepas bacterianas empleadas CIM.	45
Figura 3.3 Sembrado por agotamiento del <i>C. violacem</i>	46
Figura 3.4 Placas con sensidiscos para ensayo IQS.	47
Figura 3.5 Ensayo de difusión con <i>M. luteus</i> (a) en agar No.1 (b) en agar MH.	48
Figura 3.6 Ensayo de difusión con <i>B. subtilis</i> (a) en agar No.1 (b) en agar MH	49
Figura 3.7 Placa del ensayo CIM del compuesto 1	51
Figura 3.8 Placa del ensayo CIM del compuesto 2	52
Figura 3.9 Placa del ensayo CIM del compuesto 3	53

Figura 3.10 Placa del ensayo CIM del compuesto 4	53
Figura 3.11 Placa del ensayo de IQS para el compuesto 1	56
Figura 3.12 Placas del ensayo de IQS (a) compuesto 2 (b) compuesto 3 (c) compuesto 4	56

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 2.1 Desplazamientos de señales diagnóstico en RMN ^{13}C del esqueleto del glicerol.....	33
Tabla 3.1 Soluciones de McFarland para estándar del inóculo (33)	44
Tabla 3.2 Resultados de ensayo CIM para cada uno de los compuestos.....	50
Tabla 3.3 Resultados de la actividad inhibitoria de QS de los compuestos sintetizados..	55

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolo	Término
<i>APT</i>	Attached proton test
<i>AQG</i>	Alquilglicerólípido(s)
<i>AHL</i>	Acilhomoserín lactonas
$BaCl_2$	Cloruro de bario
$BaSO_4$	Sulfato de bario
<i>CCD</i>	Cromatografía en capa delgada
<i>CCF</i>	Cromatografía en capa fina
$CDCl_3$	Cloroformo deuterado
<i>CIM</i>	Concentración inhibitoria mínima
^{13}C	Espectro de carbono
$^{\circ}C$	Grados Celsius
<i>d</i>	doblete
<i>DCM</i>	Diclorometano
<i>DEAG</i>	Alquilglicerol Di-esterificado
<i>DMF</i>	Dimetilformamida
<i>DO</i>	Densidad óptica
<i>EPS</i>	Exopolisacáridos
<i>FAP</i>	Factores de activación plaquetaria
<i>h</i>	Hora(s)
<i>HRESI-MS</i>	High resolution electro spray ionization mass spectrometry
<i>Hz</i>	Hertz
1H	Espectro de protón
H_2SO_4	Ácido sulfúrico
<i>IQS</i>	Inhibidores del quórum sensing
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
<i>KBr</i>	Bromuro de potasio
<i>KOH</i>	Hidróxido de potasio
<i>LB</i>	Luria bertani
<i>m</i>	multiplete
<i>MEAG</i>	Alquilglicerol mono-esterificado
<i>MeOH</i>	Metanol
<i>MH</i>	Mueller hinton
<i>min</i>	Minutos
<i>MsCl</i>	Cloruro de metanosulfonilo
<i>NaOH</i>	Hidróxido de sodio
<i>QS</i>	Quorum sensing
<i>Red-Al</i>	Hidruro de sodio bis(2-metoxietoxi)aluminio
<i>RMN</i>	Resonancia magnética nuclear
<i>s</i>	singlete

Símbolo	Término
<i>sn</i>	Numeración estereoespecífica
<i>t</i>	Triplete
<i>TBAB</i>	Bromuro de tetrabutil amonio
<i>THF</i>	Tetrahidrofurano
<i>UFC</i>	Unidades formadoras de colonias
μg	Microgramos
μl	Microlitros
δ	Desplazamiento (RMN)
λ	Longitud de onda

Introducción

En las últimas décadas los organismos marinos han mostrado ser el creciente enfoque de las investigaciones en productos naturales y una fuente rica de compuestos nuevos y bioactivos. Compuestos de estructuras que incluyen diterpenos, polipéptidos cíclicos, alcaloides, espirolidas, lípidos, volátiles halogenados, fenoles, cembranoides, conotoxinas, asbestinas, pseudoterocinas, fuscocidos, eleuterobinas, entre otros, han sido aislados de especies de vertebrados e invertebrados marinos, así como de algas, hongos y bacterias de origen marino **(1)**. Hoy día son fuente importante de compuestos no solo con diversidad estructural sino también variada actividad biológica, los cuales en muchos casos no tienen contraparte en el mundo terrestre. Para estos compuestos se ha encontrado actividades muy interesantes como antihelmíntica, antibacteriana, anticoagulante, antifúngicas, antipalúdico, antiplaquetario, antiprotozoario, antituberculosos, antivirales, antiinflamatorios, entre otras **(2)**.

Encontramos entre los invertebrados marinos, especies de particular interés, que se han convertido en objetivo principal en la búsqueda de compuestos con bioactividad **(3)**, ya que producen estructuras con diferentes funciones, las cuales les permiten defenderse de otras especies y mantener su espacio limpio, libre de otros organismos o microorganismos, lo que también ha conllevado al desarrollo de investigaciones sobre la actividad alelopática de los mismos **(4, 5)**. Entre estas especies de invertebrados, encontramos los octocorales o corales blandos, de los cuales del género *Eunicea* se conocen gran diversidad de compuestos que les ayudan a limitar la predación por otras especies o la competencia por espacio y en algunos casos su superficie se encuentra muy limpia, lo que da indicio de que pueden controlar la proliferación de los microorganismos y que pueden desestimular o limitar el desarrollo del *biofouling* **(3, 6)**.

Así, entre los compuestos extraídos de dicho género de octocorales encontramos una variedad de terpenos, péptidos, alcaloides y lípidos. De estos últimos se han encontrado

ácidos grasos de gran diversidad estructural, con cadenas impares, ramificadas, insaturadas no convencionales, con diversos grupos funcionales como acetoxi, hidroxilos, entre otros, a los cuales se les ha venido reconociendo su potencial biomédico así como sus posibilidades de aplicación como agentes de defensa, además, debido a su actividad antimicrobiana, citotóxica y *antifouling* son de gran interés **(7)**.

En algunos reportes se ha presentado la diversidad estructural y biológica de esta clase de invertebrados marinos, por ejemplo del octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae*, se aisló una variedad de diterpenos glicosidados conocidos como pseudopterinas y del octocoral *Eunicea fusca*, se encontraron el fuscól, el fuscósido A y el fuscósido B **(3)**, de los cuales, todos los compuestos se caracterizaron por presentar actividad antiinflamatoria potente **(8, 9)**, por otra parte del coral blando *Lobophytum pauciflorum*, se aislaron compuestos de tipo bisembranoides llamados lobofitonas O-S y lobofitona T, exhibiendo inhibición del crecimiento bacteriano **(10)** y del coral blando *Eunicea knighti* se estudiaron compuestos de tipo cembradieno, que fueron activos a ensayos *antifouling*, tales como de inhibición del crecimiento de bacterias de origen marino promotoras del *fouling* y de inhibición del *quorum sensing* **(11)**.

Nuevas investigaciones continúan revelando la capacidad de los compuestos aislados de los octocorales del género *Eunicea*, por su potencial en actividades biológicas como citotóxica, antitumoral, anticancerígena, antiinflamatoria, antiplasmódica y de inhibición del *quorum sensing*. Además se ha evaluado la actividad frente a bacterias marinas aisladas de superficies con intenso *fouling*, así como la actividad inhibitoria de biopelículas como indicativo de la capacidad *antifouling* de los compuestos aislados de *Eunicea knighti* **(6)**, *Eunicea sp* y *Eunicea fusca* **(12)**.

Con respecto al octocoral *Eunicea sp*, de su extracto orgánico, levemente activo al ensayo antimicrobiano, se aisló un alquilglicerolípido (AQG) mayoritario elucidado por RMN y HRESI-MS, rotación óptica y por comparación de datos con la literatura, indicando la estructura del (S)-(+)-3-Octadeciloxi-1,2-propano-diol, conocido como (S)-(+)-alcohol batílico. Se realizó la evaluación de la actividad *antibiofilm* de este AQG, en placas de polietileno multipozos, contra tres bacterias marinas y dos de referencia, por su capacidad en la producción de biopelículas. Los resultados obtenidos permitieron proponer a este AQG potencialmente activo frente a estas cepas y su posible utilidad o

como un ingrediente *antibiofilm* en aplicaciones farmacológicas o de uso industrial para recubrimientos *antifouling* no tóxico y amigables con el medio ambiente **(12)**.

Los compuestos alquilgliceroles se han reportado con diversa actividad biológica, sin embargo el comportamiento de los mismos frente a microorganismos ha sido muy poco explorado. En el presente trabajo se realizó la síntesis de AQG, con la estereoquímica que presentan en la naturaleza, variando la longitud de la cadena alquílica e incorporando algunas insaturaciones, con el fin de evaluar su potencial frente a bacterias. Así mismo, determinar si estas estructuras son las responsables de la actividad antibacteriana o inhibitoria del *quorum sensing*, fundamental en la formación del *fouling* bacteriano, tal como se ha previsto para un miembro de esta familia aislado de *Eunicea* sp. De esta manera el trabajo se dividió en tres ejes temáticos principales, un primer capítulo en el cual se presenta el estado del arte sobre los compuestos AQG, características, distribución, actividad biológica y beneficios. El capítulo dos se enfoca en la síntesis de los compuestos alquilglicerolípidos, teniendo en cuenta metodologías apropiadas para obtener los naturales y derivados insaturados. Finalmente en el capítulo tres se presentan los ensayos frente a un espectro de cepas bacterianas seleccionadas y los de inhibición del *quorum sensing*.

Hipótesis

Aunque los alquilglicerolípidos naturales poseen actividad biológica conocida y son motivo de varios estudios actuales, es posible también que sean activos frente al desarrollo del *fouling* microbiano. Así la exploración de nuevas posibilidades para estos compuestos, como la evaluación de sus propiedades, antibióticas, antimicrobiana, antifúngicas, inhibitoria del *quorum sensing*, de adhesión o inhibición de la biopelícula o de otras en el marco de la actividad *antifouling*, puede ser una fuente de nuevos conocimientos relacionados con estas estructuras, por lo que es necesario sintetizar y realizar los bioensayos respectivos, con cada uno de ellos. Así, la aplicación de ensayos en alguna de las actividades biológicas mencionadas arriba, permitirá contribuir a la determinación de los compuestos alquilglicerolípidos como potenciales agentes de control, inhibición o propagación del fenómeno del *fouling*.

Objetivo general

Contribuir al conocimiento químico mediante la síntesis de compuestos de tipo alquilglicerolípidos inspirados en los de la naturaleza para evaluar su actividad biológica.

Objetivos específicos

Sintetizar compuestos de tipo alquilglicerololes como los presentes en la naturaleza.

Implementar un ensayo biológico que permita evaluar el potencial de compuestos orgánicos frente al *fouling* bacterial.

Evaluar la actividad antifouling de compuestos tipo alquilglicerolípidos sintetizados o naturales.

Bibliografía

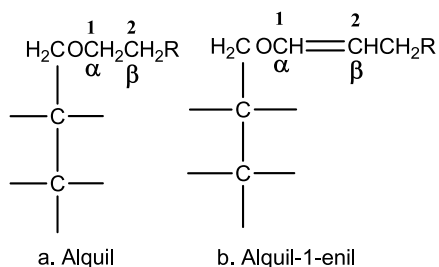
1. Blunt J, Copp B, Keyzers R, Munro M, Prinsep M. Marine natural products. *Natural Product Reports*. 2012 December; 29, 144-222.
2. Mayer A, Rodriguez A, Berlinck R, Hamann M. Marine pharmacology in 2007–8: Marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the immune and nervous system, and other mechanisms of action. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*. 2007 January; 145, 553-581.
3. Reina E, Puentes C, Rojas J, García J, Ramos F, Castellanos L, Aragón M, Ospina L. Fuscoside E: A strong anti-inflammatory diterpene from Caribbean octocoral *Eunicea fusca*. *Bioorganic & Medicine Chemistry Letters*. 2011 August; 21, 5888-5891.
4. Qi S, Zhang S, Yang H, Qian P. Antifouling and antibacterial compounds from the gorgonians *Subergorgia suberosa* and *Scirpearia gracilis*. *Natural Product Research*. 2008 January; 22, 154-166.
5. Mora J, Arévalo C, Ramos F, Tello E, Duque C, Lhullier C, Falkenber M, Schenkel E.

- 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*. 2011 December; 66c, 515-526.
6. Tello E, Castellanos L, Arévalo C, Duque C. Disruption in quorum-sensing systems and bacterial biofilm inhibition by cembranoid diterpenes isolated from the octocoral *Eunicea knighti*. *Journal of Natural Products*. 2012 August; 75, 1637-1642.
 7. Carballeira N. New advances in the chemistry of methoxylated lipids. *Progress in Lipid Research*. 2002 November; 41, 437-456.
 8. Correa H, Valenzuela A, Ospina L, Duque C. Anti-inflammatory effects of the gorgonian *Pseudopterogorgia elisabethae* collected at the Islands of Providencia and San Andrés (SW Caribbean). *Journal of Inflammation*. 2009 March; 6, 1-10.
 9. Shin J, Fenical W. Fuscoides A-D: anti-inflammatory diterpenoid glycosides of new structural classes from the Caribbean gorgonian *Eunicea fusca*. *The Journal of Organic Chemistry*. 1991 May; 56, 3153-3158.
 10. Yan P, Deng Z, Ofwegen L, Proksch P, Lin W. Lobophytone O–T, new biscembranoids and cembranoid from soft coral *Lobophytum pauciflorum*. *Marine Drugs*. 2010 November; 8, 2837-2848.
 11. Tello E, Castellanos L, Arevalo C, Duque C. Cembranoid diterpens from the Caribbean sea whip *Eunicea knighti*. *Journal Natural Report*. 2009 April; 72, 1595-1602.
 12. Martínez Y, Vanegas G, Reina E, Mayorga H, Arévalo C, Ramos F, Castellanos L, Duque C. Anti-biofilm activity of compounds from two *Eunicea* soft corals collected at the Colombian Caribbean Sea. *Biofouling*. 2014; [en preparación].

1. Estado del arte: Generalidades y características de los alquilglicerolípidos

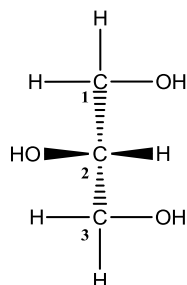
Los alquilglicerolípidos (AQG) cubren una variedad de compuestos bioactivos, hallados en la naturaleza que tienen generalmente una cadena alquímica o alquénica unida al glicerol en la posición *sn*-1 (figura 1.1) **(1, 2, 3)**.

Figura 1.1 Cadenas alifáticas unidas por enlace tipo éter

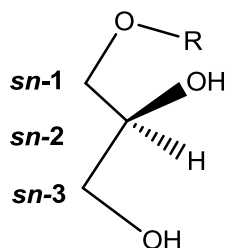
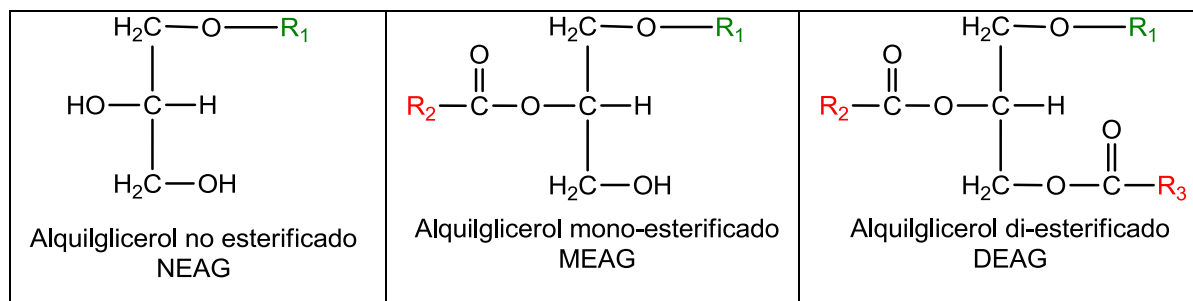


En la literatura se encuentran con otras denominaciones, tales como: éteres del glicerol, éteres lipídicos, éteres glicéricos, alcoxigliceroles, vinil o alil glicéridos, alquil o alquénil-fosfolípidos o nombrados de manera sistemática como *O*-alquil- y *O*-alquénil-propanodiolos **(1, 3)**.

La configuración en los átomos de carbono del residuo del glicerol es designada por la numeración estereoespecífica *sn* (*stereospecific numbering*). La terminología se fundamenta en que en la proyección de Fischer del glicerol, se representa el grupo hidróxilo del carbono C-2 hacia la izquierda, así el carbono metilénico C-1 es pro-*S* (figura 1.2), teniendo en cuenta que es una molécula simétrica, pero se considera proquiral **(1, 3)**. Al derivatizar los hidróxilos de los carbonos 1 y 3 con sustituyentes diferentes, el C-2 se vuelve asimétrico, y así se denota anteponiendo el prefijo *sn* al número en C-3, que resulta ser entonces el pro-*R* **(4, 5)**.

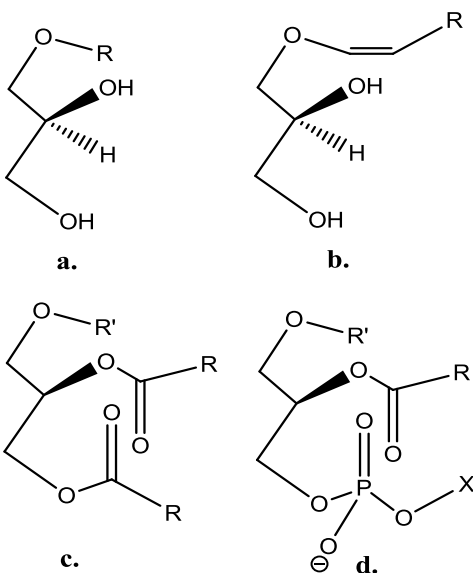
Figura 1.2 Numeración de los carbonos de la molécula del glicerol

En la figura 1.3 se presentan las posiciones definidas arriba, para los alquilgliceroles. Los AQQ con grupo 1-O-alkil, donde la cadena alquílica se encuentra en la posición *sn*-1, son los de mayor presencia y distribución en la naturaleza y se les atribuyen diversos efectos biológicos y terapéuticos **(6)**. La variedad de estas moléculas puede contener cadenas alquílicas de 8, 10, 12, 14, 16 y 18 átomos de carbonos, así mismo cadenas con insaturaciones **(7)**. Además, pueden incluir cadenas acíclicas, que se obtienen esterificando los grupos hidróxilos del glicerol, encontrándose alquilgliceroles no esterificados, mono-esterificados y di-esterificados, como se presenta en la figura 1.4 **(8)**.

Figura 1.3 Configuración de un alquilglicerol: 1-O-alkil-*sn*-glicerol**Figura 1.4** Estructura química de alquilgliceroles no esterificados, mono-esterificados y di-esterificados

Los AQQ de cadena *O*-alquil-1'-enil, se nombran como 1-*O*-(alquil-enil)-*sn*-glicerol; por su parte los di-esterificados (DEAG o *DAGE*), son conocidos como los 1-*O*-alquil-2,3-diacil-*sn*-gliceroles pues tienen dos grupos acilo en las posiciones *sn*-2 y *sn*-3. Otros son éteres fosfolipídicos, los cuales tienen un ácido graso en la posición *sn*-2 y una cabeza polar de ácido fosfórico en la posición *sn*-3, unidos por lo general a la etanolamina, la colina o la serina, estos son llamados plasmanil-fosfolípidos en incluyen los factores de activación plaquetaria (FAP) **(3)**, quienes son un grupo de mediadores lipídicos con actividad biológica potente. En la figura 1.5 se presentan las diferentes funcionalidades de AQQ.

Figura 1.5 Variedad funcional de AQQ naturales. (a) 1-*O*-alquil-*sn*-glicerol, (b) 1-*O*-(alquil-enil)-*sn*-glicerol, (c) 1-*O*-alquil-2,3-diacil-*sn*-gliceroles, (d) plasmanil-fosfolípidos **(3)**



R = cadena hidrocarbonada saturada, monoinsaturada o poliinsaturada

R' = cadena hidrocarbonada saturada o monoinsaturada

X = etanolamina, colina o serina

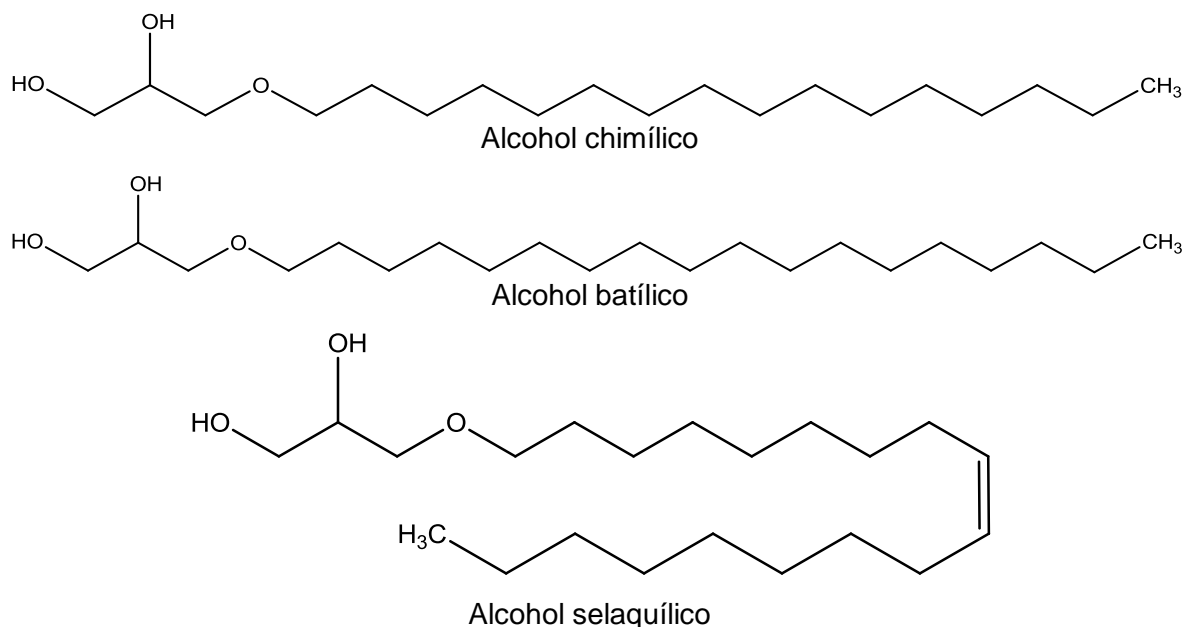
Existen también los análogos a los plasmanil-fosfolípidos monoacídicos, constituyentes esenciales de las membranas de animales, los 1-*O*-(alquil-1-enil) diacilados, a los cuales se les llama plasmalógenos neutros. Igualmente es posible encontrar los alquil metoxilados (2'*R*)-1-*O*-(2'-metoxialquil)-*sn*-gliceroles, quienes son también de configuración *sn*-1 y poseen un grupo metoxilo en C-2 **(3)**.

1.1 Presencia y distribución de alquilglicerolípidos

El primer aislamiento reportado en 1915, fue de la fracción insaponificable de la estrella de mar *Asterias rubens*, de la que se aisló un AQG, al cual posteriormente se le asignó el nombre de alcohol batílico. Sucesivamente, de peces cartilaginosos se aislaron los AQG que contenían cadenas acílicas de palmitil (C16:0), estearil (C18:0) y oleil (C18:1), a los cuales se les dieron los nombres comunes de alcohol chimílico, alcohol batílico y alcohol selaquílico, de acuerdo a su origen, es decir, de batoidea (rayas), chimearas (tiburón ratón) y selachii (otros tiburones), respectivamente, que presentan las estructuras que se muestran en la figura 1.6 (9).

También han sido hallados en el ser humano, principalmente en las células del sistema inmune, en la leche materna, la médula ósea, los glóbulos rojos y en el plasma sanguíneo (10), e incluso en bacterias, protozoos, hongos y en algunas plantas superiores (11).

Figura 1.6 Principales alquilgliceroles del tipo 1-O-alkil



En los años siguientes a su descubrimiento, la fracción insaponificable obtenida por hidrólisis alcalina de un extracto graso se usó para el análisis de dichos compuestos (3). Por ejemplo, empleando el método de ruptura oxidativa con ácido periódico (HIO_4) de

Karnovsky *et al*, para dioles, se pudo determinar el contenido de AQQ en el aceite de animales marinos y terrestres, tales como peces, moluscos, crustáceos, reptiles, anfibios, aves, mamíferos y en material vegetal, mostrando que dichos compuestos, estaban ampliamente distribuidos en los animales, pero en pocas cantidades en las células vegetales. Sin embargo, también han sido encontrados en el polen de *Pinus halepensis*. No obstante están en mayores cantidades en el aceite de hígado de animales marinos, que en el de hígado de animales terrestre **(1, 3)**.

Con la introducción de métodos cromatográficos, para el análisis de AQQ fue posible la separación de alquil-diacil-*sn*-gliceroles y de alquil-acil-fosfatidos, facilitando las investigaciones posteriormente en las fracciones de teleósteos (*Clupea harengus*), en crustáceos (*Nephrops norvegicus*), en cangrejos de río (*Astacus fluviatilis*), en camarones (*Pandalus borealis*), en moluscos (*Mytilus edulis*) y en el aceite de hígado de bacalao **(12, 13)**.

Por su parte, aunque los estudios habían demostrado bajas cantidades de AQQ en peces teleósteos en comparación con los cartilagosos, se encontró en tres especies de estos, *Cubiceps gracilis*, *Centrolophus sp.* y *Stromateus maculatus*, que la mayor parte de lípidos en sus músculos eran de tipo DEAG y en altos porcentajes, hasta del 70 % **(14)**.

En los mamíferos los 1-*O*-alquil-*sn*-gliceroles se encuentran en diferentes tejidos, aunque a menudo como componentes lipídicos minoritarios. En la leche de vaca, de oveja, humana y en la médula ósea, en glóbulos rojos y en plasma sanguíneo, se encontró que el porcentaje de alquilgliceroles en la fracción fosfolipídica fue mucho mayor que en la fracción de lípidos neutros, y que el calostro humano tenía un mayor contenido de AQQ que la leche humana, que a su vez tenía un contenido diez veces mayor que la leche de vaca y dos veces más alto que la leche de oveja. Sin embargo la médula ósea humana tuvo el mayor porcentaje AQQ en mamíferos **(15)**.

En términos generales, el aceite de hígado de varios condriictios (tiburones, rayas y quimeras) son el principal reservorio natural de 1-*O*-alquil-*sn*-gliceroles, y hasta la fecha algunas especies de tiburones abastecen las demandas industriales de aceite de hígado de tiburón debido a su alto contenido de escualeno y de AQQ. La cantidad de AQQ es variable, no sólo entre especies, sino también entre los miembros de la misma especie,

esta variabilidad podría estar relacionada con diferentes factores ambientales tales como la profundidad y la ubicación geográfica **(16)**.

Es importante mencionar que también se ha demostrado la presencia de AQQ en las células tumorales, por ejemplo, estudios realizados de 17 tumores humanos diferentes, evidenciaron que el total de dichos AQQ contenidos en la fracción de lípidos neutros fue mucho mayor en las células neoplásicas que en la mayoría de las células sanas, con la excepción de las del corazón y del riñón; además se reveló que el alcohol chimílico fue el AQQ más abundante en el carcinoma **(17)**.

1.2 Importancia, actividad biológica y beneficios

En la actualidad se está en la búsqueda de una mejor comprensión de la funcionalidad global en los sistemas biológicos que involucren las moléculas lipídicas como la señalización celular, la arquitectura de membrana, las interacciones célula-célula y célula-proteína, entre otras, debido principalmente a la diversidad estructural que es posible encontrar en los mismos, por lo que se han sugerido diferentes mecanismos con los cuales es posible la comprensión para estas múltiples actividades, que resultan de la incorporación de las diferentes clases de lípidos en los fosfolípidos de membrana y de las interacciones de señalización de los mismos, haciendo que hoy día los lípidos no sean vistos como simples almacenadores de energía o como enemigos de la buena salud.

Junto con esto, está emergiendo una de las ramas de la metabolómica, encargada del estudio global de los lípidos, conocida como lipidómica. La lipidómica es el análisis exhaustivo de todos los lípidos en un sistema biológico, que tiene en cuenta las interacciones de los mismos con otras moléculas y su función dentro de la célula, apoyada en diferentes técnicas de cromatografía líquida, espectrometría de masas y RMN. Con los recientes avances en estas técnicas acopladas, de separación y análisis, se ha conducido a una detección rápida y con mayor sensibilidad de una variedad de lípidos, presentes en un perfil lipídico o lipidoma de un extracto crudo. La lipidómica integrada con la genómica, la proteómica y la metabolómica contribuirá al entendimiento de la función de los lípidos en un sistema biológico y proveerá una herramienta poderosa para elucidar mecanismos de enfermedades, el barrido de biomarcadores, el monitoreo de terapias farmacológicas o de lípidos de interés **(18)**.

Todo esto ha llevado a una mayor comprensión de los valores y los efectos asociados a tipo de lípidos específicos, así pues los AQQ naturales, introducen un nuevo concepto terapéutico en el tratamiento de afecciones humanas, gracias a sus múltiples beneficios biológicos **(19)**. Por ejemplo a nivel inmunológico los AQQ y algunos alquil fosfolípidos activan significativamente los macrófagos favoreciendo la fagocitosis, aumentando la respuesta inmune, demostrándose que estimulan la hematopoyesis, la eritropoyesis, trombosis y los granulocitos en los animales **(6)**. Otros estudios manifiestan que al incrementar los linfocitos y monocitos, algunos AQQ pueden generar una eficiente respuesta inmune hacia las células tumorales.

En una de las mejores hipótesis a los AQQ, se les considera precursores de éteres de fosfolípidos (acil-alqui-fosfolípidos), por lo que se cree que pueden incorporarse a estos fosfolípidos de membrana y desde allí, modificar sus propiedades físicas, como la fluidez de la membrana, el estado de antioxidantes o alterar la señalización celular a través de la fosfolipasa, actuando así como precursores de fosfolípidos biológicamente activos, como mensajeros y mediadores, por ejemplo en células sanguíneas o en macrófagos **(20)**.

En otros estudios se demostró que algunos alquilglicerolípidos, estimulan la hematopoyesis, así como también la producción de anticuerpos con el incremento de linfocitos tipo B y T que generan una eficiente respuesta inmune hacia las células tumorales, e incrementan en un 44% la producción de monocitos, por lo que se indicó que éstos, gracias a que se encuentran en los fluidos corporales como en la leche de mamíferos, cuando pasan de madre a hijo, o en tratamientos orales podrían tener efectos benéficos sobre la salud de la descendencia, y efectos positivos en su desarrollo neurológico **(20)**. Lo anterior se estableció en tratamientos llevados a cabo con cerdas embarazadas, con una dieta rica en AQQ que dieron lugar al aumento de inmunoglobulinas específicas, así como de anticuerpos en el calostro de las madres tratadas y en el suero de los lechones. Con el suplemento alimenticio las crías tuvieron un mejor estado de salud, e incrementaron su crecimiento. Esto podría ser parte de los mecanismos involucrando AQQ mediante el aumento de las células competentes del sistema inmunológico. Sin embargo, algunos de estos efectos benéficos pueden resultar también por la presencia de ácidos grasos n-3 poliinsaturados del aceite de hígado de tiburón de la dieta **(21)**.

Como anti-tumorales y anti-metástasis los AQG sintéticos idénticos a los naturales más activos, son los insaturados, 16:1 y 18:1, mientras que los AQG 12:0 y 16:0, son activos levemente, esto se asocia con una fuerte reducción del aumento tumoral inducido en el peso del bazo. Los dos primeros representan del 70 al 80 % del total de AQG en aceite de hígado de tiburón **(20)**. También se evaluaron los efectos de una mezcla natural de AQG provenientes de aceite de hígado de tiburón, usando modelos de ratones a los que se les injertó un tumor (células de carcinoma pulmonar), encontrándose que el tratamiento con dicha mezcla redujo significativamente el crecimiento tumoral y la metástasis pulmonar, aunque los mecanismos por los que los compuestos ejercen estas propiedades anti-tumorales pueden ser múltiples **(20)**.

Los AQG también han sido usados en el tratamiento de diferentes tipos de leucemias y en la prevención de las enfermedades asociadas al cáncer, encontrándose que pueden incrementar la etapa de supervivencia de los pacientes. En un estudio se demostró que el decilglicerol (10:0) y dodeciliglicerol (12:0) tienen efectos citotóxicos sobre la línea de carcinoma humano de mama dependientes de su concentración, de la densidad celular y mostraron un comportamiento diferencial en función de la longitud de cadena alquílica **(22)**.

Así mismo se ha reportado que potencian el efecto de la quimioterapia, puesto que las células tumorales concentran los alquilgliceroles en una proporción de 10 a 100 veces mayor que el tejido normal, y debido posiblemente a que las células tumorales carecen de la enzima que los degrada, los alquilgliceroles pueden taponarlas y ahogarlas, por lo que ellas no pueden reproducirse con facilidad **(23)**.

En el cerebro, los de cadena corta sintéticos como el AQG (5:0) pueden abrir transitoriamente la barrera hematoencefálica (BBB), lo que estaría facilitando el acceso de moléculas terapéuticas al sistema nervioso central (vehículo). La oxidación natural de un AQG insaturado podría conducir al de cadena corta exhibiendo actividad similar **(6)**. También pueden inhibir la respuesta inflamatoria inducida, en diversos modelos animales e *in vitro* **(7, 22)**, efectos probablemente relacionados con las propiedades surfactantes e inmuno-adyuvantes de estos compuestos. Las vacunas de nueva generación han aumentado la necesidad de otros adyuvantes, por lo tanto, el uso de los AQG sintéticos

en sus formulaciones podría ser una alternativa para estimular la respuesta inmune a antígenos solubles y mejorar la eficiencia de la vacunación **(24)**.

En estudios con esperma, se encontró que los espermatozoides producen mediadores FAP, por lo que se relacionaron los AQG con la fisiología del esperma, sugiriendo la hipótesis de que dichos compuestos, como precursores de FAP, podrían tener efectos sobre las funciones del esperma aumentando su motilidad, velocidad y mejores rendimientos de fertilización. Hipótesis basada en estudios en donde se trataron de manera *in vitro*, espermatozoides de cerdo con una mezcla de AQG, evidenciándose que dicho esperma al ser usado en inseminación artificial, fertilizó mucho mejor, considerándose que al utilizar estos compuestos, se puede favorecer la fecundación o incluso se puede permitir una mejor conservación del esperma durante la realización de procedimientos de procreación asistida **(25)**.

También entre sus múltiples funciones, se han reconocido sus propiedades tales como bactericidas, fungicidas, de contribución en la prevención de enfermedades como asma, psoriasis y artritis **(6)**. Se encontró un papel sinérgico entre el dodecíl glicerol (12:0) y la anfotericina como fungicidas contra especies de *Candida* y *Cryptococcus*. Sin embargo, éste es el único AQG hallado con actividad antibacteriana efectiva, con CIM de $4 \mu\text{g ml}^{-1}$ contra *Streptococcus faecium* **(26)**, mientras que el alcohol batílico (18:0) mostró inhibición moderada del crecimiento bacteriano de especies obtenidas del mar: *Pseudoalteromonas piscida*, *Ruegeria* sp. *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio furnissii* y *Vibrio harveyi* **(4)**.

Bibliografía

1. Snyder F. Ether Lipids: Chemistry and Biology. In Snyder F. *Ether Lipids: Chemistry and Biology*. New York: Academic Press; 1972; p. xvii-xiv.
2. Mangold HK, Paltauf F. *Ether Lipids: Biochemical and Biomedical Aspects*. New York: Academic Press; 1983; p. 439.
3. Hirschmann H, Hanson K. On factoring chirality and stereoisomerism. In Ernest L. Eliel NLASHW, editor. *Topics in Stereochemistry*. Cleveland: John Wiley & Sons; 1983; 183-229.
4. Qi S, Zhang S, Yang H, Qian P. Antifouling and antibacterial compounds from the gorgonians *Subergorgia suberosa* and *Scirpearia gracilis*. *Natural Product Research*. 2008 January; 22, 154-166.
5. Weininger SJ, Stermitz FR. Química Orgánica. In Weininger SJ, Stermitz FR. *Química Orgánica*. Barcelona: Reverté; 1988; p. 404-405.
6. Iannitti T, Palmieri B. An update on the therapeutic role of alkyglycerols. *Marine Drugs*. 2010 August; 8, 2267–2300.
7. Bilbao MF, Peña Y, Gutierrez M, Cabrera MA, Ducongé J, Linares G, et al. Análisis inferencial de las potencialidades de promoción de absorción de una familia de 1-O-alquil gliceroles. *Revista Cubana de Farmacia*. 2009; 43,1-9.
8. Torres C, Vázquez L, Señoráns J, Reglero G. Study of the analysis of alkoxyglycerols and other non-polar lipids by liquid chromatography coupled with evaporative light scattering detector. *Journal of Chromatography A*. 2005 December; 1078, 28-34.
9. Torres A, Del Toro G, Valdés Y, León J, Merchán F. Efecto in vitro de los 1-O-alquilgliceroles sintéticos en la falciformación y en la hemólisis de los eritrocitos SS. *Bioquímica*. 2005 October; 30, 101-109.
10. Anadón A, Martínez M, Ares I, Ramos E, Señoráns F, Reglero G, et al. Acute and repeated dose (28 Days) oral safety studies of an alkoxyglycerol extract from shark

- liver oil in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010 December; 58, 2040-2046.
11. Martínez Y, Vanegas G, Reina E, Mayorga H, Arévalo-Ferro C, Ramos F, et al. Antibiofilm activity of compounds from two *Eunicea* soft corals collected at the Colombian Caribbean Sea. *Biofouling*. 2014 [en preparación].
 12. Hallgren B, Niklasson A, Stållberg G, Thorin H. On the occurrence of 1-O-(2-methoxyalkyl) glycerols and 1-O-phynatanylglycerol in marine animals. *Acta Chemica Scandinavica B*. 1974; 28, 1035-1040.
 13. Clarke A. Lipid composition of two species of serolis (crustacea, isopoda) from antarctica. *British Antarctic Survey*. 1984 February; 37-53.
 14. Mori M, Hikichi S, Kamiya H, Hashimoto Y. Three species of teleost fish having diacyl Glyceril Ethers in the muscle as a major lipid. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*. 1972 August; 38, 56-63.
 15. Hallgren B, Niklasson A, Stållberg G, Thorin H. On the occurrence of 1-O-alkylglycerols and 1-O-(2-methoxyalkyl) glycerols in human colostrum, human milk, cow's milk, sheep's milk, human red blood marrow, red cells, blood plasma and uterine carcinoma. *Acta Chemica Scandinavica B*. 1974; 28, 1029-1034.
 16. Jayasinghe C, Gotoh N, Wada S. Variation in lipid classes and fatty acid composition of salmon shark (*Lamna ditropis*) liver with season and gender. *Comparative Biochemistry and Physiology B*. 2003 November; 134, 287-295.
 17. Snyder F, Wood R. The occurrence and metabolism of alkyl and alk-1-enyl ethers of glycerol in transplantable rat and mouse tumors. *Cancer Research*. 1968 May; 28, 972-978.
 18. Watson A. Lipidomics: a global approach to lipid analysis in biological systems. *Journal of Lipid Research*. 2006 August; 47, 2101-2111.
 19. Torres C, Vázquez L, Señoráns J, Reglero G. An efficient methodology for the preparation of alkoxyglycerols rich in conjugated linoleic Acid and Eicosapentaenoic

- Acid. *Journal American Oil Society*. 2007 October; 84, 443-448.
20. Deniau A, Mosset P, Pédrone F, Mitre R, Le Bot D, Legrand A. Multiple beneficial health effects of natural alkylglycerols from shark liver oil. *Marine Drugs*. 2010 July; 8, 2175-2184.
 21. Mitre R, Etienne M, Martinais S, Salmon H, Allaume P, Legrand P, et al. Humoral defence improvement and haematopoiesis stimulation in sows and offspring by oral supply of shark-liver oil to mothers during gestation and lactation. *British Journal of Nutrition*. 2005 June; 94, 753–762.
 22. Sotomayor H, Ibrahím M, Brito V, García J, León J, Merchán F, et al. Citotoxicidad de 1-O-decilglicerol y 1-O-dodecilglicerol sintéticos sobre carcinoma humano de mama MCF-7. *Acta Farmaceutica Bonaerense*. 2006 February; 25, 339-343.
 23. Firshein R. The nutraceutical revolution New York: Edaf ; 1998.
 24. Acevedo R, Gil D, Del Campo J, Bracho G, Valdés Y, Pérez O. The adjuvant potential of synthetic alkylglycerols. *Vaccine*. 2006 February; 24, 32-33.
 25. Legrand A, inventor; 1-O-alkil-gliceroles de uso farmacéutico o veterinario para conservar y/o mejorar el esperma. España patent 1-O-alkil-gliceroles de uso farmacéutico o veterinario para conservar y/o mejorar el esperma nº 2 221 057. 2004 December.
 26. Ved H, Gustow E, Mahadevans V, Pieringer R. Dodecylglycerol a new type of antibacterial agent which stimulates autolysin activity in streptococcus faecium ATCC 9790. *Journal Biological Chemistry*. 1984 March; 259, 8115-8121.

2. Síntesis y purificación de alquilglicerolípidos

Resumen

Los alquilglicerolípidos AQG, son una clase de lípidos naturales, encontrados principalmente en organismos marinos, los cuales han sido objeto de mucha atención debido a sus múltiples actividades. En previos aislamientos cromatográficos se han detectado mezclas sencillas de AQG de octocorales del género *Eunicea* del mar Caribe y se evidenció su nuevo potencial frente al *biofouling*. Sin embargo, la purificación desde las fuentes naturales es compleja y no se obtienen cantidades con las que se puedan realizar posteriores estudios. Por esta razón, se efectuó la síntesis de los mismos, con el fin de evaluar su comportamiento frente a bacterias, así como su potencial comportamiento frente al *quorum sensing* (IQS). La síntesis se logró a partir del precursor quirál (*R*)-solketal, para asegurar un producto con la estereoquímica presente en los naturales, realizando una alquilación con un bromuro de alquilo de cadena deseada, en medio básico y catalizador de transferencia como el TBAB, seguida de hidrólisis con ácido *p*-TsOH, para obtener el 1-*O*-dodeciliglicerol (C12:0), 1-*O*-tetradeciliglicerol (C14:0) y 1-*O*-hexadeciliglicerol (C16:0). Mientras que para la obtención de 1-*O*-octadeciliglicerol (C18:0), se partió del respectivo éster del ácido, realizando una reducción con el Red-Al, una vez obtenido el alcohol, se continuó con una mesilación con MsCl y finalmente el mesilato se hizo reaccionar con el (*R*)-solketal. Empleando técnicas de purificación como la cristalización y técnicas de análisis como la cromatografía en capa fina (CCF) y espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN), se logró corroborar la obtención de los AQG con los datos de la literatura. La síntesis de estos AQG contribuye al conocimiento sobre su estructura-actividad y al estudio de nuevas posibilidades de actividad biológica, como la inhibición del desarrollo bacteriano e inhibición del *quorum sensing*.

2.1 Introducción

Los 1-O-alkil-*sn*-gliceroles AQQ, exhiben múltiples actividades biológicas, por lo que son considerados compuestos con gran potencial terapéutico, propiedades que se relacionan con la cadena alquílica de su estructura **(1)**. La configuración absoluta evaluada de los AQQ naturales ha sido definida como *S*, y estos se caracterizan por tener una ramificación en la posición *sn*-1 del esqueleto del glicerol, esta cadena alcoxílica por lo general proviene de diferentes ácidos grasos y puede ser saturada, monoinsaturada o poliinsaturada **(2)**. En los AQQ el esqueleto del glicerol puede o no estar esterificado (MEAG, DEAG). Los AQQ monoéteres tienen los hidroxilos del glicerol sin esterificar y sus cadenas hidrocarbonadas más representativas surgen de los ácidos carboxílicos de igual secuencia hidrocarbonada, como palmítico (C16:0), esteárico (C18:0) y oleico (C18:1), siendo comúnmente conocidos como alcohol chimílico, batílico y selaquílico respectivamente **(3)**.

La demostración de los efectos a nivel biológico de los AQQ, incrementó el interés por esta clase de lípidos de estructura diversa, reconociendo no solo su distribución en la naturaleza, sino también la biosíntesis y motivando su síntesis química. Los pasos biosintéticos implicados en la formación de los éteres lipídicos se han establecido y estudiado principalmente en las células de mamíferos y además varios estudios han propuesto la síntesis para obtenerlos en racematos, e incluso enantioméricamente puros **(1, 2, 3, 4, 5)**.

Con la síntesis de AQQ, se contribuyó a la elucidación de sus estructuras y su estereoquímica. La primera síntesis de AQQ fue realizada por *Davies et al.*, quien produjo racematos de los alcoholes chimílico y batílico por la vía de éteres alílicos, por calentamiento de cloruro de alquilo, con alilóxido de sodio en una solución de alcohol alílico, seguida de oxidación del doble enlace con peróxido de hidrógeno y ácido acético glacial. En posteriores trabajos se logró sintetizar los alcoholes batílico, chimílico y selaquílico, enantioméricamente puros usando un precursor quiral, el (*S*)-1,2-O-isopropiliden-*sn*-glicerol, obtenido del D-manitol o el precursor quiral (*R*)-1,2-O-isopropiliden-*sn*-glicerol preparado a partir de L-arabinosa y mediante un posterior reflujo con una sal sódica del haluro de alquilo correspondiente. Conociendo la estereoquímica

predeterminada con la rotación óptica de los compuestos sintetizados y comparando con los datos experimentales, se determinó la configuración absoluta *S* de los AQG que se encuentran en la naturaleza. De esta manera se asignaron como el alcohol (*S*)-chimílico y el alcohol (*S*)-batílico y sus respectivos enantiómeros sintéticos. También se ha logrado la síntesis de AQG usando en lugar de los haluros, los *p*-toluensulfonatos del alcohol insaturado, para hacer un intermediario más reactivo y sin afectar los dobles enlaces, obteniendo rendimientos de los enantiómeros *S* y *R* del alcohol selaquílico de 80 y 76% respectivamente (**4, 5**). Igualmente se ha logrado la síntesis de estos compuestos a partir de los metanosulfonatos de alcoholes, de cadenas largas, saturados e insaturados en una reacción de sustitución con 1,2-*O*-isopropiliden-*sn*-glicerol mediante dos métodos, uno utilizando potasio metálico en benceno absoluto, y el otro utilizando hidróxido de potasio en xileno, y finalmente por hidrólisis ácida con HCl 10% en metanol (**6**). Una de las alternativas con mayor eficacia para preparar los alcoholes batílico, chimílico y selaquílico, enantioméricamente puros, fue desarrollado por *Magnusson et al.*. En esta reacción el (*R*)-2,3-*O*-isopropiliden-*sn*-glicerol también conocido como (*R*)-solketal, se hace reaccionar con los correspondientes bromuros para conectar las cadenas estearilo, palmitoilo y oleilo, en cantidades estequiométricas en la posición *sn*-1, en presencia de hidróxido de potasio (KOH) y una cantidad catalítica de bromuro de tetra-*n*-butilamonio (TBAB) bajo condiciones libres de disolvente y entre 35° a 40 °C durante un periodo de 24 horas. Posteriormente el acetónido que se forma se desprotege por una leve hidrólisis ácida, con solución de THF/agua en presencia de ácido *p*-TsOH y mediante purificación por cristalización con *n*-hexano, se obtienen los respectivos AQG (**2, 3, 4**).

Siguiendo la última metodología en este trabajo se sintetizaron los AQG de cadena saturada y de diferentes longitudes C12:0, C14:0, C16:0 y C18:0. Para la obtención de los primeros tres se usaron los respectivos bromuros de 12, 14 y 16 carbonos, con el reactivo quiral, mientras que para el AQG saturado de 18 carbonos se partió del estearato de metilo, realizando la reducción, mesilación y finalmente condensación con el (*R*)-solketal.

2.2 Materiales y métodos

Los solventes empleados fueron R.A, de Merck, destilados y secados antes de ser usados. Los reactivos utilizados fueron: (*R*)-2,3-*O*-isopropiliden-*sn*-glicerol (Alpha Aesar),

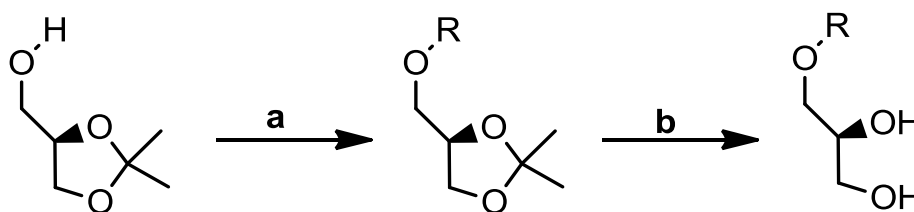
1-bromododecano, 1-bromotetradecano y 1-bromohexadecano (Alpha Aesar), bromuro de tetra-*n*-butilamonio (Alpha Aesar), hidruro de bis(2-metoxietoxi)aluminio de sodio, 70% p/p en tolueno (Alpha Aesar), éster metílico del ácido esteárico (Sigma), cloruro de metanosulfonilo (Merck) y ácido *p*-TsOH monohidratado (Merck).

Para cromatografía en capa delgada (CCD) se utilizaron cromatofolios de gel de sílice 60 F₂₅₄ de Merck, y revelador de sulfato cérico amónico en ácido sulfúrico con calentamiento. Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) de protón (¹H) y carbono (¹³C) fueron registrados en un equipo Bruker Avance de 400 MHz y en un Bruker Avance de 300 MHz usando cloroformo deuterado (CDCl₃) al 99.5% de Merck, los desplazamientos químicos (δ) se expresan en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento (*J*) en hertz (Hz).

2.3 Síntesis de Alquilgliceroles

La obtención de los diferentes AQG **1**, **2** y **3**, se realizó a partir del reactivo quiral (*R*)-2,3-*O*-isopropiliden-*sn*-glicerol o (*R*)-solketal **5** y los halogenuros de alquilo de cadena deseada. La reacción involucra dos pasos generales, como se presenta en el esquema 2.1.

Esquema 2.1 Reacción general de síntesis de AQG: reactivos y condiciones (**3**)



(a) (*R*)-solketal, KOH, *n*-Bu₄NBr, R-Br, 35-40 °C, 15 h;

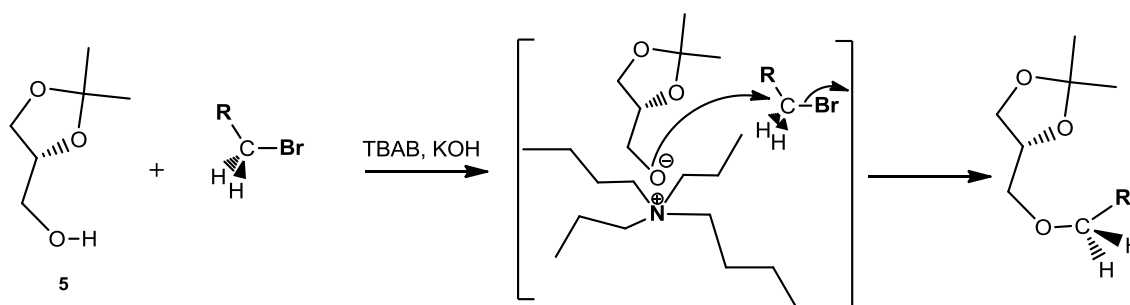
(b) *p*-TsOH, THF/agua (15:5), reflujo, 15 h

Inicialmente se realiza una mezcla entre el (*R*)-solketal y el bromuro de alquilo, en ausencia de un disolvente y en medio básico usando KOH, en presencia de un catalizador de transferencia de fase, el bromuro de tetra-*n*-butilamonio (TBAB), a una temperatura entre 30° - 40 °C, con agitación constante durante un periodo de 15 h. El

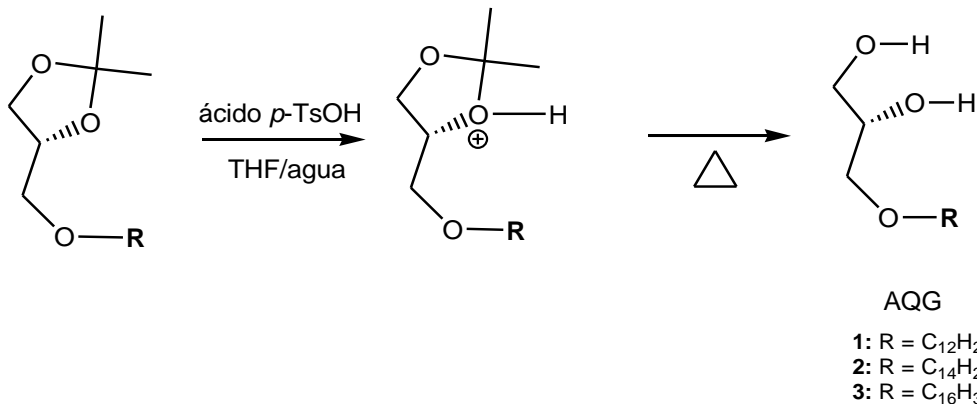
intermediario 1-O-alkil-2,3-O-isopropiliden-*sn*-glicerol (acetónido alquilado) normalmente no se purifica **(3)**.

El (*R*)-solketal, levemente ácido, puede perder su protón ácido en presencia de la base KOH, y el catalizador de transferencia de fase que permite la orientación y comunicación de las diferentes especies involucradas en la síntesis, primordialmente entre el alcóxido generado con el halogenuro de alquilo primario, e incluso entre el éter obtenido y los subproductos H₂O y KBr. En el esquema 2.2 se presenta el primer paso de reacción **(2)**.

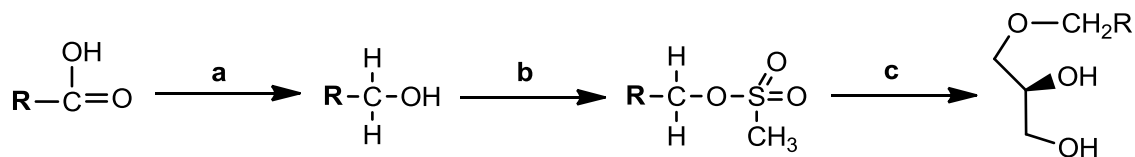
Esquema 2.2 Paso 1: alquilación del reactivo quiral **(2)**



Posteriormente se realiza una hidrólisis ácida leve (esquema 2.3), en la cual el acetónido del alcóxido alquilado, se hace reaccionar con ácido *p*-TsOH en una mezcla de THF/agua, dando paso a su apertura, esta reacción se deja en refluxo durante toda la noche, una vez finaliza la reacción, el producto obtenido se purifica por cristalización con hexano. Se observa el transcurso de la reacción y se verifica la pureza del producto por CCD.

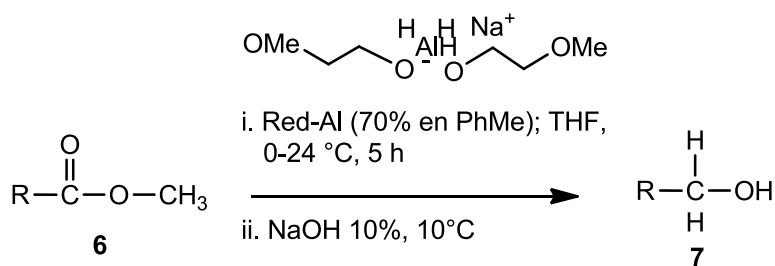
Esquema 2.3 Paso 2: hidrólisis ácida con *p*-TsOH (THF/agua)

Cuando se parte del éster del ácido graso o del mismo ácido graso de cadena deseada, es necesaria una serie de reacciones, para la formación del AQG. En el esquema 2.4, se presenta un esquema general de las reacciones a seguir.

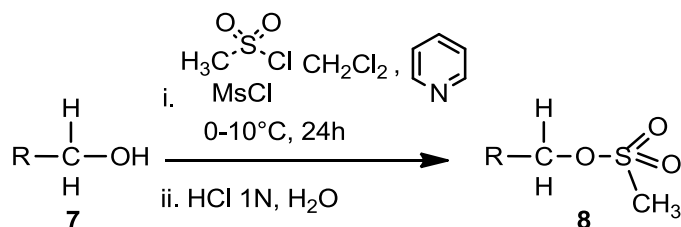
Esquema 2.4 Secuencia de reacciones para obtención de AQG a partir del ácido graso o el éster

(a) reducción con Red-Al (b) mesilación con MsCl (c) reacción con (*R*)-solketal

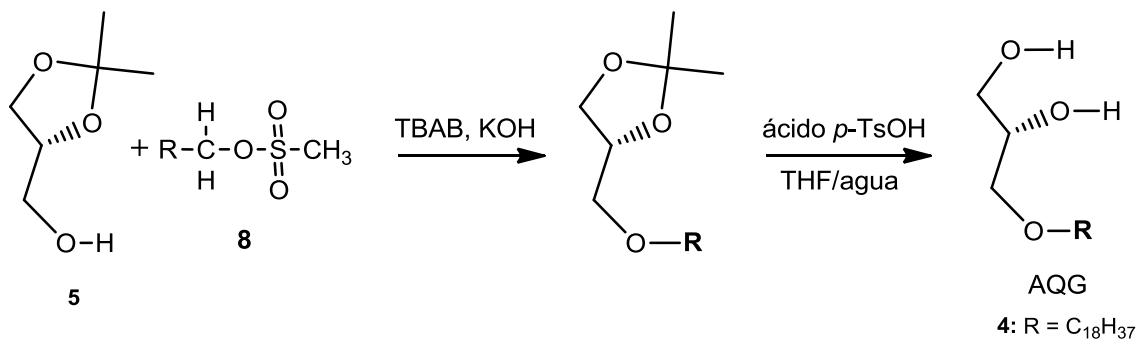
De esta manera, partiendo del éster metílico del ácido esteárico **6**, como se muestra en el esquema 2.5, se realizó una reducción usando el Red-Al, para obtener un alcohol primario **7**. Para ello en un baño de hielo, entre 0 a 15 °C, a una disolución del éster en THF, se le adicionó gota a gota el Red-Al y la mezcla se dejó con agitación constante por 5 h a 24 °C. La reacción seguida por CCD se detuvo adicionando solución de NaOH 10%, se generan dos fases, se descartó la fase acuosa, mientras que la fase orgánica fue secada y concentrada en rotaevaporador a vacío (**7**, **8**).

Esquema 2.5 Reacción general de reducción: reactivos y condiciones

Posteriormente se realizó una mesilación usando cloruro de metanosulfonilo (MsCl) (esquema 2.6), para lo cual se preparó una disolución en un baño de hielo de 0 a 10 °C, del alcohol **7**, en DCM con la presencia de piridina en condiciones anhidras, y luego se le adiciona el MsCl. La reacción se continuó por 24 h con agitación constante y a temperatura ambiente. Una vez realizada, se detuvo lavando con agua destilada, se extrajo con HCl 1N, y luego de otro lavado con agua, y separación, se secó la fase orgánica con sulfato de sodio anhidro (NaSO₄) y finalmente. Se concentró el mesilato en rotaevaporador (**9, 10**).

Esquema 2.6 Reacción general de mesilación: reactivos y condiciones

Finalmente la última reacción se da entre el reactivo quiral (*R*)-solketal **5** y el producto obtenido de la mesilación **8**, esquema 2.7, para la formación del AQG **4**, de cadena de 18 carbonos. Para esta reacción se tienen en cuenta las condiciones y se emplean los reactivos indicados en la literatura (**11, 12**).

Esquema 2.7 Reacción de obtención de AQG 4 con reactivo quiral

2.3.1 Obtención y elucidación por RMN de 1, 2, 3 y 4

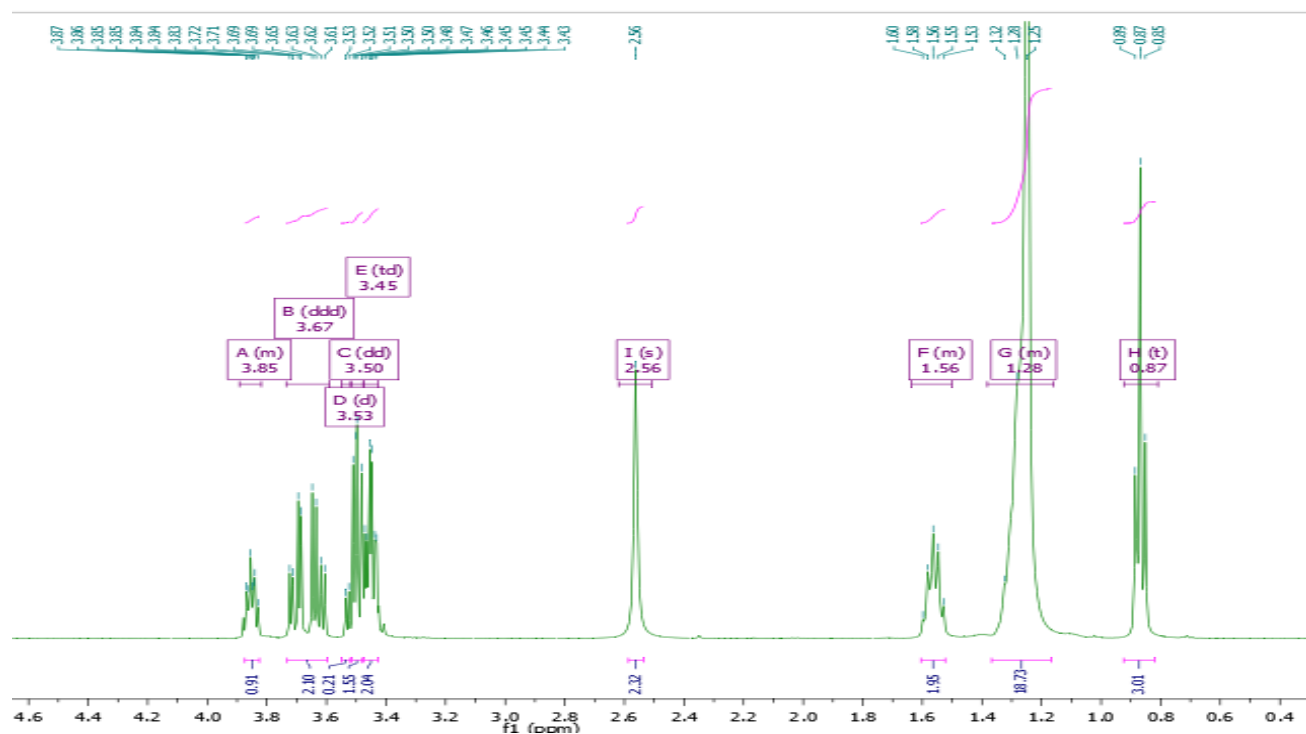
Se sintetizaron los alquilglicerolípidos saturados de cadenas alquílicas de C(12:0), C(14:0), C(16:0) y C(18:0), el (S)-1-O-dodecil-*sn*-glicerol **1**, (S)-1-O-tetradecil-*sn*-glicerol **2**, (S)-1-O-Hexadecil-*sn*-glicerol **3**, (S)-1-O-Octadecil-*sn*-glicerol **4**, siguiendo la metodología anteriormente descrita. Los datos espectroscópicos de RMN mostrados a continuación para cada AQG fueron comparados con los publicados en la literatura.

Síntesis de (S)-1-O-dodecil-*sn*-glicerol **1**, se realizó una solución de (*R*) solketal (600 mg, 4.54 mmoles), 1-bromododecano (1131.54 mg, 4.54 mmoles), bromuro de tetra-*n*-butilamonio (292.65 mg, 0.91 mmol) e hidróxido de potasio (318.81 mg, 5.683 mmoles), la mezcla se colocó en termocupla, con agitación constante, por 15 h a una temperatura de 40 °C, en un baño de aceite. Posteriormente se lavó con 2 ml de agua, con 2,5 ml de éter etílico y se lavó nuevamente con 2 ml de agua (por 3 veces), se separaron las fases, hasta comprobar con papel indicador, que la fase acuosa fuera neutra. La fase orgánica se colocó en rotavaporador, para eliminar el disolvente (éter etílico) y lo obtenido se disolvió en 6.93 ml de THF:H₂O (15:5) junto con ácido *p*-toluensulfónico (55.44 mg) y la solución se dejó en reflujo *overnight*. Se extrajo con 1,5 ml con cloroformo por tres veces, se lavó con agua y se secó con sulfato de sodio anhidro, y posteriormente se colocó al vacío para eliminar el disolvente, de esta manera se obtuvo un sólido blanco, que se cristalizó con *n*-hexano, compuesto **1** sólido blanco cristalino brillante; ¹H RMN (¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 3.89 – 3.82 (m, 1H, H₂), 3.67 (ddd, *J* = 16.8, 11.4, 4.6 Hz, 2H, H₃), 3.53 (br.d, *J* = 4.0 Hz, 1H, H_{1a}), 3.50 (dd, *J* = 6.2, 5.1 Hz, 1H, H_{1b}), 3.45 (td, *J* = 6.7, 2.5 Hz, 2H, H_{1'}), 2.56 (s, 2H, 2x CH₂OH), 1.64 – 1.50 (m, 2H, H_{2'}), 1.38 – 1.16 (m, 18H, CH₂ x 9), 0.87 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H, H_{12'}) ppm. ¹³C RMN (CDCl₃) δ 72.44 (OCH₂CH₂, C_{1'}), 71.84

(CHCH₂O, C1), 70.48 (CH₂CHCH₂, C2), 64.24 (CH₂OH, C3), 31.90 (C2'), 29.63, 29.60, 29.58, 29.56, 29.43, 29.32(-CH₂ x 7, C4'-C10'), 26.05 (C3'), 22.66 (C11') 14.08 (CH₃, C12') ppm (figura 2.8).

El mismo procedimiento descrito anteriormente para el compuesto **1**, se siguió usando (*R*) solketal (400 mg, 3.03 mmoles), 1-bromotetradecano (839.05 mg, 3.03 mmoles), bromuro de tetra-*n*-butilamonio (195.09 mg, 0.605 mmol) e hidróxido de potasio (325.04 mg, 7.58 mmoles), y ácido *p*-toluensulfónico (36.96 mg), finalmente se obtuvo un sólido blanco, el cual se cristalizó con *n*-hexano, compuesto **2** sólido blanco; ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 3.85 (br. dd, *J* = 9.4, 4.1 Hz, 1 H, CH₂CHCH₂,H2), 3.67 (ddd, *J* = 16.7, 11.4, 4.5 Hz, 2H, CH₂OH, H3), 3.54 (br.d, *J* = 4.0 Hz, 1H, CHCH₂O,H1a), 3.50 (dd, *J* = 6.6, 5.1 Hz, 1H, CHCH₂O,H1b), 3.47 – 3.43 (m, 2H, OCH₂CH₂,H1'), 2.82 (s, 1H, CHO), 2.42 (s, 1H, CH₂OH), 1.62 – 1.50 (q, *J* = 6.8, 2H, OCH₂CH₂, H2'), 1.25 (s, 22H, CH₂ x 11), 0.87 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H, H14') ppm. ¹³C RMN (CDCl₃) δ 72.46 (OCH₂CH₂, C1'), 71.84 (CHCH₂O, C1), 70.43 (CH₂CHCH₂, C2), 64.24 (CH₂OH,C3), 31.90 (C2'), 29.67, 29.65, 29.64, 29.59, 29.56, 29.55, 29.43, 29.34, 29.13(-CH₂ x 9, C4'-C12'), 26.05 (C3'), 22.67(C13'), 14.10 (CH₃,C14') ppm (ver anexo B).

Figura 2.1 Espectros de RMN ¹H y ¹³C para **1**
(a) RMN de ¹H de **1**



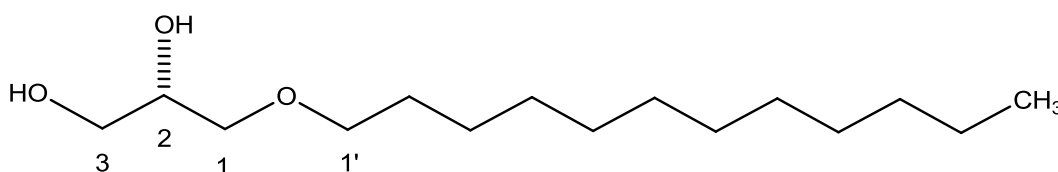
vacío para obtener un sólido, con el cual posteriormente se hace una disolución en DCM (seco), piridina (364.99 μ l, 4.53 mmol) y cloruro de mesilo (352 μ l, 4.53 mmol), que se coloca por 24 h a temperatura ambiente, luego se lava con agua y HCl 1N, por tres veces, se separa la fase orgánica a la que se le elimina el disolvente al vacío para obtener un sólido, el cual se mezcla con (*R*) solketal (385 mg, 2.92 mmoles), bromuro de tetra-*n*-butilamonio (188,26 mg, 0.584 mmol), hidróxido de potasio (410.15 mg, 7.31 mmoles), y ácido *p*-toluensulfónico (35.67 mg), se cristaliza con *n*-hexano y se obtiene compuesto **4** sólido amorfo levemente coloreado (pálido); $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 3.91 – 3.82 (m, 1H, H2), 3.75 – 3.68 (m, 1H, H3a), 3.63 (ddd, $J = 12.3, 7.7, 4.3$ Hz, 1H, H3b), 3.56 (br. dd, $J = 10.5, 5.9$ Hz, 1H, H1a), 3.51 (dd, $J = 6.9, 5.0$ Hz, 1H, H1b), 3.45 (ddd, $J = 6.8, 6.0, 2.6$ Hz, 2H, H1'), 2.34 (s, 1H, CHOH), 2.11 (s, 1H, CHOH), 1.55 (br.dt, $J = 13.3, 6.8$ Hz, 2H, H2'), 1.24 (br.s, 30H, $\text{CH}_2 \times 15$), 0.87 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H, H18') ppm. APT RMN y $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ 72.55 (OCH_2CH_2 , C1'), 71.86 (CHCH_2O , C1), 70.42 (CH_2CHCH_2 , C2), 64.22 (CH_2OH , C3), 31.92 (C2', C16'), 29.70, 29.66, 29.61, 29.59, 29.45, 29.44, 29.36 ($-\text{CH}_2 \times 12$, C4'-C15'), 26.08 (C3'), 22.69 (C17'), 14.12 (CH_3 , C18') ppm (ver anexo D).

2.4 Resultados y discusión

Del compuesto **1** (figura 2.2 y 2.3), en este primer ensayo de síntesis se obtuvieron 560 mg con un porcentaje de rendimiento de 49.68 %, de un producto sólido blanco cristalino. Usando la técnica de recristalización con *n*-hexano se logró la formación de dichos cristales, y mediante CCD, se pudo corroborar que no tenían impurezas. El análisis por RMN ^1H muestra un total de 9 señales diferentes de hidrógeno. Se puede destacar la señal de los 3 hidrógenos del metilo terminal (δ 0.87, t), de los hidrógenos de 2 metilenos (δ 3.50, dd; δ 3.53, d; δ 3.67, ddd) junto con la del hidrógeno del único metino también del glicerol, (δ 3.89 – 3.82, m), igualmente se pueden evidenciar las señales de los hidrógenos de dos hidroxilos (δ 2.56 s) e incluso los 18 hidrógenos de metilenos y otros asignados como H2' y H1', todos de la misma cadena alifática. Por otra parte en el espectro de ^{13}C se ven diferentes tipos de carbonos, un metilo (δ 14.08), las señales de los metilenos, que incluyen el oximetileno alcoílico (δ 72.44), otros distintivos del C2', C3' y C11' (δ 31.90, 26.05 y 22.66) y los demás en la misma cadena alifática δ 29-13–29.67). Además el oximetileno (δ 71.84), el hidroximetileno (δ 64.24) y el hidroximetino (δ 70.48) del residuo de glicerol. Las señales del espectro de $^1\text{H RMN}$ y el de $^{13}\text{C RMN}$ se

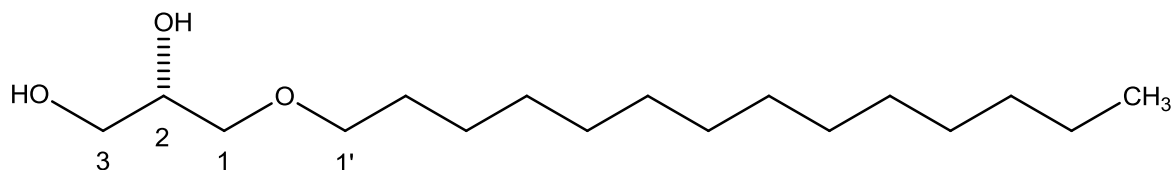
podieron compararse con las de los AQQ sintetizados en este estudio, **3** y **4**, que han sido bien referenciadas en la literatura, guardando gran similitud excepto por la integral, los cambios mínimos en desplazamiento químico y constantes de acoplamiento que respaldan la identidad estructural propia de este compuesto **1**. La síntesis realizada a partir de los reactivos específicos, incluyendo el quiral, en conjunto con el análisis anterior permitió identificar al compuesto **1** como el AQQ conocido y de origen natural (S)-1-O-dodecil-*sn*-glicerol.

Figura 2.2 Estructura del compuesto **1**



Del compuesto **2**, (figura 2.3), se obtuvo 384.5 mg en un sólido blanco, y al compararlo con el compuesto **1** se observó en menor aspecto cristalino. Sin embargo, este ensayo condujo a un rendimiento del 51.06 %, y de la misma forma con CCD, se verificó la gran pureza del producto, posterior a la cristalización. Mediante el análisis por RMN de ^1H y ^{13}C fue posible realizar la comparación de desplazamientos y multiplicidades, notando la gran similitud con los que presentó el compuesto **1**. El análisis de datos de RMN ^1H , RMN ^{13}C , y la comparación con los publicados en la literatura para los compuestos **3** y **4** permitió identificar a esta estructura como el conocido (S)-1-O-tetradecanoil-*sn*-glicerol, previamente sintetizado y de origen natural (**1**).

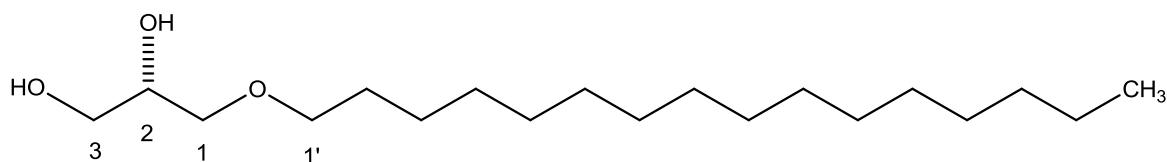
Figura 2.3 Estructura del compuesto **2**



Para el compuesto **3** (figura 2.4), utilizando una secuencia similar de síntesis se obtuvieron 307 mg, con un porcentaje de rendimiento del 27.17 %, y el sólido resultante,

tenía coloración blanca un poco traslucida, y apariencia blanda al compararlo con el compuesto **2**. Por CCD se comprobó que no contenía impurezas. Además reveló con el mismo R_f y aspecto de este compuesto en una mezcla de origen marino enriquecida en el AQQ 18:0 y en menor proporción en el AQQ 16:0, detectada en el presente estudio por HPLC-ESI en relación 1.6:0.4, y usada como referencia natural (**13**). Los espectros de RMN que se obtuvieron de este compuesto se compararon con los de los otros AQQ sintetizados, encontrándose gran semejanza entre ellos. Las señales de RMN muestran concordancia con los datos publicados por Magnusson *et al.*, 2011 (**3**) del AQQ sintético (S)-1-O-hexadecil-*sn*-glicerol que conserva la configuración absoluta del enantiómero conocido de la naturaleza. Se espera que este AQQ **3** de acuerdo al reactivo quiral utilizado como punto de partida para su síntesis, también haya sido obtenido en alto grado de pureza enantiomérica en el presente estudio.

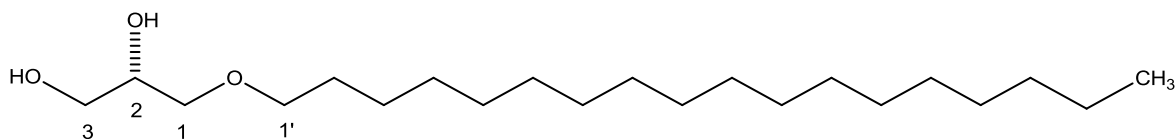
Figura 2.4 Estructura del compuesto **3**



En el caso del compuesto **4** (figura 2.5), se obtuvieron 179.6 mg con el 24.71 % de rendimiento en un aspecto semisólido amorfo, consistencia blanda al compararlo con los anteriores, y coloración amarillo pálido, como una cera. Por CCD frente a la mezcla patrón mostró una mancha de color violeta luego de su revelado con sulfato cerico amónico y R_f = 0.20 idéntico al del AQQ natural (18:0) (**13**). El análisis de RMN ¹H, exhibe las señales típicas asociadas a un monoeter del *sn*-glicerol, con la cadena alcoxílica en la posición *sn*-1, por los protones de los dos hidróxilos a diferente desplazamiento (δ 2.34, s; 2.11, s), además dos metilenos y un metino unidos a átomo de oxígeno, en un sistema de acoplamiento independiente correspondiente al glicerol, debido a dos protones diastereotópicos centrados en 3.56 (br.dd, J = 10.5, 5.9 Hz, 1H, H1a), y 3.51 (dd, J = 6.9, 5.0 Hz, 1H, H1b), unidos a el metino en δ 3.91–3.82 (m, 1H, H2) acoplado a su vez a dos protones también diastereotópicos de un doble doblete en δ 3.63 (ddd, J = 12.3, 7.7, 4.3 Hz, 1H, H3b) y una señal en 3.75 – 3.68 (m, 1H, H3a), demostrando la naturaleza quiral de este compuesto. Así como otros metilenos de la cadena alifática, un oximetileno en δ 3.45 (ddd, J = 6.8, 6.0, 2.6 Hz, 1H 2H, H1'), 1.55

(br.dt, $J = 13.3, 6.8 \text{ Hz}$, 2H, H2'), 1.24 (br.s, 30H, CH₂ x15), y su metilo terminal en δ 0.87 (t, $J = 6.8 \text{ Hz}$, 3H, H18'). Con el APT se pudo verificar las señales de los carbonos, el oximetileno en δ 72.55, de la cadena alifática con su serie de metilenos 31.92 (C2', C16'), 29.70, 29.66, 29.61, 29.59, 29.45, 29.44, 29.36 (-CH₂ x12, C4'-C15'), 26.08 (C3'), 22.69 (C17'), el carbono del metilo en δ 14.12 (CH₃, C18') y finalmente el oximetileno en δ 71.86 (C1), un hidroximetino en 70.42 (C2) y el hidroximetileno 64.22 (C3), del residuo de glicerol. Los datos de RMN fueron consistentes con los reportados para el compuesto natural previamente aislado del octocoral blando *Eunicea* sp. **(13)**, con los datos del mismo enantiómero sintético (S)-1-O-octadecil-*sn*-glicerol reportado por Magnusson *et al.*, 2011 **(3)**, y en concordancia con el asignamiento realizado de este AQG aislado de la esponja *Desmapsamma anchora* por Quijano *et al.*, 1994 **(14)** y por Han *et al.*, 2005 del octocoral *Dendronephthya gigantea* **(15)**.

Figura 2.5 Estructura del compuesto 4



Con el análisis de los datos espectroscópicos, se confirmó la obtención de los 4 compuestos AQG, exhibiendo similitudes propias en las correspondientes señales de la parte del glicerol, como se presenta en la tabla 2.1, y pequeñas diferencias debidas a la longitud de cadena, lo que nos indicó que mediante la metodología de reacciones se logró la formación esperada del enlace éter, con la unión de la cadena alifática correspondiente para cada compuesto y la apertura del reactivo quiral. También que la secuencia de reacciones, partiendo del éster metílico, tuvo lugar, generando como producto esperado el AQG con cadena de 18 carbonos. Un cambio en el aspecto de los compuestos sintetizados fue evidenciado gradualmente con el aumento del tamaño de la cadena alifática, el AQG (12:0) mostro una verdadera cristalización, mientras este último AQG (18:0) solido con una apariencia más grasosa requirió mayor cuidado para su purificación por cristalización.

Tabla 2.1 Desplazamientos de señales diagnóstico en RMN ^{13}C del esqueleto del glicerol

No. Carbono	δ ppm alquilgliceroles sintetizados			
	1	2	3	4
1-- CHCH_2O	71.84	71.84	71.82	71.86
2-- CH_2CHCH_2	70.48	70.43	70.50	70.42
3-- CH_2OH	64.24	64.24	64.22	64.23
1'-- OCH_2CH_2	72.44	72.46	72.41	72.55

Es posible indicar, que las señales de estos espectros, siguen un patrón muy similar de desplazamiento químico, lo que es concordante con lo observado en otros trabajos con esta serie de compuestos, por lo que los datos se acompañan en esos estudios con los de espectrometría de masas para la determinación de la fórmula en cada caso, y usualmente incluyendo los más representativos como el alcohol químico C(16:0), alcohol batílico C(18:0), y otros saturados menos reportados. Por lo anterior hasta el momento se ha confiado en el presente trabajo para el diagnóstico estructural de los AQG obtenidos a partir de cadenas alquílicas de longitud definida y específica, las cuales ofrecen conocida resistencia al cambio durante la síntesis (**1, 2, 4**) y aún están pendiente para estos AQG los experimentos de masa correspondientes y experimentos sensibles a la quiralidad como la rotación óptica.

Para los cuatro compuestos se realizaron los experimentos de CLAE-MS/ESI, en un equipo Shimadzu LCMS-2010, acoplado a espectrómetro de masas (MS) con interfaz de ionización por electroespray (ESI) en el modo positivo. Los compuestos fueron disueltos en una mezcla de solventes $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{agua}/\text{acetato de amonio}$ (0.5:9:0.5:0,004 v/v/v/v) a una concentración de 1 mg/ml, se empleó una columna RP-18 (50 x 4.6 mm i.d. x 5 μm , Shimadzu) y se eluyeron con mezcla de solventes y gradiente de elución A:B, de 1:9 a 0:10 (A=agua-acetato de amonio, B=MeOH-acetato de amonio).

Los resultados proporcionados por el análisis CLAE-MS/ESI, para el compuesto **1** (anexo E), presenta los iones $[\text{M}+\text{Na}]^+$ y $[\text{M}+\text{H}]^+$ de m/z 283.05 y m/z 261.05 respectivamente, los cuales concuerdan con una masa molecular $M=260.04$ uma, que corresponde al dodeciliglicerol AQG-C12. Así mismo como se presenta para el compuesto **2**, en el anexo

F, los iones $[M+Na]^+$ de m/z 311.10 y $[M+H]^+$ de m/z 289.10, son concordantes con la masa molecular $M=288.27$ uma del tetradecilglicerol AQG-C14. Por su parte los datos del espectro correspondiente al compuesto **3** (anexo G) son consistentes con la masa molecular $M=316.30$ uma propio del hexadecilglicerol AQG-C16, presentando un ion $[M+Na]^+$ de m/z 339.15 y un $[M+H]^+$ de m/z 317.20. Finalmente en el espectro del compuesto **4** (anexo H), son notables los iones $[M+Na]^+$ y $[M+H]^+$ de m/z 367.25 y m/z 345.25 respectivamente, los cuales están de acuerdo con una masa molecular $M=344.33$ uma, que corresponde al octadecilglicerol AQG-C18.

2.5 Conclusiones

Siguiendo una metodología de síntesis asimétrica, de acuerdo al análisis de los espectros y mediante comparación de datos con los presentes en la literatura, fue posible obtener los alquilglicerolípidos saturados con diferentes longitudes de cadena alquílica.

Los compuestos sintetizados fueron identificados como (S)-1-O-dodecanoil-*sn*-glicerol **1** (12:0), (S)-1-O-tetradecanoil-*sn*-glicerol **2** (14:0), (S)-1-O-hexadecanoil-*sn*-glicerol **3** (16:0), y (S)-1-O-octadecanoil-*sn*-glicerol **4** (18:0), los cuales conservan la estructura de aquellos hallados en varias fuentes naturales.

Mediante la CCD y el análisis de RMN, se pudo evidenciar que aunque el rendimiento no fue óptimo durante la síntesis de estos AQG, la cristalización resultó ser un método práctico para su purificación, al poderlos obtener en muy buen grado de pureza.

Los experimentos de CLAE-MS/ESI, contribuyeron en la caracterización estructural de los AQG sintetizados, encontrando gran concordancia, entre los datos proporcionados por los espectros, con las masas moleculares correspondiente a cada uno de compuestos.

Bibliografía

1. Deniau A, Mosset P, Pédrone F, Mitre R, Le Bot D, Legrand A. Multiple beneficial health effects of natural alkylglycerols from shark liver oil. *Marine Drugs*. 2010 July; 8, 2175-2184.
2. Magnusson C, Haraldsson G. Synthesis of enantiomerically pure (*Z*)-(2'*R*)-1-*O*-(2'methoxyhexadec-4'-enyl)-*sn*-glycerol present in the liver oil of cartilaginous fish. *Tetrahedron: Asymmetry*. 2010 October; 21, 2841-2847.
3. Magnusson C, Gudmundsdottir A, Haraldsson G. Chemoenzymatic synthesis of a focused library of enantiopure structured 1-*O*-alkyl-2,3-diacyl-*sn*-glycerol type ether lipids. *Tetrahedron*. 2011 January; 67, 1821-1836.
4. Magnusson C, Haraldsson G. Ether lipids, Review. *Chemistry and physics of lipids*. 2011 May; 164, 315-340.
5. Baer E, Fischer H. Studies on acetone-gliceraldehyde and optically active glycerides: IX. configuration of the natural batyl, chimil and selachyl alcohols. *The Journal of Biological Chemistry*. 1941 May; 140, 397-410.
6. Baumann W, Mangold H. Reactions of aliphatic metanesulfonates synthesis of long-chain glyceril-(1) ethers. 1964 May; 29, 3055-3057.
7. Magano J, Dunetz J. Large-Scale carbonyl reductions in the pharmaceutical industry [Review]. *Organic Process Research & Development*. 2012 December, 1156-1184.
8. Penha R, Pegnyemb D, Mosset P. Synthesis of (*Z*)-(2'*R*)-1-*O*-(2'-methoxynonadec-10'-enyl)-*sn*-glycerol, a new analog of bioactive ether lipids. *Tetrahedron*. 2012 February; 68, 2973-2983.
9. Vastra J, Saint-Jalmes L. Catalytic mesylation of alcohols: a highly productive process for trifluoroethyl mesylate. *Organic Process Research & Development*. 2006 June; 194-197.

10. Seebach D, Beck A, Breitschuh R, Job K. Direct degradation of the biopolymer poly[(*R*)-3-hydroxybutyric acid] to (*R*)-3-hydroxybutanoic acid and its methyl ester. *Organic Syntheses*. 1992; 71, 39-47.
11. Appendino G, Ligresti A, Minassi A, Daddario N, Bisogno T, Di Marzo V. Homologues and isomers of noladin ether, a putative novel endocannabinoid: interaction with Rat Cannabinoid CB1 Receptors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2003 October; 13, 43-46.
12. Davies G, Heilbron I, Owens W. CCCXXXVI.—The unsaponifiable matter from the oils of Elasmobranch fish. Part VII. The synthesis of α -glyceryl ethers and its bearing on the structure of Batyl, Selachyl, and Chimyl Alcohols. *Journal of Chemical Society*. 1930 January; 2542-2546.
13. Martínez Y, Vanegas G, Reina E, Mayorga H, Arévalo C, Ramos F, Castellanos L, Duque C. Anti-*biofilm* activity of compounds from two *Eunicea* soft corals collected at the Colombian Caribbean Sea. *Biofouling*. 2014; [en preparación]
14. Quijano L, Cruz F, Navarrete I, Gómez P. Alkyl glycerol monoethers in the marine sponge *Desmapsamma anchorata*. *Lipids*. 1994; 29, 731-734
15. Han A, Song J, Jang D, Min H, Lee S, Seo E. Cytotoxic constituents of the octocoral *dendronephthya gigantea*. *Archives of Pharmacal Research*. 2005 October; 28, 290-293.

3. Actividad antifouling de los alquilglicerolípidos sintetizados

Resumen

La utilidad de los alquilglicerolípidos, va desde la estimulación de las defensas inmunológicas, actúan como inhibidores de tumores, modulan estados inflamatorios, hasta poseer efectos bacteriostáticos, anti-virales y anti-hongos. Los reportes presentan al AQQ-C12 con actividad antibacteriana contra *Streptococcus faecium* y con efecto fungicida contra especies de *Candida* y *Criptococcus*; también hay reportes del AQQ-C18 levemente activo como inhibidor de bacterias marinas tales como *Pseudoalteromonas piscida* y *Vibrio alginolyticus*, además una mezcla de AQQ, aislada de un octocoral, evidenció su potencial al ser sometida a ensayos contra el *biofouling*. Así en este trabajo se evaluaron los AQQ sintetizados, con cadenas alifáticas de diferentes longitudes, C-12, C-14, C-16 y C-18 para determinar sus efectos frente a diferentes bacterias, de interés clínico y farmacológico, varias de las cuales no han sido ensayadas antes con AQQ; además, para determinar la capacidad antifouling, se evaluaron como inhibidores del *quorum sensing* (IQS). Se realizaron dos tipos de ensayos típicamente cualitativos, el ensayo antibacterial incluyendo la determinación de concentración inhibitoria mínima (CIM), en placas de 96 pozos, con 14 cepas bacterianas, reconocidas como patógenas y productoras de *fouling*, colocando el activo del compuesto en concentraciones desde 1 hasta 512 µg/ml, y los respectivos controles. Para el ensayo de actividad IQS se siguió la metodología de halos de inhibición, utilizando sensidiscos y el biosensor *Chromobacterium violaceum* (cepa ATCC 31532), que se sembró en agar LB, las concentraciones ensayadas para cada uno de los compuestos fueron 10, 20 y 30 µg/disco y como control positivo se usó *p*-hidroxibenzaldehído. Los AQQ dodeciliglicerol y tetradeciliglicerol, fueron los más activos y por su origen natural y baja toxicidad, podrían mezclarse en formulaciones útiles en el control integral del *fouling*.

3.1 Introducción

Las bacterias son microorganismos que han mostrado poseer una capacidad metabólica incluso superior a la de los macro organismos, pueden encontrarse y sobrevivir en diferentes superficies tales como: en los entornos ambientales médicos, en las placas dentales, el interior de las tuberías la superficie de los barcos, en purificadores de agua, entre otras, generando así efectos patogénicos, resistencia a los agentes antimicrobianos, a las tecnologías antifouling y a tratamientos físicos de limpieza **(1, 2, 3)**.

Esto lo logran porque pueden asentarse sobre un sustrato, pre-acondicionar la superficie, para su supervivencia y continuar un evento consecutivo conocido como *fouling* **(4)**. El *fouling* es un fenómeno natural que se da como un proceso de colonización de una superficie sólida en un medio acuoso **(5)**, en el cual organismos crecen adheridos a dicha superficie, que puede ser tanto orgánica como inorgánica. Por ejemplo, las bacterias que se adhieren a superficies de estructuras expuestas al agua, forman capas complejas que pueden causar daños a las mismas o enfermedades, como por ejemplo, en la salud oral. La formación de dichas capas, se conoce como *biofouling*, su formación comprende un proceso secuencial que ha sido ampliamente estudiado con el fin de implementar medidas de control que ayuden a disminuir el impacto que causa, pues a pesar de que el *fouling* responde a un mecanismo necesario para el desarrollo de los organismos, afecta la salud humana, los grandes sistemas industriales que se instalan en el océano y ocasiona consecuencias de tipo económico desfavorables, por ejemplo pérdidas para el transporte marítimo **(4, 6)**, plataformas petroleras, tuberías y muelles, debido a que la adhesión de organismos marinos causa problemas de corrosión sobre las superficies, reduce la durabilidad y aumenta los costos por mantenimiento y exceso de consumo de combustible en el caso de los buques **(7)**.

El *fouling* es un ecosistema altamente dinámico y una vez establecido, es extremadamente difícil de erradicar **(8)**. Este recubrimiento ocurre mediante un proceso secuencial en una serie de fases que se sobrelapan en el tiempo, dicho proceso inicia con un acondicionamiento bioquímico, donde se da la adsorción de compuestos químicos sobre una superficie, lo que conduce a una posterior colonización de microorganismos,

como la colonización bacteriana en ambientes orales o implantes médicos. Mientras que en ambientes marinos, posterior a la colonización bacteriana, se da la colonización de eucariotes multicelulares y macro-organismos. En términos de tiempo, se estima que tras la inmersión de una superficie en el agua marina, ésta se recubre en horas de una capa de organismos unicelulares y en cuestión de meses queda recubierta de macro organismos del lecho marino; en el caso de las bacterias, el proceso favorece a su acercamiento a la superficie y posteriormente a su adhesión **(5, 9)**. Con la adhesión se da paso a una de las primeras etapas del *fouling*: la formación de películas o biopelículas bacterianas, conocidas también como *biofilm*.

La formación de la biopelícula se establece como parte de los procesos que se pueden presentar en el mecanismo conocido como *quorum sensing* (QS), interpretado dentro del *fouling*, el QS está involucrado en el proceso de colonización y en el desarrollo de las especies colonizadoras. mediando el proceso del asentamiento, dándose entonces, procesos de comunicación entre la comunidad bacteriana, mediante la producción de moléculas señales, las cuales son secretadas al ambiente. Éste mecanismo de comunicación, les permite reconocer el momento en el que se alcanza el umbral o la densidad de población, con el fin de desarrollar nuevas funciones, de comportamiento social, simbiótico y de permanente reconocimiento **(10, 11, 12, 13)**.

El QS es entonces, el mecanismo por el cual diversos microorganismos pueden controlar procesos específicos en respuesta a la densidad de población **(14)**. Permite a una célula individual, percibir el número de bacterias (densidad celular) que tiene a su alrededor por la detección de la acumulación de moléculas señalizadoras y reacción de dichas moléculas, lo que es suficiente para que se inicie la expresión de genes específicos, implicando un cambio en su comportamiento, con el propósito de que la población pueda cooperar para explotar el ambiente **(11, 15)**.

Este fenómeno también se conoce como comunicación célula-célula o autoinducción para la regulación y/o sincronización de cambios en la expresión genética como por ejemplo la producción de antibióticos, toxinas, pigmentos o como se mencionaba, para la formación de biopelículas en el que las comunidades de células son guiadas a la adhesión sobre una superficie y sobre sí mismas, proceso facilitado por los polímeros secretados o exopolisacáridos (EPS). Curiosamente, después de alcanzar una alta

densidad celular, algunas especies bacterianas activan la secreción de polímeros, mientras que otras la inhiben **(10, 16, 17)**. Existen dos grandes grupos de señalización por QS: la intraespecífica y la interespecífica. Dentro de las sustancias señalizadoras específicas en las bacterias Gram negativas predominan las acilhomoserín lactonas (AHL) y en las Gram positivas este mecanismo es mayormente mediado por pequeños péptidos **(18)**.

El QS les confiere un cambio fisiológico y/o morfológico, permitiéndoles coordinar actividades y actuar de forma grupal **(19, 20)** y además se relaciona con algunos problemas para la salud humana como la expresión de los factores de virulencia de bacterias infecciosas oportunistas en algunas enfermedades crónicas. También, se ha descrito cómo las biopelículas bacterianas son responsables, en gran medida, de la resistencia de algunas bacterias patógenas frente a los antibióticos y los sistemas de defensa del organismo, dado que cuando ellas están inmersas en las biopelículas difícilmente son atacadas por los antibióticos o las células del sistema inmune **(19, 21)**.

Por lo general los organismos marinos y acuáticos viven en entornos donde puede ocurrir una contaminación biológica considerable, para tal caso, la selección natural otorgó una ventaja evolutiva para los organismos capaces de controlar la formación de biopelículas **(14)**. Así el QS puede o no inducir asentamiento y metamorfosis en muchas especies **(22)**. En la actualidad se han identificado a las biopelículas como el enfoque investigativo para la prevención del *fouling*, pues se espera que si se impide su formación, mediante la inhibición de *quorum sensing*, el proceso del *fouling* posterior, causado por macro-organismos puede ser controlado o al menos retardado **(4)**.

Es por tal motivo, que a nivel mundial se están desarrollando nuevas investigaciones que buscan identificar sustancias activas a la IQS **(19)**, con posibles aplicaciones en tecnologías antifoulant y drogas antipatogénicas **(4, 23)**, y teniendo en cuenta que, en el marco de las actividades consideradas como antifouling están aquellas reconocidas, como anti-incrustante, anti-biopelículas, antibiótica, anti-fúngica, inhibición del crecimiento o prevención de la acumulación de macro-organismos.

Además de la inhibición del QS, como una primera aproximación para evaluar la potencialidad de extractos y compuestos como agentes antifouling se realizan ensayos

de actividad antimicrobiana **(6)**, que dan la posibilidad de determinar la capacidad de las sustancias, en el control del asentamiento o en el desarrollo bacteriano, generado por bacterias formadoras del *fouling*. Gran variedad de compuestos se conocen y son empleados como *antifoulants* marinos, por ejemplo entre los más efectivos, están los basados en tributil estaño, no obstante, exhiben alta toxicidad, siendo entonces agentes no selectivos, y en consecuencia matan o dañan toda clase de organismos marinos que entren en contacto con ellos **(24)**, razón por la cual se ha optado por la búsqueda de compuestos amigables con el medio ambiente, de acuerdo a esto y viendo la capacidad y efectividad de ciertos organismos marinos tales como octocorales, algas y esponjas de defenderse contra predadores, competidores y potenciales patógenos, se han aislado de los mismos, compuestos con propiedades antimicrobianas, *antifouling*, de disuasión de la depredación por otras especies y alelopáticas **(24)**.

Por ejemplo de algunos lípidos, en particular de los ácidos grasos y sus ésteres se conoce de su actividad antibacteriana, sin embargo se sabe relativamente poco teniendo en cuenta la diversidad en la naturaleza y de cómo es que a concentraciones bajas estos pueden ejercer su acción biológica **(25, 26)**. De los AQG, la literatura presenta únicamente al dodeciliglicerol como un compuesto antibacterial efectivo, con una CIM de 4 $\mu\text{g/ml}$ contra *Streptococcus faecium* ATCC 9790, además, estimuló su actividad autolítica. De acuerdo a los resultados se mencionó que dicha estimulación de la actividad autolítica y la inhibición de crecimiento para la bacteria, responden al empleo de diferentes concentraciones de dodeciliglicerol y que esa estrecha relación implica que la estimulación de la actividad autolítica podría ser un primer, pero no necesariamente el único, mecanismo por el cual el dodeciliglicerol ejerce su actividad antibacteriana **(25)**. Posteriores estudios demostraron también, que uno de los posibles modos de acción antibacteriano del dodeciliglicerol, era mediado por una proteinasa **(27)**. Por su parte el octadeciliglicerol, aislado de *Subergorgia suberosa*, mostró actividad antibacterial leve contra *Pseudoalteromonas piscida*, *Ruegeria* sp, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio furnissii* y *Vibrio harveyi* **(24)**.

Con todo lo anterior se ha demostrado tanto propiedades antibacteriales como *antifouling* de extractos y compuestos de origen marino, detectadas mediante diferentes tipos de bioensayos. Razón por la cual, también con los compuestos sintetizados, se realizaron ensayos para determinar su capacidad antibacterial incluyendo ensayos de CIM y

ensayos de IQS con el fin de correlacionar la estructura-actividad y abordar estudios enfocados en determinar las posibilidades de la acción antifouling de los AQG. Actividad prácticamente inexplorada para esta clase de compuestos naturales, hallados primordialmente en los organismos marinos.

3.2 Materiales y métodos

Los ensayos microbiológicos de CIM, se realizaron en las instalaciones del laboratorio de investigaciones y asesorías en microbiología del Departamento de Farmacia bajo la dirección del profesor Edelberto Silva Gómez, quien también aportó las 14 cepas (aislados clínicos), empleadas para este ensayo, las cuales se reactivaron y se sembraron por agotamiento en agar Mueller Hinton (MH) (Merk). En los ensayos por difusión en agar, se utilizó agar antibiótico No. 1 (Merk) y dimetil formamida (DMF) como vehículo de disolución de los compuestos. Para la medición de la densidad óptica (DO), se empleó un espectrofotómetro Spectronic® 20 Genesys™.

Para los ensayos de actividad IQS se usó medio Luria Bertani (LB), tanto en caldo, como en agar, el reactivo 4-hidroxibenzaldehído (Merk) como control positivo y DCM debidamente secado y destilado, y el biosensor *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532, otorgado por el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional (IBUN). Todos los medios e instrumentos empleados en microbiología fueron esterilizados con vapor de agua en una autoclave AllAmerican 75X de 32 L a 20 psi y 220°C durante 30 min.

3.2.1 Cepas bacterianas

Las 14 cepas (aislados clínicos), empleadas para realizar el ensayo de CIM fueron: *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus brevis*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter agglomerans*, *Klebsiella oxytoca*, *Acinobacter baumannii*, *Proteus mirabilis* y *Micrococcus luteus*, mientras que para el ensayo de susceptibilidad por difusión en agar se empleó esta última y *Bacillus subtilis*, y para el ensayo de actividad de IQS se usó el biosensor *Chromobacterium Violaceum*, cepa ATCC 31532.

3.2.2 Cultivo y medios de cultivos

- Para el ensayo de difusión en agar se empleó:

Agar antibiótico No. 1 (Merk)

- Para la reactivación de las cepas y el ensayo de CIM se empleó:

Agar Mueller Hinton (MH), (cantidad para 1 litro): infusión de carne 300.00 g, peptona ácida de caseína 17.50 g, almidón 1.50 g y agar 15.00 g. Se adicionaron 25 ml en cajas de Petri, donde se sembró por agotamiento cada una de las cepas.

Caldo Mueller Hinton (MH) (cantidad para 1 litro): infusión de carne 300.00 g, peptona ácida de caseína 17.50 g y almidón 1.50 g. Para la reactivación de las cepas bacteriana se le adicionó 15% de glicerina.

- Para el ensayo por difusión en agar se empleó:

Agar No. 1 para *M. luteus*, (cantidad para 1 litro): peptona 6.00 g, caseína pancreática digestiva 4.00 g, extracto de levadura 3.00 g, extracto de carne 1.50 g, dextrosa 1.00 g y agar 15 g.

- Para la actividad IQS:

Agar Luria Bertani (LB), (cantidad para 1 litro): NaCl 5.00 g, extracto de levadura 5.00 g, triptona 10.00 g y agar 12.00 g. Para sembrar el biosensor *C. violaceum*.

Caldo Luria Bertani (LB), (cantidad para 1 litro): NaCl 5.00 g, extracto de levadura 5.00 g y triptona 10.00 g.

3.2.3 Ensayo por difusión en agar

Para una valoración inicial de los AQQ sintetizados, se realizó el método de difusión en gel o en agar, como su nombre lo indica, se hace la difusión del compuesto a través de una perforación vertical o pozo, que se hace en un agar solidificado en una caja de petri (placa). Para esto entonces inicialmente se prepararon las cajas de petri colocándoles los cilindros de Oxford, para hacer los pozuelos de cada compuesto y un pozuelo para el blanco DMF (**28**), también se preparó una suspensión de *M. luteus* y otra de *B. subtilis* en solución salina isotónica 0.9% p/v y se midió en espectrofotómetro para obtener una concentración de microorganismos de aproximadamente 10^5 UFC/ml. Posteriormente se preparó el medio de cultivo agregando la suspensión bacteriana al agar MH, aún tibio, y

se colocaron 25 ml en las cajas, se esperó que el agar se solidificara y se quitaron los cilindros, para agregar el activo de los compuestos AQG, para lo cual se preparó una disolución 1 mg/ml de cada uno, usando como vehículo DMF. Una vez agregado el activo se dejaron por 30 min y posteriormente se incubaron a 35 °C. Los resultados se vieron a las 24 h.

3.2.4 Concentración inhibitoria mínima (CIM)

Para valorar las propiedades antimicrobianas se determinó la sensibilidad de los compuestos frente a cepas bacterianas, para esto entonces se evaluó la concentración inhibitoria mínima (CIM), con el fin de hallar la cantidad mínima de compuesto capaz de inhibir el crecimiento bacteriano. El ensayo se realizó en placas de 96 pozos con un inóculo estandarizado de diferentes cepas y se prepararon diluciones seriadas en caldo MH para probar cada compuesto **(29, 30)**.

Para el inóculo de las bacterias se preparó una suspensión en caldo MH de las mismas, hasta una turbidez de 0.5 de la escala de McFarland. La turbidez estándar se obtuvo preparando disoluciones de BaCl₂ y H₂SO₄, como se muestra en la tabla 3.1, las cuales se mezclaron para obtener el sulfato de bario (BaSO₄). Luego se verificó la densidad del estándar en espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm, con celda de 1 cm. El cultivo ajustado a la turbidez equivalente al patrón 0.5 de McFarland, para la mayoría de las especies, contiene aproximadamente 10⁸ UFC/ml. El inóculo final requerido para la prueba de dilución en agar es de 10⁴ UFC **(31, 32, 33)**.

Tabla 3.1 Soluciones de McFarland para estándar de inóculo **(33)**

Tubo No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
BaCl ₂ ml	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1
H ₂ SO ₄ ml	9.9	9.8	9.7	9.6	9.5	9.4	9.3	9.2	9.1	9
Densidad celular aprox. (x 10 ⁸)	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30

Posteriormente se adicionó en la placa de 96 pozos, tanto el inóculo como el activo de los compuestos. Este último se preparó a partir de una solución de 1 mg/ml en DMF, posteriormente se adicionó el activo en los pozos y con caldo MH se realizaban las diluciones seriadas en factores de 2, de la siguiente manera 1, 2, 4, 8, 18, 32, 64, 128, 256, 512 µg/ml, se hizo blanco de medio con 200 µl de caldo y un control de crecimiento del inóculo ajustado. Finalmente se adicionó 100 µl del inóculo estándar en los pozos y se incubaron por 18 a 24 h a 37 °C, ver figura 3.1. El ensayo se hizo por triplicado (31, 34).

Figura 3.1 Placas de 96 pozos para CIM

1. *L. innocua*, 2. *E. coli*, 3. *S. aureus*, 4. *S. enteritidis*, 5. *E. faecalis*, 6. *K. pneumoniae*, 7. *B. brevis*, 8. *P. aeruginosa*, 9. *S. marcescens*, 10. *E. agglomerans*, 11. *K. oxytoca*, 12. *A. baumannii*, 13. *P. mirabilis*, 14. *M. luteus*; B = blanco de medio (MH), C = control de crecimiento del inóculo

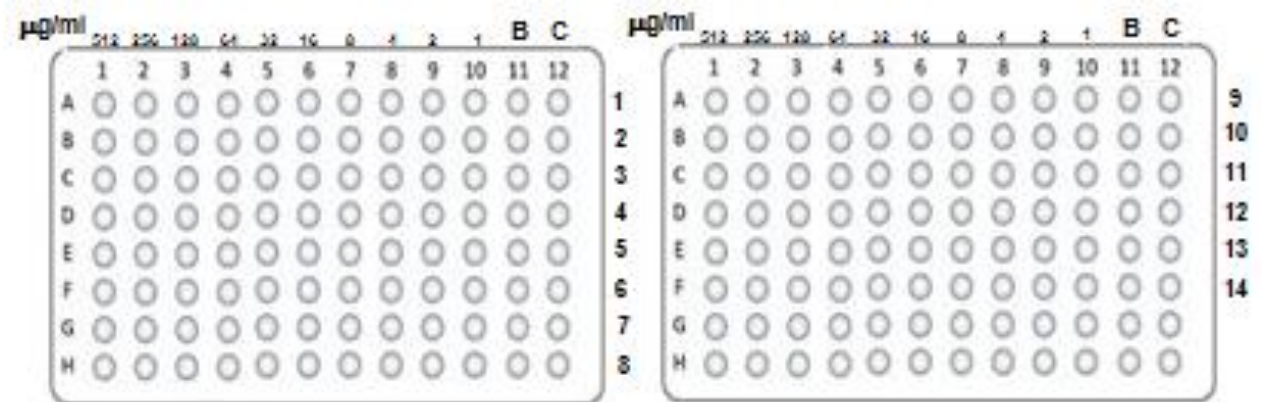
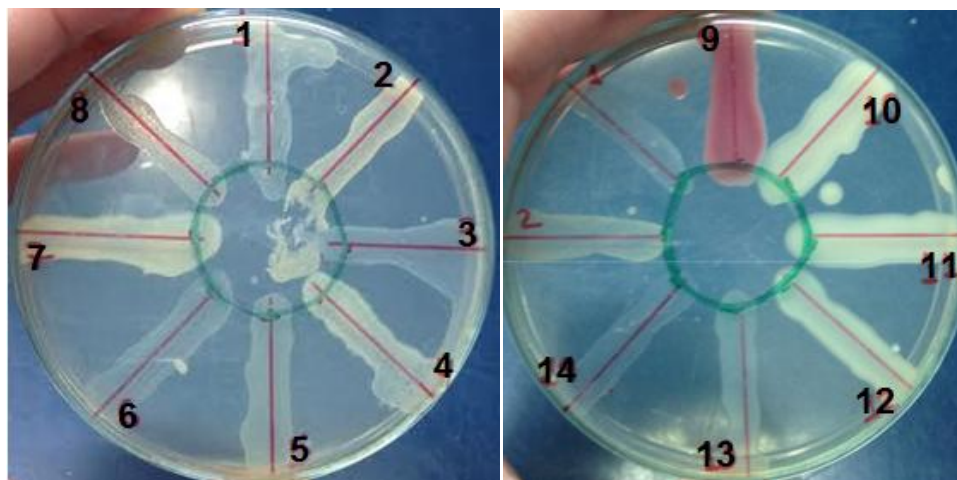


Figura 3.2 Cepas bacterianas empleadas en ensayo CIM

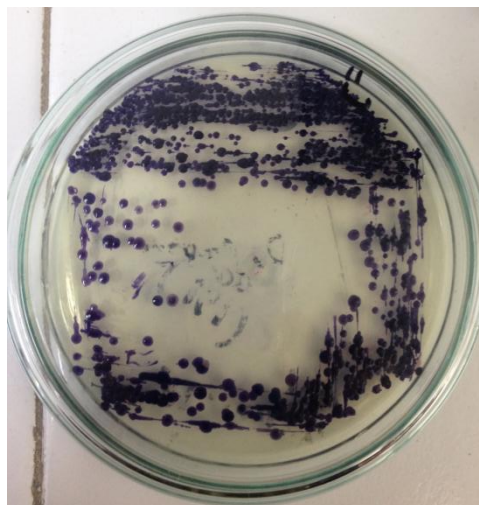


3.2.5 Ensayo de inhibición de *Quórum Sensing* (IQS)

El bioensayo se realizó usando el biosensor *Chromobacterium violaceum*, cepa ATCC 31532, que produce un pigmento morado conocido como violaceína que es un fenotipo controlado por sistemas de QS **(35)**. Para evaluar la actividad biológica se utilizó la metodología de halos de inhibición utilizando sensidiscos estériles de 5 mm de diámetro cargados con diferentes cantidades de los compuestos puros (30, 20, 10 µg por disco) **(14)**.

Fue necesario realizar un procedimiento de crio conservación para el *Chromobacterium violaceum*, en medio LB con 50% de glicerol, en congelador a -80 °C. Posteriormente para el ensayo, impregnando un hisopo con el inóculo crio-conservado se realizó la siembra por agotamiento como se presenta en la figura 3.3, en agar LB, una vez sembrada, se dejó en estufa por 2 h a 27 °C y luego se sacó a temperatura ambiente para otorgarle suficiente oxigenación y creciera el *C. violaceum*, expresando la violaceína. Luego, se tomó con un hisopo una de las colonias más aisladas, con la cual se realizó una suspensión en caldo LB, que se dejó agitando *overnight*. Luego se ajustó y se midió la densidad óptica (DO), para obtener un inóculo con DO cercana a 0.5.

Figura 3.3 Sembrado por agotamiento del *C. violaceum*

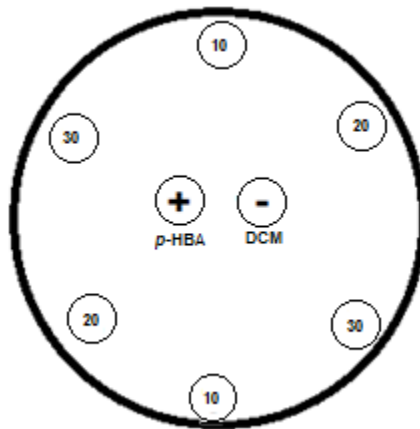


Con el inóculo con DO ajustado, se realizó la siembra del biosensor en agar LB; igualmente se dejó en estufa a 27 °C por 2 h, durante este tiempo se prepararon los

sensidiscos de papel filtro WHATMAN® GF-C de 5 mm de diámetro, previamente esterilizados, impregnándolos con las disoluciones de los AQQ a ensayar a concentraciones de 30, 20, 10 µg por disco, la disolución del control positivo de *p*-hidroxibenzaldehído en MeOH, a una concentración de 200 µg por disco, y el control negativo DCM, solvente donde se diluyeron los AQQ. Luego se colocaron por duplicado los sensidiscos de prueba, ver figura 3.4. Finalmente, las cajas con los sensidiscos se incubaron a 27 °C, y se observaron los resultados a las 24 y 48 h.

Figura 3.4 Placas con sensidiscos para IQS

10 µg/ml, 20 µg/ml, 30 µg/ml, (+) *p*-hidroxibenzaldehído, (-) DCM



El resultado positivo de la inhibición de QS se revela por halos de inhibición en la expresión de la violaceína, sin que se afecte la viabilidad celular en la misma zona de inhibición, midiendo el diámetro del halo de inhibición. Los extractos que causen disminución, o muerte, en el crecimiento bacteriano serán clasificados como bactericidas y no como IQS.

3.3 Resultados y discusión

3.3.1 Ensayo de difusión en agar

Se llevo a cabo el ensayo de difusión en agar, por ser una metodología relativamente sencilla, cuyos resultados son fáciles de interpretar, con el cual se pudo determinar la sensibilidad de las bacterias frente a los AQQ sintetizados, y así tener una aproximación de que tan buenos antimicrobianos son los AQQ sintetizados.

Para *M. luteus*, en agar No. 1 resultó que solo el compuesto **1**, fue el de mayor actividad en la inhibición de la bacteria, pues se observó para este, un gran halo de inhibición. Sin embargo, se pudo notar que la bacteria crecía nuevamente, después de un tiempo. Por su parte los compuestos **2** y **3**, no tuvieron efecto alguno sobre la bacteria, como se muestra en la figura 3.5 (a).

Para *M. luteus*, en agar MH, se vio el halo de inhibición tanto para el compuesto **1** como para el compuesto **2**, siendo el de este último de menor diámetro que el anterior. El compuesto **3**, no dio inhibición, figura 3.5 (b).

Figura 3.5 Ensayo de difusión con *M. luteus* (a) en agar No.1 (b) en agar MH; **1** = Dodecilglicerol AQQ-C12; **2** = Tetradecilglicerol AQQ-C14; **3** = Hexadecilglicerol AQQ-C16; B = Blando de DMF

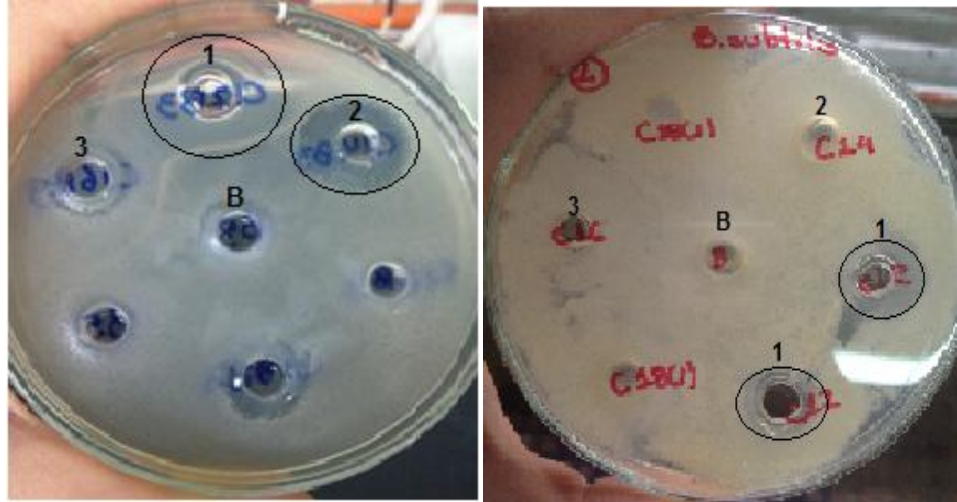


(a)

(b)

Con *B. subtilis*, los resultados fueron muy parecidos a los obtenidos anteriormente, usando agar No. 1, en este, el compuesto **1** y **2**, presentaron halos de inhibición, siendo el del compuesto **1** de mayor diámetro que el del compuesto **2** figura 3.6 (a). En agar MH, solo el compuesto **1** resultó activo dando halos de inhibición pequeños, como se presenta en la figura 3.6 (b).

Figura 3.6 Ensayo de difusión con *B.subtilis* (a) en agar No.1 (b) en agar MH; **1** = Dodeciliglicerol AQQ-C12; **2** = Tetradeciliglicerol AQQ-C14; **3** = Hexadeciliglicerol AQQ-C16; B = Blando de DMF



(a)

(b)

Con el ensayo de difusión en agar, se pudo reconocer que el compuesto **1**, resultó ser el de mayor actividad antimicrobiana, aunque, después de un tiempo es posible percibir como se da nuevamente crecimiento de la bacteria, como se presentó para este compuesto con *M. luteus*. Mientras tanto, para **2** se presentaron pequeños halos de inhibición, demostrando ser menos activo que **1**, y el compuesto **3** resultó no ser activo.

3.3.2 Ensayo de CIM

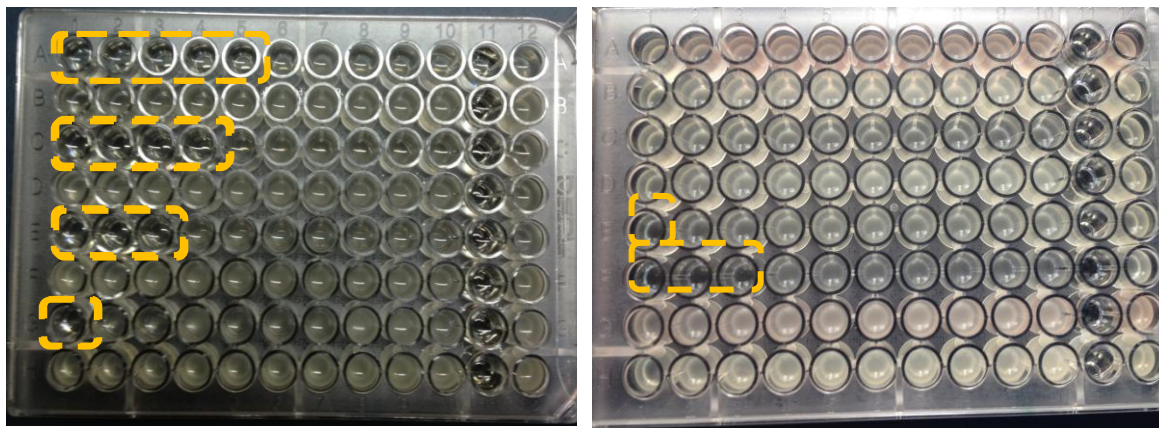
Las placas se examinaron después de incubar por 24 h, para determinar las respuestas de cada uno de los compuestos. Es un ensayo meramente cualitativo, en donde se pudo notar el crecimiento de las bacterias en la columna 12, como control de crecimiento, puesto que se presentó turbidez, como indicativo, a diferencia de la columna 11, del blanco de medio MH, el cual se veía traslucido a la luz, razón por la cual en las imágenes se nota de manera oscuro, debido a la superficie donde se colocó la placa, indicativo de que no hubo ni contaminación ni crecimiento bacteriano.

Tabla 3.2 Resultados de ensayo de CIM para cada uno de los compuestos

Cepa	Compuesto 1		Compuesto 2		Compuesto 3		Compuesto 4
	A	CIM µg/ml	A	CIM µg/ml	A	CIM µg/ml	A
1. <i>L.inocua</i>	SI	32	MC	32	NI	NI	NI
2. <i>E. coli</i>	NI	--	NI	--	NI	NI	NI
3. <i>S. aureus</i>	SI	64	MC	32	NI	NI	NI
4. <i>S. enteritidis</i>	NI	--	NI	--	NI	NI	NI
5. <i>E. faecalis</i>	SI	128	MC	64	NI	NI	NI
6. <i>K. pneumoniae</i>	NI	--	NI	--	NI	NI	NI
7. <i>B. brevis</i>	SI	512	MC	64	NI	NI	NI
8. <i>P. aeruginosa</i>	NI	--	NI	--	NI	NI	NI
9. <i>S. marcescens</i>	NI	--	NI	--	NC	32	NI
10. <i>E. agglomerans</i>	NI	--	NI	--	NI	NI	NI
11. <i>K. oxytoca</i>	NI	--	NI	--	NI	NI	NI
12. <i>A. baumannii</i>	NI	--	NI	--	NI	NI	NI
13. <i>P. mirabilis</i>	SI	512	MC	512	NI	NI	NI
14. <i>M. luteus</i>	SI	128	MC	128	MC	64	NI

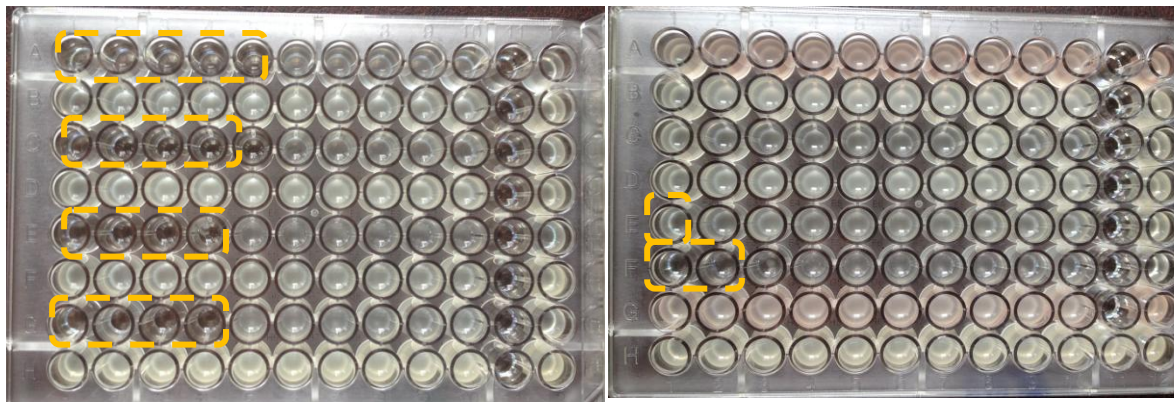
A, corresponde a si el compuesto fue activo, teniendo en cuenta que: **SI** si inhibió el crecimiento, **MC** si minimizó el crecimiento y **NI** si no inhibió el crecimiento. **CIM**, concentración mínima en la cual se dio la respectiva actividad de inhibición o minimización del crecimiento, expresada en µg/ml

Con el compuesto **1**, hubo acción inhibitoria para *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus brevis*, *Proteus mirabilis* y *Micrococcus luteus*, en la tabla 3.2, se presentan las concentraciones a las cuales fueron activos con cada una; por otra parte con *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter agglomerans*, *Klebsiella oxytoca* y *Acinobacter baumannii* no fue activo en ninguna de las concentraciones ensayadas ver figura 3.7.

Figura 3.7 Placa del ensayo CIM del compuesto 1

Datos preliminares de la acción del dodeciliglicerol solo se han reportado para *Staphylococcus aureus*, entre la serie de bacterias que se ensayaron en el presente trabajo, mostrando actividad antibacteriana y de inhibición del crecimiento, con relación a este compuesto en dichos estudios (36), concordando con el resultado obtenido con dicha bacteria con una CIM de 64 µg/ml.

El compuesto 2, actuó frente a *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus brevis*, *Proteus mirabilis* y *Micrococcus luteus*, y no se vio inhibición contra el resto de bacterias probadas. Sin embargo en este caso, a diferencia del dodeciliglicerol, este compuesto, no resultó ser tan potente en la inhibición total del crecimiento bacteriano y lo que se presentó fue una minimización del crecimiento, es decir, a partir de la concentración mínima en la que actuó dicho compuesto, lo que se notó fue que las bacterias no tuvieron el mismo crecimiento que presentaron tanto en el control como en los pozos donde no afectó la concentración del activo, como se presenta en la tabla 3.2. De esta manera se considera que el activo provocó la minimización del crecimiento. La figura 3.8 presenta los resultados en placa de este compuesto.

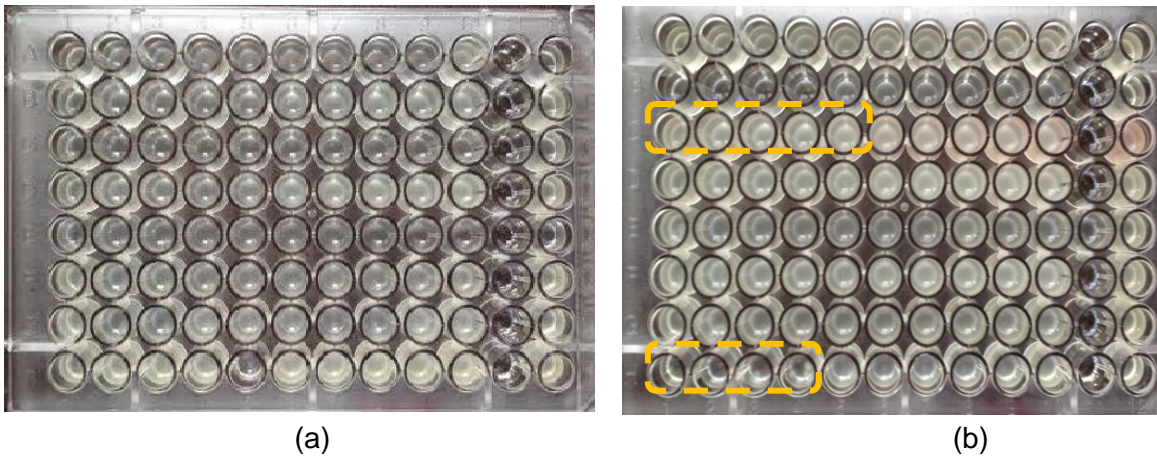
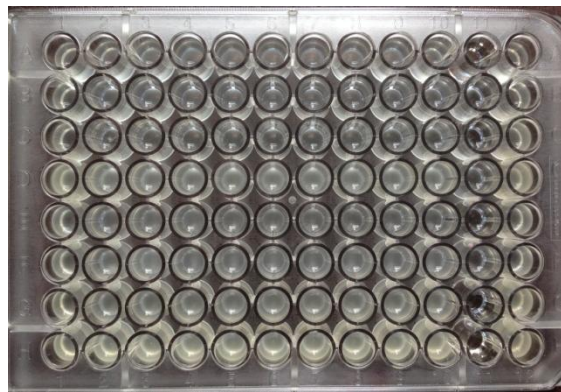
Figura 3.8 Placa del ensayo CIM del compuesto **2**

Es importante destacar que en la literatura no se ha reportado este compuesto como antimicrobiano o su influencia en el crecimiento bacteriano frente a alguna de las cepas usadas en el presente estudio.

Con respecto a los compuestos **3** y **4**, el hexadecilglicerol como se ven en la figura 3.9 (a) y el octedecilglicerol como se presenta en la figura 3.10, resultaron no ser activos en la inhibición del crecimiento de las bacterias ensayadas, puesto que en las placas se pudo observar el crecimiento bacteriano tal como se dio en la columna testigo. Sin embargo, como se muestra en la figura 3.9 (b) para el compuesto **3**, con *S. marcescens*, la coloración rojiza que produce, se minimizó a partir de la concentración de 32 $\mu\text{g/ml}$, igualmente se observó la minimización del crecimiento para *M. luteus* desde la concentración de 64 $\mu\text{g/ml}$.

Figura 3.9 Placa del ensayo CIM compuesto 3

(a) placa con las bacterias de 1 a 8 (b) placa con la bacteria 9 y 14

**Figura 3.10** Placa del ensayo CIM compuesto 4

En esta placa se puede notar que hay turbidez en todos los pozos, excepto en la columna 11, donde se ven oscuros los pozuelos, pues es la columna del blanco de medio MH, la turbidez indicó que el compuesto 4 no fue efectivo en ninguna de las concentraciones frente a las bacterias ensayadas.

Las cepas empleadas en su mayoría, son cepas patogénicas, que causan enfermedades de tipo infeccioso tales como infecciones nosocomiales, intestinales, del tracto urinario, pulmonares, gastroenteritis, neumonía y también cálculos renales, entre otras enfermedades, sobre todo las transmitidas por alimentos. Además son promotoras del *fouling*, pues varios reportes han demostrado la formación de biopelículas por parte de estas. Por ejemplo, para *L. innocua* y *S. aureus* algunos estudios indican la formación

de *biofilms* tridimensionales en condiciones estáticas, en superficies de polipropileno y de acero inoxidable (37), siendo esta última reconocida como altamente productora de biopelículas y de exopolisacáridos (EPS). Igualmente se ha reportado para *E. faecalis* su resistencia a antibióticos, debida a la formación de *biofilm* en superficies de poliestireno (38), también la adherencia y posterior formación de *biofilm* en dispositivos médicos por parte de *E. faecalis*, *S. aureus* y otras como *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *P. mirabilis*, cuyo estado las hace altamente resistentes a los tratamientos antimicrobianos, haciendo necesario, una mejor comprensión del *biofilm*, para el control sobre dispositivos médicos, con el fin de conocer y establecer el vínculo entre la contaminación por biopelículas y la infección de pacientes (39). Estudios realizados con *M. luteus*, presentan su potencial del *fouling*, bajo condiciones de gravedad normal y micro-gravedad, resultando que en condiciones de micro-gravedad la bacteria fue capaz de producir mayores cantidades de EPS; cambios fisiológicos que pueden aumentar la fijación sobre superficies por parte de la misma (40). Del mismo modo se ha reportado sobre *S. marcescens*, que su supervivencia en diferentes entornos, es gracias a su capacidad de colonizar superficies y formar biopelículas, colonización debida a sistemas de QS, para lograr el apego a superficies y la maduración del *biofilm* (41).

Todo lo descrito anteriormente posibilita, avanzar en estudios a nivel de inhibición del *quorum sensing*, e incluso acerca de la influencia de estos compuestos en el desarrollo del *biofilm*, dado que los resultados muestran baja toxicidad de los alquilglicerolípidos sintetizados frente a las diferentes bacterias, ya que su efecto no fue bactericida, sino bacteriostático, en concordancia con la evaluación de la viabilidad bacteriana mediante resiembra en nuevo medio de cultivo, posterior a cada experimento mostrando en todos los casos que cada cepa crece nuevamente, es decir, hubo recuperación de cada especie, luego de cada uno de los ensayos.

3.3.3 Ensayo de actividad IQS

A pesar de que se han reportado diferentes actividades para los compuestos de tipo AQG, aun no se conocen reportes que los presenten como inhibidores del *quorum sensing*. Ensayos preliminares realizados en nuestro laboratorio evidenciaron muy buena inhibición del *biofilm*, por parte de una mezcla de los mismos de origen natural, lo que justificó el abordaje de esta clase de estudios con los compuestos sintetizados para

determinar de manera independiente con cada compuesto, su comportamiento como inhibidores del QS al ser enfrentados al biosensor *C.violaceum*; y así aportar también conocimientos sobre esta clase de lípidos, presentando su potencialidad en una nueva actividad biológica.

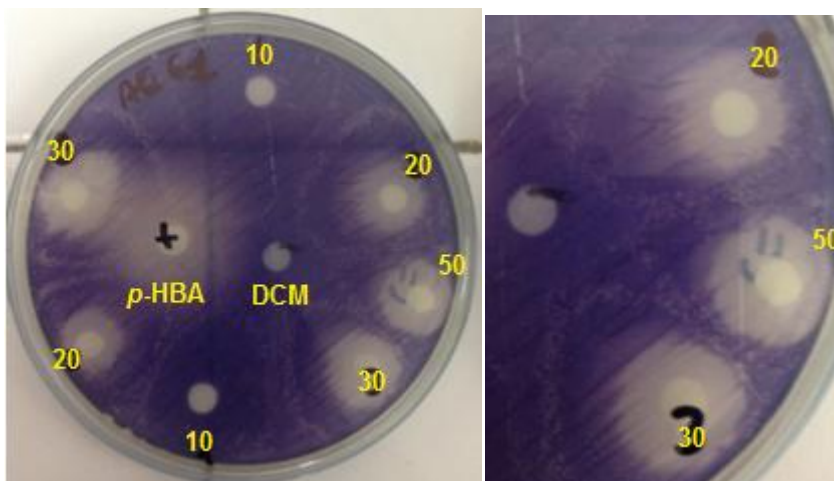
Para el ensayo, se colocaron en 4 cajas diferentes los sensidiscos de 5 mm, por duplicado, impregnados con las correspondientes concentraciones a ensayar, de cada uno de los compuestos, de acuerdo a como se presentó anteriormente en la figura 3.4. En la tabla 3.3 se presentan los resultados de la actividad IQS para los 4 compuestos.

Tabla 3.3 Resultados de la actividad inhibitoria de QS de los compuestos sintetizados

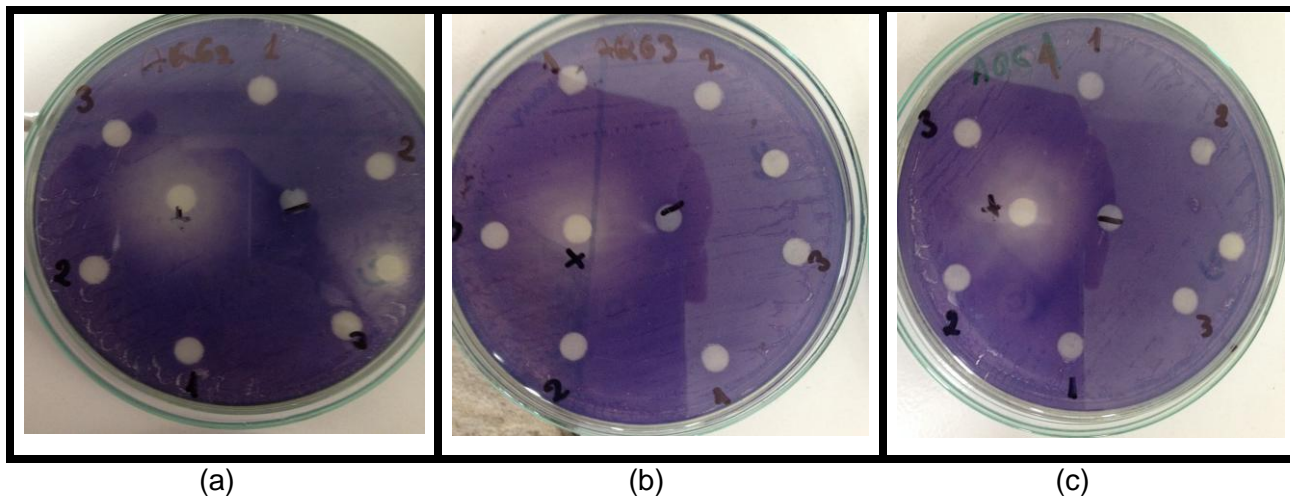
Compuesto	<i>Chromobacterium violaceum</i> ATCC 31532					
	Inhibición de crecimiento			Inhibición de <i>quorum sensing</i>		
	10 µg	20 µg	30 µg	10 µg	20 µg	30 µg
1	NI	NI	NI	NI	SI	SI
2	NI	NI	NI	NI	NI	NI
3	NI	NI	NI	NI	NI	NI
4	NI	NI	NI	NI	NI	NI

NI, para cuando no inhibió ni el crecimiento, ni la expresión de la violaceina mediada por QS; **SI** cuando sí inhibió el crecimiento o el QS.

Los resultados obtenidos presentados en la figura 3.11, mostraron que el compuesto **1** a la concentración de 20 µg y 30 µg, generó efectivamente halos de inhibición, tal como el control positivo *p*-HBA. Se pudo notar que hubo crecimiento del *C. violaceum*, ya que el agar no estaba traslucido a las luz, lo que corroboró que no se dio la expresión de la violaceina, es decir, que se logró inhibir el QS del biosensor. El halo de inhibición del *p*-hidroxibenzaldehído tuvo un diámetro de inhibición de 2 cm, por su parte, para el compuesto **1**, el halo de inhibición de la concentración de 20 µg tuvo un diámetro de 1,4 cm en ambos sensidiscos, mientras que para la concentración de 30 µg el diámetro del halo de inhibición fue de 1,5 cm.

Figura 3.11 Placas del ensayo de IQS para el compuesto 1

Los compuestos 2, 3 y 4 no resultaron activos como inhibidores del *quorum sensing*, en la figura 3.9 se presentan las placas del ensayo, que resultaron con estos 3 compuestos

Figura 3.12 Placas del ensayo IQS (a) compuesto 2 (b) compuesto 3 (c) compuesto 4

El compuesto 1, fue el de mayor actividad tanto en los ensayos antimicrobianos como en el ensayo de actividad IQS, esto da indicio de que su acción va muy de la mano con las concentraciones que se usen del mismo, por ejemplo para el ensayo de difusión en agar se empleó una concentración de 1 mg/ml, con lo que generó halo de inhibición del crecimiento de la bacteria, mientras que para el ensayo de CIM se usaron concentraciones en términos de microgramos, y el rango de concentraciones a la que fue activo con las bacterias, fue variable, es decir que cada bacteria, es sensible a

concentraciones diferentes del compuesto, igualmente sucede con el ensayo de IQS, en donde fueron solo tres concentraciones de las cuales la de 20 y 30 μg resultaron ser buenas en la inhibición del QS, pero no inhiben el crecimiento de las bacterias.

El compuesto **2**, en el ensayo de difusión en agar, dio inhibición de crecimiento a una concentración de 1 mg/ml, mientras que a concentraciones del orden de los μg , tal como se ve en el ensayo de CIM, minimiza el crecimiento. En el ensayo de IQS, a concentraciones bajas no resultó activo, sin embargo se probó un sensidido a una concentración de 50 μg , que generó un pequeño halo de inhibición del QS.

Con respecto a los compuestos **3** y **4**, se puede decir que no resultaron activos, en todos los ensayos, comportamiento que puede deberse a su estructura, posiblemente por poseer cadenas alifáticas más largas, contrario al comportamiento del compuesto **1**, el cual tiene la cadena más corta de la serie de sintetizados.

Los AQQ sintetizados, resultaron ser compuestos bacteriostáticos y no bactericidas, gracias a la baja actividad antimicrobiana que presentaron de acuerdo a los ensayos de difusión en gel.

Los ensayos empleados para determinar actividad antimicrobiana, tanto el de difusión como el de microdilución (CIM), de manera cualitativa, permiten tener una primera aproximación en la evaluación de dicha actividad para los compuestos. Por su parte la CIM fue un método que permitió evaluar la susceptibilidad de cada una de las bacterias ensayadas para cada uno de los compuestos sintetizados. Datos con los cuales fue posible pronosticar los estudios adicionales de actividad IQS

El ensayo de actividad IQS, permitió conocer cuál de los compuesto era responsable de actuar sobre el QS del biosensor empleado, en este caso fue el compuesto **1**, en cierta medida permitió establecer una relación entre la concentración de la sustancia necesaria para inhibir el QS, sin llegar a inhibir el crecimiento de la bacteria, puesto que con una concentración de 30 μg se dio un halo de inhibición mayor, que con la concentración de 20 μg que generó un halo de inhibición de menor diámetro.

3.4 Conclusiones

El compuesto **1**, fue el más efectivo tanto en los ensayos antimicrobianos como en el ensayo de actividad IQS,

Se observó que cada bacteria mostró diferente susceptibilidad para cada compuesto y aun frente al compuesto más activo la susceptibilidad varío considerablemente con el ensayo anti-bacterial.

De manera particular el compuesto **2**, fue poco activo a la inhibición de crecimiento pero a concentraciones micromolares es capaz de minimizar el crecimiento.

Bibliografía

1. Huigens R, Richards J, Ballard T, Zeng W, Deora R, Melander C. Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation with bromoageliferin analogues. *Journal of the American Chemical Society*. 2007 December; 129, 6966-6967.
2. Jadhav S, Shah R, Bhave M, Palombo E. Inhibitory activity of yarrow essential oil on *Listeria* planktonic cells and biofilms. *Food Control*. 2013;p. 125-130.
3. Martínez Y, Vanegas G, Reina E, Mayorga H, Arévalo C, Ramos F, Castellanos L, Duque C. Anti-biofilm activity of compounds from two *Eunicea* soft corals collected at the Colombian Caribbean Sea. *Biofouling*. 2014; [en preparación].
4. Fusetani N. Antifouling marine natural products. *Natural Product Report*. 2011 June; 28, 400-410.
5. Wahl M. Marine epibiosis. I. Fouling and antifouling some basic aspects. *Marine*

- Ecology Progress Series*. 1989 December; 58, 175-189.
6. Mora-Cristancho J, Arévalo C, Ramos F, Tello E, Duque C, Lhullier C, Falkenberg M, Schenkel E. 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*. 2011 June; 66c, 515-526.
 7. Meza M, Calixto D, Velosa L, Acosta E, Puyana M, Morales J, Morales J, Panqueva J.. Valoración de la efectividad antiincrustante de recubrimientos aplicados a embarcaciones que operan en la Bahía de Cartagena. *Ciencia y Tecnología de Buques*. 2007 May; 1, 17-26.
 8. Rao D, Webb J, Kjelleberg S. Competitive interactions in mixed-species biofilms containing the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005 April; 71, 1729-1736.
 9. Dobretsov S, Abed R, Teplitzki M. Mini-review: Inhibition of biofouling by marine microorganisms. *Biofouling*. 2013 February; 29, 423-441.
 10. Caballero A, Reyes R, Puerta L, Ahumado M, Arévalo L, Cabrales R, Herrera A. Biopelículas como expresión del mecanismo de quorum sensing: una revisión. *Avances en periodoncia*. 2011 December; 23, 195-201.
 11. Rojas M. Quorum sensing en la asociación beneficiosa de las bacterias con las plantas. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 2011 November; XIII, 135-143.
 12. Fuqua W, WS. A luxR-luxI type regulatory system activates agrobacterium ti plasmid conjugal transfer in the presence of a plant tumor metabolite. *Journal of bacteriology*. 1994; 2796-2806.
 13. Hentzer M, Riedel k, Rasmussen T, Rasmussen T, Heydorn A, Andersen J, Matthew P, Rice S, Eberl L, Molin S, Hoiby N, Kjellerberg S, Givskov M. Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. *Microbiology*. 2002; 148, 87-102.

14. McLean R, Pierson III L, Fuqua C. A simple screening protocol for the identification of quorum signal antagonists. *Journal of Microbiological Methods*. 2004 April; 58, 351 - 360.
15. Nowak M, Kurnatowski P. Biofilm caused by fungistrukture, fungi-structure, quorum sensing, morphogenetic changes resistance to drugs. *Wiad Parazytol*. 2009;19 - 25.
16. Fuqua C, Parsek M, Greenberg P. Regulation of gene expression by cell to cell communication: acyl homoserine lactone quorum sensing. *Annual Review Genetic*. 2001; 35, 439 - 468.
17. Nadel C, Xavier J, Levin S, Foster K. Plos Biology. [Online].; 2008. Available from: <http://www.plosbiology.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pbio.0060014>.
18. March J, Bentley William. Quorum sensing and bacterial cross-talk in biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*. 2004 September; 15, 495-502
19. Greenberg P. Bacterial communication and group behavior. *The Journal of Clinical Investigation*. 2003 November; 112, 1288-1290.
20. Zhu H, Sun J. Inhibition of bacterial quorum sensing-regulated behaviors by Tremella fuciformis extract. *Current Microbiology*. 2008 May; 57, 418-422.
21. Rasmussen T, Givskov M. Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs. *International Journal of Medical Microbiology*. 2006; 296, 149-161.
22. Craig J, Lewis T, Nichols D, Degnan B. Bacterial induction of settlement and metamorphosis in marine invertebrates. *Int Coral Reef Sym*. 1997; 2, 1219-1224.
23. Dobretsov S, Teplitski M, Paul V. Mini-review: quorum sensing in the marine enviroment and its relationship to biofouling. *Biofouling*. 2009 July; 25, 413-427.
24. Qi S, Zhang S, Yang H, Qian P. Antifouling and antibacterial compounds from the gorgonians Subergorgia suberosa and Scirpearia gracilis. *Natural Product Research*. 2008 January; 22, 154-166.

25. Ved H, Gustow E, Mahadevan V, Pieringer R. Dodecylglycerol. A new type of antibacterial agent which stimulates autolysin activity in *Streptococcus faecium* ATCC 9790. *The Journal of Biological Chemistry*. 1984 March; 259, 8115-8121).
26. Brissette J, Cabacungan E, Pieringer R. Studies on the antibacterial activity of dodecylglycerol. *The Journal of Biological Chemistry*. 1986 October; 261, 6338-6345.
27. Ved H, Gustow E, Pieringer R. The involvement of the proteinase of *Streptococcus faecium* ATCC 9790 in the stimulation of istautolysin activity by dodecylglycerol. *The Journal of Biological Chemistry*. 1984 March; 259, 8122-8124.
28. Ramirez L, Marin D. Metodología para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica*. 2009 August; 42, 263-268.
29. Baker C, Thornsberry C, Hawkinson R. Inoculum Standardization in Antimicrobial Susceptibility Testing: Evaluation of Overnight Agar Cultures and the Rapid Inoculum Standardization System. *Journal of clinical microbiology*. 1983 November; 17, 450 - 457.
30. Guillem P. Tecnicas microbiológicas. In Guillem P. *Microbiología clínica*. Buenos aires: Médica Panamericana; 2005. p. 17 - 29.
31. Malbrán C. Manual de procedimientos para la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos en bacteria aisladas de humanos. Buenos Aires (Argentina); 2001.
32. Prat S. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar. Chile; 2004.
33. Lorian V, editor. Testing antibiotics in agar media. In *Antibiotic in laboratory medicine*. Baltimore : Williams and Wilkins Company; 1980. p. 7-8.
34. Parija S. Antimicrobial Agents: Therapy and Resistance. In Parija S. *Textbook of Microbiology & Immunology*. Haryana (India): Elsevier; 2009. p. 64 - 74.
35. Hayhoe E, Palombo E. Screening for Antibacterial, Antifungal, and Anti quorum Sensing Activity. In Roessner U, Dias D, editors. *Metabolomics Tools for Natural*

- Product Discovery: methods and protocols. Victoria: Humana Press; 2012. p. 219-223.
36. Ying-Chi Lin P. Glycerol Monolaurate and Dodecylglycerol Effects on Staphylococcus aureus and Toxic Shock Syndrome Toxin-1 In Vitro and In Vivo. *Plos one*. 2009 October; 4, 1-10.
 37. Oulahal N, Brice W, Martial A, Degraeve P. Quantitative analysis of survival of Staphylococcus aureus or Listeria innocua on two types of surfaces: polypropylene and stainless steel in contact with three different dairy products. *Food Control*. 2008 March; 19, 178-185.
 38. Marinho A, Martins P, Ditmer E, d'Azevedo P, Frazzon J, Van Der San S, et al. Biofilm formation on polystyrene under different temperatures by antibiotic resistant Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium isolated from food. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2013 June; 44, 423-426.
 39. Donlan R. Biofilms and device- associated infections. *Emerging Infections Diseases*. 2001 March; 7, 277-281.
 40. Mauclair L, Egil M. Effect of simulated microgravity on growth and production of exopolimeric substances of *Micrococcus luteus* space and earth isolates. *Immunology & Medical Microbiology*. 2010 May; 59, 350-356.
 41. Labbate M, Zhu H, Thung L, Bandara R, Larsen M, Willcox M, Givskov M, Rice S, Kjelleberg S. Quorum- sensing regulation of adhesion in *Serratia marcescens* MG1 is surface dependent. *Journal of Bacteriology*. 2007 January; 189, 2702-2711.

4. Conclusiones y recomendaciones

4.1 Conclusiones

Se evidenció la obtención de los AQG, siguiendo una metodología de síntesis asimétrica, y de acuerdo al análisis de datos espectroscópicos, con la estructura de los hallados en varias fuentes naturales. Los compuestos sintetizados fueron identificados como (S)-1-O-dodecanoil-*sn*-glicerol **1** (12:0), (S)-1-O-tetradecanoil-*sn*-glicerol **2** (14:0), (S)-1-O-hexadecanoil-*sn*-glicerol **3** (16:0), y (S)-1-O-octadecanoil-*sn*-glicerol **4** (18:0).

La cristalización, resultó ser un método apropiado, para la obtención de los AQG saturados, en muy buen grado de pureza.

Se logró implementar una metodología de ensayos antimicrobianos y de inhibición del *quorum sensing*, con la que se evaluó la capacidad *antifouling* de cada uno de los compuestos sintetizados.

De acuerdo a dichos ensayos, se logró determinar que el dodeciliglicerol **1**, fue el AQG más efectivo frente al espectro bacteriano ensayado y en la inhibición del *quorum sensing*.

La susceptibilidad de cada bacteria fue diferente para cada compuesto, e incluso varió frente al compuesto más activo.

En este trabajo se determinó que el dodeciliglicerol y en menor capacidad el tetradeciliglicerol, exhibieron las mejores oportunidades de uso en formulaciones *antifouling* no tóxicas para el medio ambiente.

4.2 Recomendaciones

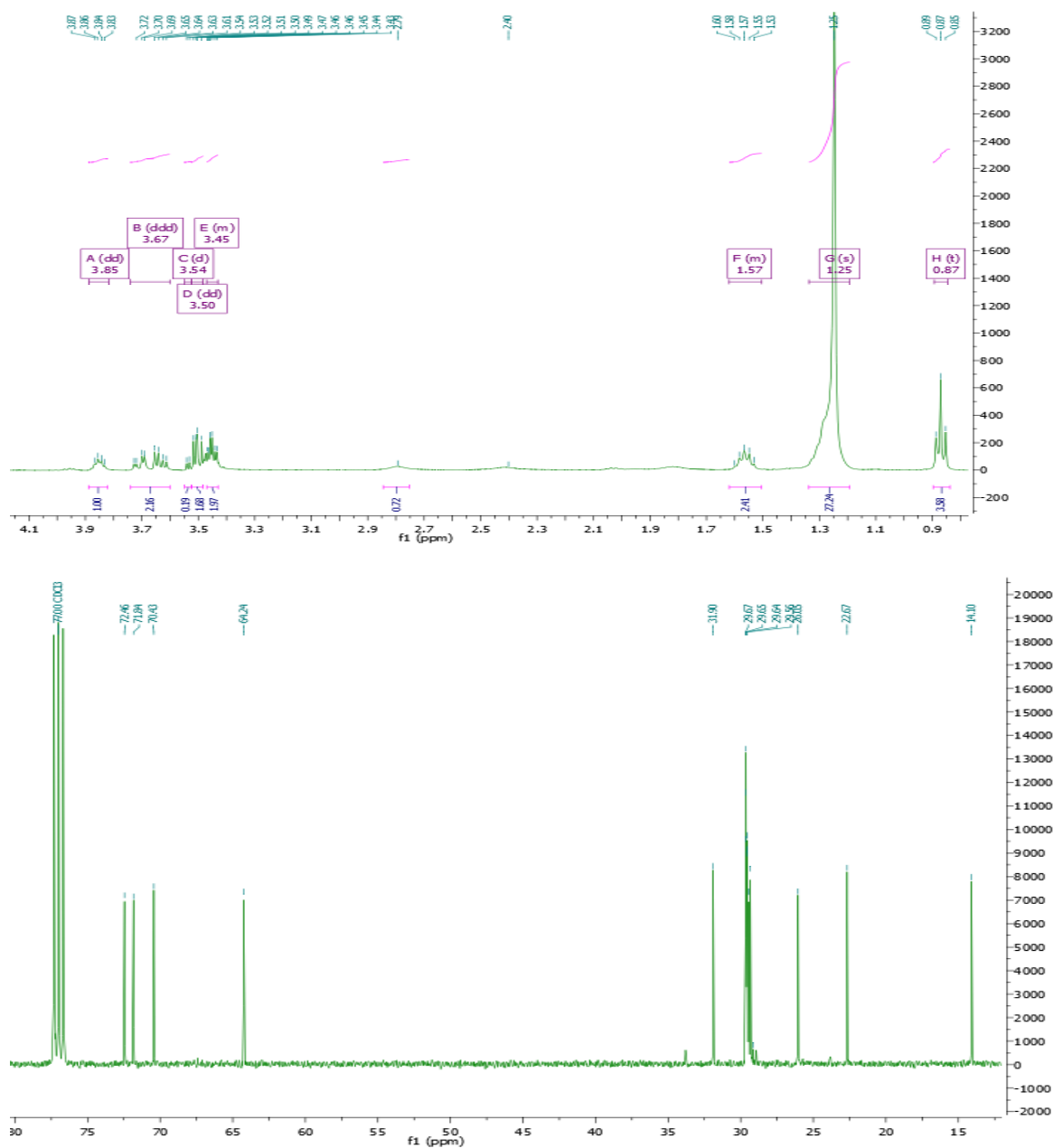
Se recomienda continuar los experimentos tendientes a la síntesis de AQG insaturados como es el caso del alcohol selaquílico y obtener nuevos y más derivados estructurales de los AQG para aportar una fuente de compuestos útiles en la determinación de la actividad biológica

Es conveniente la determinación de la rotación óptica de cada AQQ sintetizado o el uso de métodos de análisis quiral para demostrar con mayor sustento, la formación de los enantiómeros deseados.

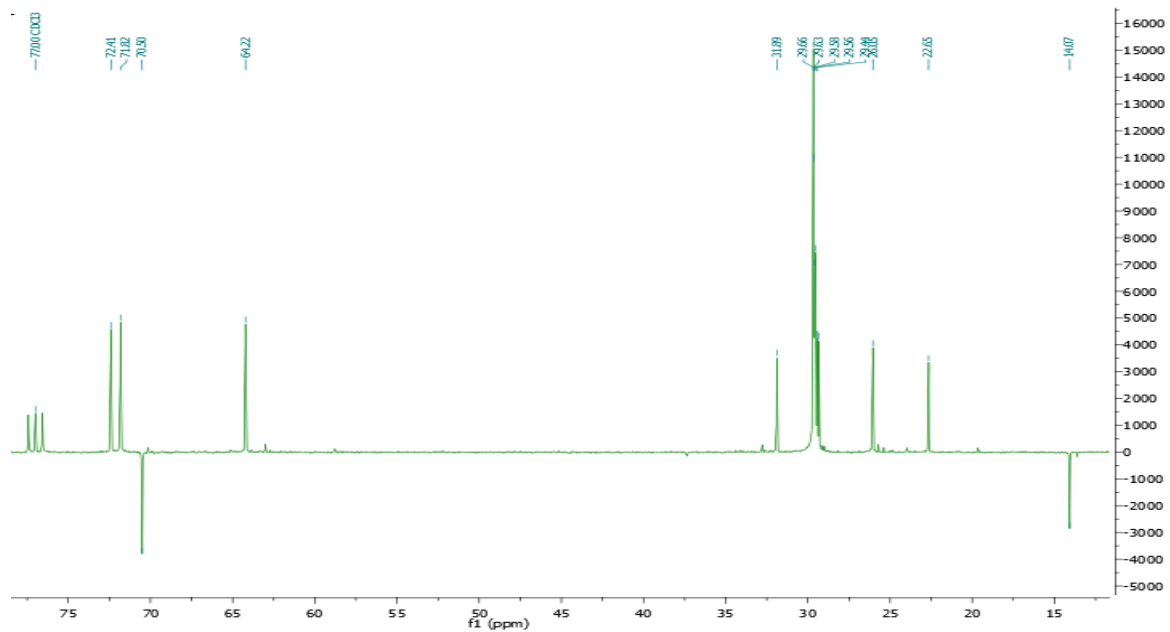
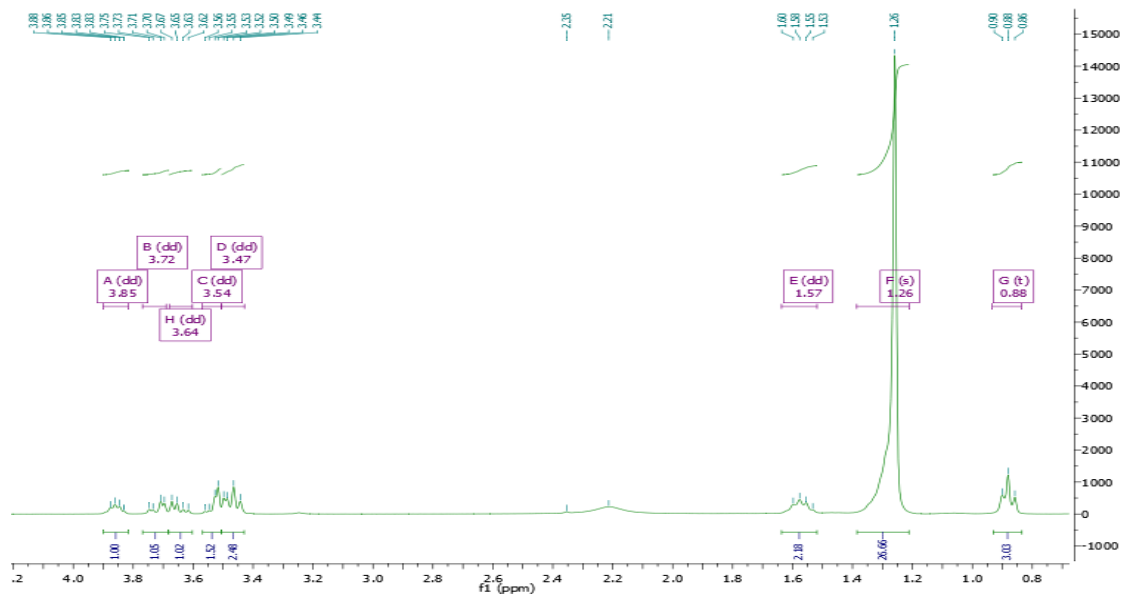
Se recomienda continuar los experimentos tendientes a la evaluación de la actividad de los AQQ sintetizados frente a cepas microbiológicas de referencia o experimentos frente a aislamientos microbianos naturales o sus efectos sobre el *fouling*.

Puede ser importante la exploración de nuevas fuentes en búsqueda de la presencia de esta clase de compuestos y el estudio de su papel ecológico en nuestros recursos naturales.

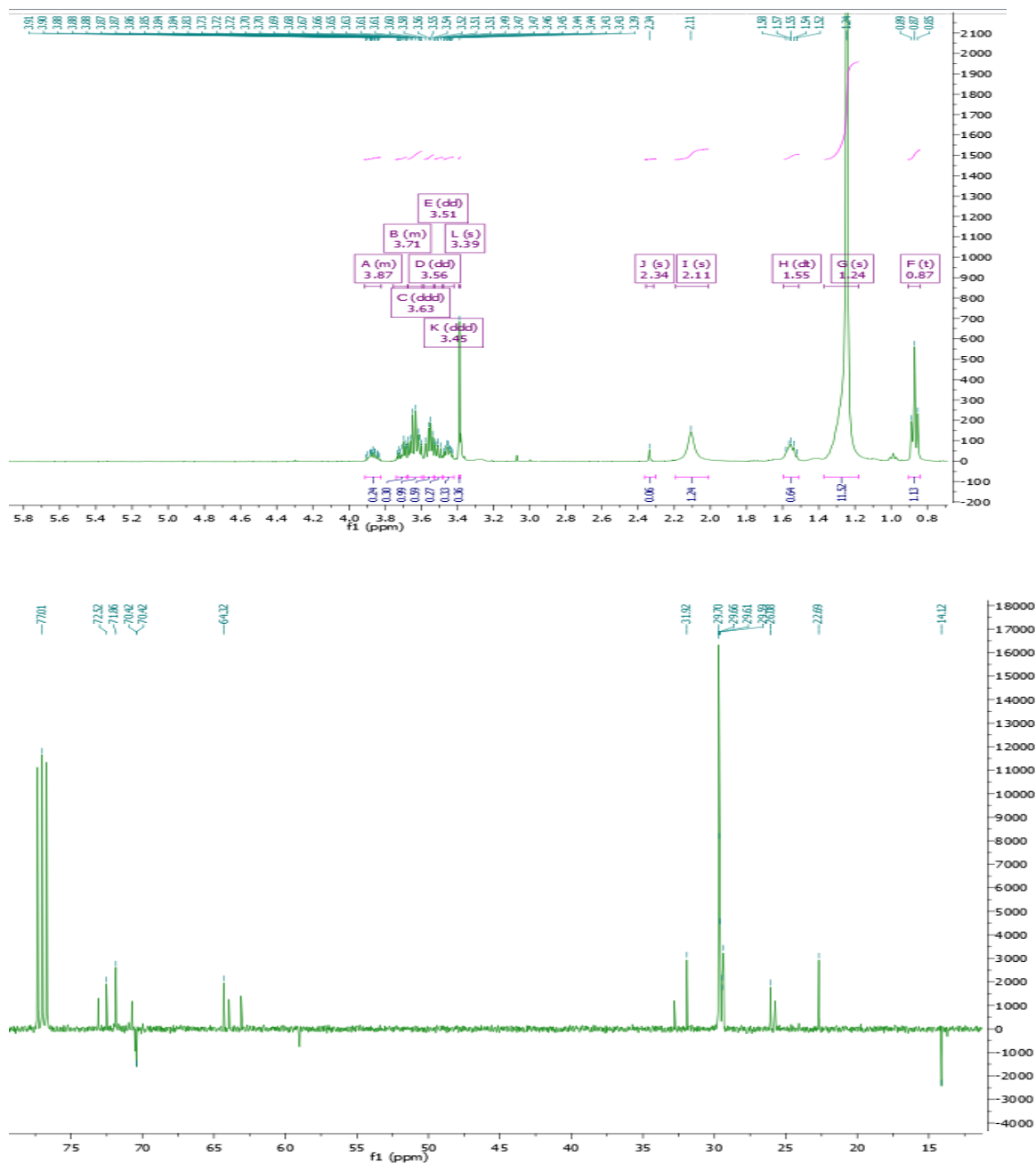
B. Anexo: Espectros de RMN ^1H y ^{13}C del compuesto 2



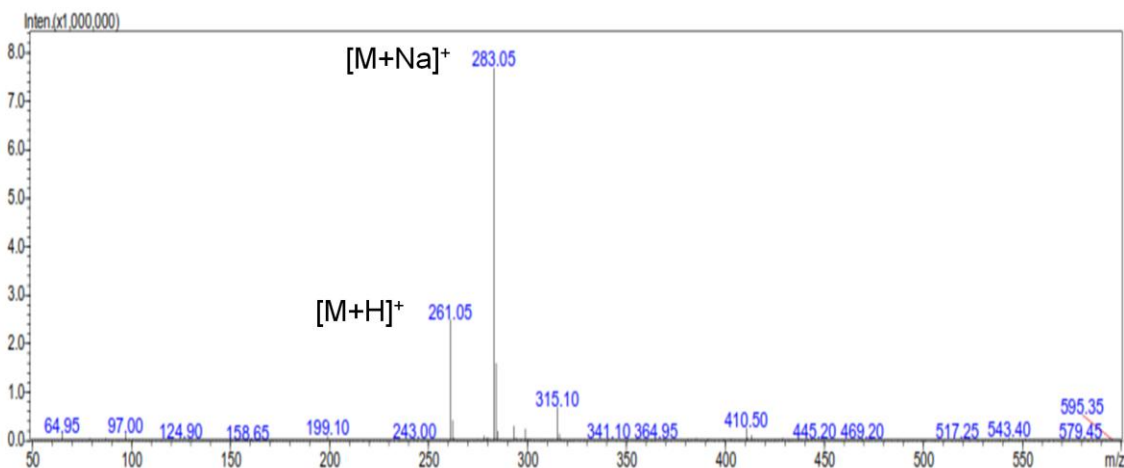
C. Anexo: Espectros de RMN ^1H y ^{13}C del compuesto 3



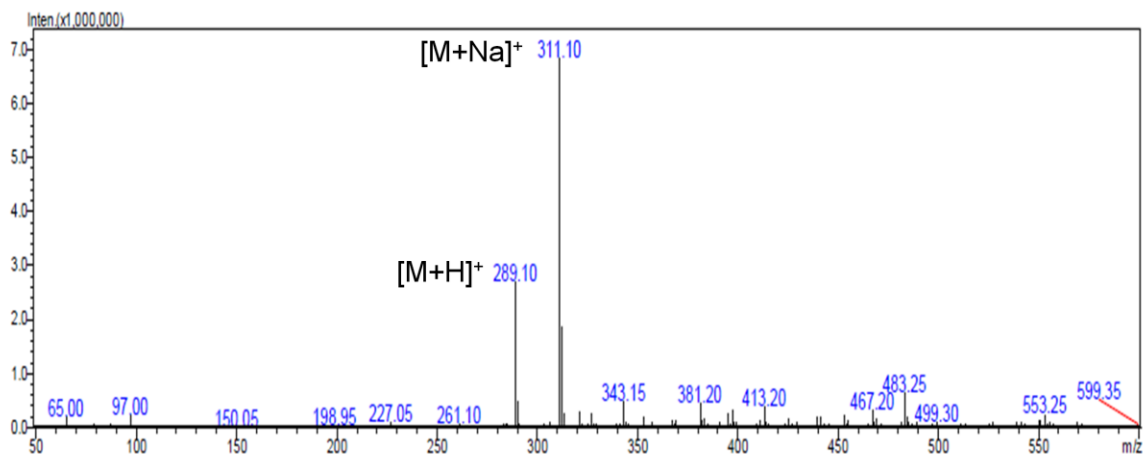
D. Anexo: Espectros de RMN ^1H y ^{13}C del compuesto 4



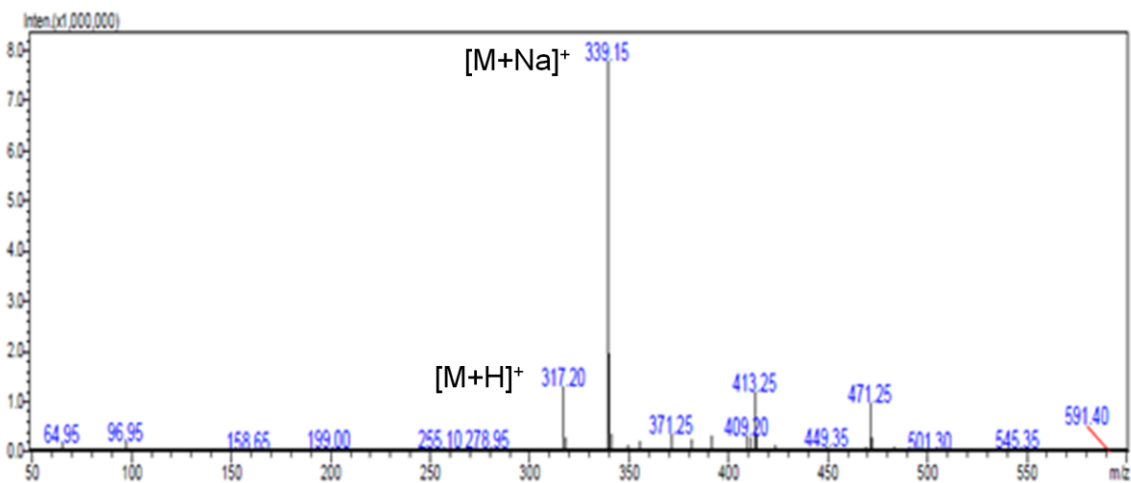
E. Anexo: Espectro de CLAE-MS/ESI del compuesto 1



F. Anexo: Espectro de CLAE-MS/ESI del compuesto 2



G. Anexo: Espectro de CLAE-MS/ESI del compuesto 3



H. Anexo: Espectro de CLAE-MS/ESI del compuesto 4

