

UNIVERSIDAD DE GRANADA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA

Facultad de Ciencias



Programa de Doctorado en Química

TESIS DOCTORAL

**Química de la Interacción Sexual en los hongos
Mucorales *Phycomyces blakesleeanus* y *Blakeslea
trispora*.**

José Antonio González Delgado

2014

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: José Antonio González Delgado
D.L.: GR 1849-2014
ISBN: 978-84-9083-032-1

Prof. Dr. D. ALEJANDRO FERNÁNDEZ BARRERO, Catedrático del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Granada, Dra. D^a M^a DEL MAR HERRADOR DEL PINO, Profesora Titular del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Granada, y Dr. D. JESÚS FERNÁNDEZ ARTEAGA, Profesor Titular del Departamento de Ingeniería Química, Química Física y Química Orgánica de la Universidad de Huelva,

CERTIFICAN:

Que el Licenciado en Química D. José Antonio González Delgado ha realizado en el Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Granada bajo nuestra dirección, el trabajo titulado "*Química de la Interacción Sexual en los hongos Mucorales Phycomyces blakesleanus y Blakeslea trispora*", que presenta para optar al grado de Doctor con mención de Doctor Internacional.

Y para que así conste, firman el presente certificado en Granada, a 21 de Febrero de 2014.

**Fdo. Prof. Dr. D. Alejandro
Fernández Barrero**

Catedrático del Dpto. de
Química Orgánica

Universidad de Granada

**Fdo. Dra. D^a. María del Mar
Herrador del Pino**

Profesora Titular del Dpto. de
Química Orgánica

Universidad de Granada

**Fdo. Dr. D. Jesús Fernández
Arteaga**

Profesor Titular del Dpto. de
Ing. Q^a, Q^a Física y Q^a Orgánica

Universidad de Huelva

Química de la Interacción Sexual en los hongos Mucorales *Phycomyces blakesleeanus* y *Blakeslea trispora*.

MEMORIA presentada por José Antonio González Delgado para optar al grado de Doctor en Química con mención de Doctor Internacional.

Granada, 21 de Febrero de 2014

D. José Antonio González Delgado

Los Directores de la Tesis

**Prof. Dr. D. Alejandro
Fernández Barrero**

Catedrático del Dpto. de
Química Orgánica

Universidad de Granada

**Prof. D^ª. María del Mar
Herrador del Pino**

Profesora Titular del Dpto. de
Química Orgánica

Universidad de Granada

**Prof. D. Jesús Fernández
Arteaga**

Profesor Titular del Dpto. de
Ing. Q^ª, Q^ª Física y Q^ª Orgánica

Universidad de Huelva

El doctorando D. JOSÉ ANTONIO GONZÁLEZ DELGADO y los directores de la tesis PROF. Dr. D. ALEJANDRO FERNÁNDEZ BARRERO, Dra. D^a MARÍA DEL MAR HERRADOR DEL PINO y Dr. D. JESÚS FERNÁNDEZ ARTEAGA, garantizamos, al firmar esta Tesis Doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la Tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, 21 de Febrero de 2014

Director/es de la Tesis

Doctorando

Fdo.: Prof. Dr. D. Alejandro Fernández Barrero

Fdo.: José Antonio González Delgado

Fdo.: Dra. D^a. María del Mar Herrador del Pino

Fdo.: Dr. D. Jesús Fernández Arteaga

AGRADECIMIENTOS

Una vez finalizada mi Tesis Doctoral, me gustaría dedicar unas líneas, a las personas e instituciones que de una forma u otra han contribuido a realizar esta Memoria.

En primer lugar, a mi Director Prof. Dr. D. Alejandro Fernández Barrero por abrirme las puertas de su grupo de investigación y por su entrega, dedicación y sabiduría a lo largo de todos estos años. Gracias por su paciencia y por prestarme ayuda en todos los momentos en los que la he necesitado.

A la Dra. D^a María del Mar Herrador del Pino por ser mi codirectora y por su infinita ayuda en los problemas del día a día. Gracias por su apoyo y comprensión, incluso por su rectitud y firmeza, que en estos momentos, echando la vista atrás, ha servido para crecer como persona y profesional.

Al Dr. D. Jesús Fernández Arteaga por ser también mi codirector y por confiar en mí en todo momento. Gracias por la oportunidad brindada y por su optimismo, energía, vitalidad e ilusión a lo largo de todos estos años y a pesar de que hemos estado lejos siempre ha estado ahí cuando lo he necesitado.

A la Dra. D^a Pilar Arteaga Burón por acogerme con los brazos abiertos desde el primer día y hacerme sentir más querido. Gracias por su cariño, ayuda y alegría que siempre ha transmitido.

Al Dr. D. José Quílez del Moral por hacernos más ameno el trabajo del día a día y por su buen humor constante el cual siempre nos sacaba una sonrisa.

Al Prof. Dr. D. Enrique Cerdá Olmedo, del Dpto. de Genética de la Universidad de Sevilla y a todo su equipo, Silvia, Lola, Eugenio y Humberto por toda la colaboración prestada ya que sin ellos este trabajo no podría haber sido posible.

A todos los miembros del Dpto. de Química Orgánica, en especial al secretario José Antonio por la ayuda prestada en todos los trámites y a los técnicos del Centro de Instrumentación Científica, especialmente a Dr. D. Alí Haïdour y Dra.

D^a María Esther Onorato por su asistencia en la espectrometría de resonancia magnética nuclear, y a Dr. D. José Miguel Ramos y Dra. D^a Yolanda Madrid en espectrometría de masas.

A la Fundación Medina, en especial a Dr. D. Fernando Reyes y Dr. D. Jesús Martín por su generosidad y ayuda prestada en la realización y elucidación de los análisis de HPLC-HRMS.

A todos mis compañeros que a lo largo de estos años han pasado por el laboratorio y que tantas horas hemos pasado en él y fuera de él. Gracias Horacio, Victoriano, M^a Carmen, Alexis, Jesús Gil, Titika, Paulina, Consuelo, Lydia, Rocío y Emilio.

A mi toda mi familia y en especial a mi padre José, a mi hermana Ana María y a mi tía Ana por su apoyo incondicional y por haber creído siempre en mí.

A mis amigos de toda la vida de Huelva, Isaac, Isa, David, Sara y Paco por estar siempre ahí cuando lo he necesitado aún en la distancia, y en especial, a una persona muy importante para mí estos años en Granada, Gloria, por haber compartido conmigo todos estos momentos, algunos buenos y otros malos, y por su cariño y comprensión.

A la Junta de Andalucía por su financiación a través del Proyecto de Excelencia P08-FQM-3596 y del P08-CVI-03901, al Gobierno de España por el proyecto CTQ 2010-16818-BQ y a la Universidad de Granada por una beca Erasmus/LLP que me permitió financiar mi estancia en el grupo del Prof. V. K. Aggarwal en la Universidad de Bristol (Reino Unido) durante tres meses.

I. ÍNDICE

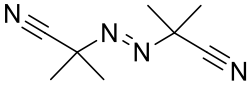
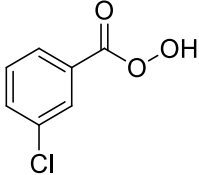
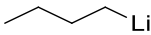
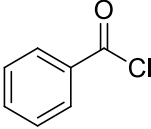
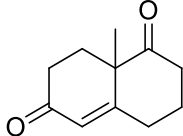

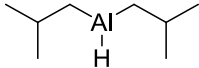
• Abreviaturas	1
• Resumen/Abstract	9
• Introducción y Objetivos	19
○ Aislamiento e identificación de metabolitos en <i>Blakeslea trispora</i> y <i>Phycomyces blakesleeanus</i> . Apocarotenoides de la interacción sexual.	24
○ Puesta a punto de nuevas estrategias hacia la Síntesis Total de trisporoides C18 y ciclofarnesoides C15 polifuncionalizados.	25
○ Desarrollo de un nuevo método analítico para trisporoides de Mucorales, basado en HPLC/Masas/DAD.	27
• Antecedentes	29
○ Mucorales	31
▪ <i>Phycomyces blakesleeanus</i> .	31
▪ <i>Blakeslea trispora</i> .	33
○ Ciclo asexual o vegetativo	34
▪ <i>Phycomyces blakesleeanus</i> .	34
▪ <i>Blakeslea trispora</i> .	35
○ Ciclo sexual.	37
○ Interacción sexual.	38
○ Trisporoides: Generalidades.	39
○ Síntesis Química de Apocarotenoides.	43
○ Actividades Biológicas de Carotenoides	62
▪ Carotenoides.	62
▪ Trisporoides.	65
▪ Biosíntesis de β -caroteno.	67
▪ Propuestas Biosintéticas para Apocarotenoides.	71
○ Ciclaciones Biomiméticas: Generalidades.	77
• Artículos de Investigación	89

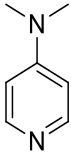
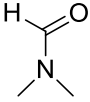
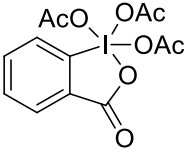
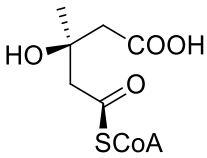
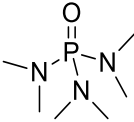
○ Artículo 1: New apocarotenoids and β -carotene cleavage in <i>Blakeslea trispora</i> .	91
○ Artículo 2: Apocarotenoids in the sexual interaction of <i>Phycomyces blakesleeanus</i> .	101
○ Artículo 3: A minor dihydropyran apocarotenoid from Mated Cultures of <i>Blakeslea trispora</i> .	113
○ Artículo 4: First Total Synthesis of (+)-Apotrisporin E and (+)-Apotrietriols A-B: A Cyclization Approach to Apocarotenoids.	125
● Discusión de Resultados	133
○ Química de la Interacción Sexual en <i>Blakeslea trispora</i> . Nuevos apocarotenoides.	135
▪ Aislamiento y purificación de metabolitos.	135
▪ Estructura de los apocarotenoides C7 (metilhexanoides) 61–65 .	137
▪ Síntesis de los apocarotenoides C7 (61–63) nuevos productos naturales.	139
▪ Estructura de los ciclofarnesoides (apotrisporoides) C15 (57 , 58a y 59a) y del apocarotenoide C13 (6a).	141
▪ Identificación y caracterización de un nuevo apocarotenoide 60 con estructura dihidropiránica.	144
▪ Discusión sobre los metabolitos identificados.	148
○ Apocarotenoides en la Interacción Sexual de <i>Phycomyces blakesleeanus</i>	150
▪ Extracción y aislamiento de metabolitos.	150
▪ Identificación de apocarotenoides.	152
▪ Estructura del nuevo apocarotenoide heterocíclico 70a : Trispoxano A.	155
▪ Estructura de los nuevos apocarotenoides trihidroxi derivados 71a y 71b : Trispotrietrioles A-B.	159
▪ Discusión sobre los metabolitos identificados en <i>Phycomyces blakesleeanus</i> .	162

• Diversidad de apocarotenoides.	162
• Nuevos apocarotenoides y su biosíntesis en <i>Phycomyces blakesleanus</i> .	165
• Dependencia medioambiental de los apocarotenoides.	167
• Funciones biológicas de los apocarotenoides.	168
○ Síntesis total de (+)-Apotrisporina E y (+)-Apotrientrioles A y B. Determinación de su estereoquímica.	169
▪ Aproximación hacia la síntesis de trisporoles y ácidos trispóricos mediante ciclación radicalaria con Cp ₂ TiCl.	177
○ Análisis cromatográfico de apocarotenoides por HPLC–MS de alta resolución	181
▪ Estudio de apocarotenoides en las fracciones neutras de cultivos individuales a dos días.	184
▪ Estudio de apocarotenoides en las fracciones ácidas de cultivos individuales a dos días.	194
▪ Estudio de apocarotenoides en fracciones neutras liofilizadas y no liofilizadas de cultivos mixtos a cinco días.	202
▪ Estudio de apocarotenoides en fracciones ácidas liofilizadas y no liofilizadas de cultivos mixtos a cinco días.	211
▪ Comparación del contenido en apocarotenoides en las fracciones neutras de cultivos mixtos a dos y cinco días.	220
▪ Comparación del contenido en apocarotenoides en las fracciones ácidas de cultivos mixtos a dos y cinco días.	228
• Conclusiones/Conclusions	237
• Anexos	247
○ Anexo 1: Supporting Information de "New apocarotenoids and β-carotene cleavage in <i>Blakeslea trispora</i> ".	247
○ Anexo 2: Supporting Information de "Apocarotenoids in the sexual interaction of <i>Phycomyces blakesleanus</i> ".	269

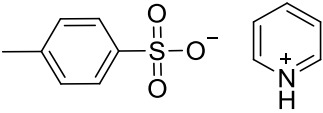
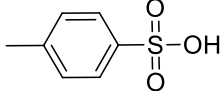
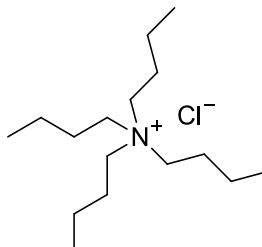
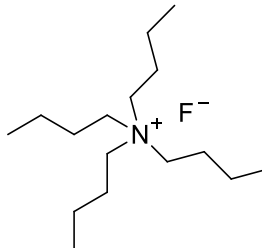
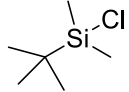
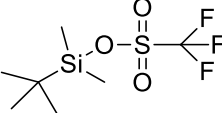
○ Anexo 3: Supporting Information de "A minor dihydropyran apocarotenoid from Mated Cultures of <i>Blakeslea trispora</i> ".	299
○ Anexo 4: Supporting Information de "First Total Synthesis of (+)-Apotrisporin E and (+)-Apotrietriols A-B: A Cyclization Approach to Apocarotenoids".	303
▪ Aproximación hacia la síntesis de trisporoles y ácidos trispóricos mediante ciclación radicalaria con Cp ₂ TiCl.	343
○ Anexo 5: Supporting Information de "Análisis cromatográfico de apocarotenoides por HPLC–MS de alta resolución".	355

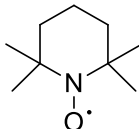
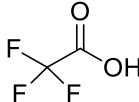

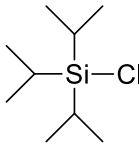
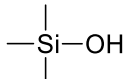
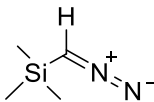
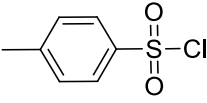
II. ABREVIATURAS

Abreviatura	Nombre químico	Estructura química
a	Ancho	
ADN	Ácido desoxirribonucleico	
AIBN	Azobisisobutironitrilo	
AMCPB	Ácido metacloroperbenzoico	
BuLi	Butil-litio	
BzCl	Cloruro de benzoilo	
COSY	Correlation Spectroscopy	
CWM	Cetona Wieland-Miescher	
d	Doblete	
DAD	Diode Array Detector	
DCM	Diclorometano	CH ₂ Cl ₂
dd	Doble doblete	
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer	
DHP	Dihidropirano	
DIBALH	Hidruro de diisobutilaluminio (Diisobutylaluminium hydride)	

DMAP	Dimetilamino piridina	
DMF	Dimetilformamida	
DMP	Dess-Martin periodinano	
dt	Doble triplete	
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation	
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A	
HMPA	Hexametilfosforamida	
HPLC	High-Pressure Liquid Chromatography	
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence	
HWE	Horner-Wadsworth-Emmons	
Hz	Herzios	
hν	Radiación electromagnética	
IR/NIR	Infrarrojo/Infrarrojo cercano	

LiHDMS	Bis(trimetilsilil)amiduro de litio (Lithium [bis(trimethylsilyl)amide])	
LDA	Diisopropilamiduro de litio (Lithium diisopropylamide)	
m	Multiplete	
m/z	Relación masa/carga	
MeLi	Metil litio	CH ₃ Li
MsCl	Cloruro de mesilo	
NADP	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)	
NBS	N-Bromosuccinimida	
NCS	N-Clorosuccinimida	
nm	Nanometro	
PCC	Clorocromato de piridinio (Pyridinium chlorochromate)	
PDC	Dicromato de piridinio (Pyridinium dichromate)	

PET	Photoinduced electron transfer	
ppm	Partes por millón	
PPTS	<i>p</i> -Toluensulfonato de piridinio (Pyridinium <i>p</i> -toluenesulfonate)	
<i>p</i> -TsOH	Ácido <i>para</i> -toluensulfónico	
RMN	Resonancia magnética nuclear	
s	Singlete	
t	Triplete	
ta	Temperatura ambiente	
TBACl	Cloruro de tetrabutilamonio	
TBAF	Fluoruro de tetrabutilamonio	
TBSCl	Cloruro de <i>tert</i> -butil dimetil sililo	
TBSOTf	Triflato de <i>tert</i> -butil dimetil sililo	

TEMPO	Óxido de 2,2,6,6-tetrametilpiperidina (2,2,6,6-Tetramethylpiperidinyloxy)	
TFA	Ácido trifluoroacético	
THF	Tetrahidrofurano	
TIPSCl	Cloruro de triisopropil sililo	
TMS	Trimetilsilano	
TMSCHN ₂	Trimetilsilildiazometano	
TsCl	Cloruro de tosilo	
UV	Ultravioleta	
VIS	Visible	

III. RESUMEN/ABSTRACT

El β -caroteno es un pigmento natural con propiedades antioxidantes, provitamínica A y colorante muy apreciado por las industrias farmacéutica, agroalimentaria y cosmética. Se obtiene comercialmente tanto por síntesis química como por biotecnología. Aunque esta última es minoritaria, está en auge favorecida por el rechazo creciente de los aditivos químicos en la alimentación y las preferencias de la farmacología y la cosmética. Siendo entonces los hongos particularmente atractivos como fuentes de β -caroteno, en concreto los hongos Mucorales, de los que destacan *Blakeslea trispora* y *Phycomyces blakesleeanus*.

Blakeslee, en 1904, dividió las estirpes de Mucorales en dos tipos sexuales denominados (+) y (-). Los dos tipos son indistinguibles morfológicamente y sólo se pueden identificar debido a su reacción en presencia del otro sexo. Estirpes silvestres de *Phycomyces blakesleeanus* en cultivos mixtos del sexo (+) y (-) incrementan el contenido en β -caroteno comenzando así su desarrollo morfológico durante el ciclo sexual. Estos efectos fisiológicos se atribuyen a una serie de compuestos llamados trisporoides. Algunos trisporoides dan excelentes actividades biológicas, siendo la más interesante su capacidad para inducir la formación de zigóforos, primer paso en el proceso sexual en Mucorales. Esto origina, a su vez, un considerable aumento de la producción de β -caroteno (carotenogénesis) en estos hongos, lo que le confiere a los trisporoides un gran

interés industrial. La producción de β -caroteno se observa por una intensificación de la coloración rojo-anaranjada en la zona sexual cuando dos micelios de diferente sexo se encuentran próximos. Actualmente, todas las evidencias experimentales indican que son las feromonas encargadas de estos procesos sexuales.

Dado el interés de este tipo de compuestos, el análisis exhaustivo de los mismos en estos hongos ha sido objeto de estudio en esta Tesis Doctoral.

En este análisis se han aislado e identificado 12 apocarotenoides en cultivos mixtos de las estirpes F986 (+) y F921 (-) de *Blakeslea trispora*, 9 de ellos son nuevos productos naturales. Cinco de los nuevos apocarotenoides tienen 7 carbonos (C7) y constituyen una nueva familia de apocarotenos, y otro de ellos presenta una estructura heterocíclica que constituye un nuevo esqueleto trisporoide. Entre todos los metabolitos encontrados, existen apocarotenoides C18, C15, C7 y un C13 en muy pequeña cantidad. La existencia de los tres primeros grupos de compuestos en cantidades casi equimoleculares nos ha permitido postular una nueva ruta biosintética que implica una primera etapa de ruptura asimétrica de β -caroteno a través de los dobles enlaces $\Delta^{13,14}$ y $\Delta^{11',12'}$. La separación de los compuestos se ha efectuado mediante HPLC semipreparativa en fase normal y la identificación mediante técnicas espectroscópicas, fundamentalmente de RMN. También se ha llevado a cabo con buenos rendimientos la síntesis química de los apocarotenoides C7 y C13 que ha permitido confirmar su estructura y obtenerlos en cantidades suficientes para su posterior evaluación biológica.

En el caso de *Phycomyces blakesleeanus* se han aislado e identificado 11 apocarotenoides en los cultivos mixtos de las estirpes silvestres NRRL1555 (-) y A56 (+), junto con la identificación de dos apocarotenoides mediante el uso de patrones. De ellos, cinco son nuevos productos naturales y seis se identifican por primera vez en *Phycomyces*. Dos de los nuevos apocarotenoides son C7 y se han aislados también en *Blakeslea*, y otro de los nuevos apocarotenoides presenta una estructura heterocíclica que constituye un nuevo esqueleto trisporoide. Entre

todos los metabolitos encontrados, existen apocarotenoides C18, C15 y C7 en cantidades casi equimoleculares lo que nos ha permitido como en el caso de *Blakeslea*, postular una nueva ruta biosintética mediante doble ruptura oxidativa de β -caroteno. La separación de los compuestos y su identificación se ha efectuado como en *Blakeslea*. La estructura de los cinco apocarotenoides nuevos se ha confirmado por síntesis química.

En cultivos individuales de estas estirpes de *Phycomyces* se han aislado e identificado C7 y C15 apocarotenoides, también identificados en el cultivo mixto. La cantidad de apocarotenoides en cultivos individuales es unas siete veces menor que en cultivos mixtos. Se han efectuado propuestas biosintéticas para algunos apocarotenoides C15 nuevos.

Se ha llevado a cabo por primera vez la síntesis total y enantioselectiva de (+)-apotrisporina E y (+)-apotrientrioles A y B (nuevos apocarotenoides aislados de cultivos mixtos e individuales de *Phycomyces*). La metodología usada implica una ciclación biomimética utilizando Cp_2TiCl ó $ZrCl_4$ para originar el anillo ciclohexénico convenientemente funcionalizado y una posterior olefinación de Horner-Wadsworth-Emmons para incorporar la cadena lateral. Con estas síntesis, se pudieron confirmar las estructuras de los apotrientrioles A y B, y establecer la configuración S en C-2, además de obtener los productos en cantidades suficientes para futuras pruebas de actividad biológica.

Finalmente, se ha puesto a punto un método analítico mediante HPLC-MS-DAD para la identificación rápida y eficaz de apocarotenoides en cultivos, tanto individuales como mixtos, de *Phycomyces blakesleeanus*. Mediante esta técnica se ha establecido la presencia de nuevos apocarotenoides nunca antes descritos en cultivos de este hongo. Análisis a los dos días de incubación indican que ya se han originado la mayoría de los apocarotenoides presentes en el hongo incluyendo algunos precursores que se transforman posteriormente. En un estudio comparativo entre cultivos a dos y cinco días, se observan diferencias cuali- y cuantitativas entre la distribución de apocarotenoides observándose una mayor

proporción de metabolitos con un alto grado de oxidación y la desaparición de algunos formados inicialmente.

β-carotene is a natural pigment with antioxidant, provitaminic A and colouring properties prized for pharmaceutical, food and cosmetic industries. It is commercially obtained either by chemical synthesis or biotechnology. While the latter is minor, is booming favored by the growing rejection of chemical additives in food and the preferences of pharmacology and cosmetics. Thus fungi are particularly attractive as source of β-carotene, in particular those of Mucorales family, notably *Blakeslea trispora* and *Phycomyces blakesleeanus*.

Blakeslee, in 1904, divided the strains of Mucorales into two sexual types called (+) and (-). The two types are morphologically undistinguishable, and can only be identified due to its reaction in the presence of the other sex. Wild-strains of *Phycomyces blakesleeanus* in mated cultures of (+) and (-) sex increase the β-carotene content starting their morphological development during their sexual cycle. These physiological effects are attributed to a series of compounds called trisporoids. Some trisporoids give rise to excellent biological activities, highlighting their ability to induce the formation of zygophore, first step in the sexual process of Mucorales. This leads, in turn, a considerable increase in the β-carotene production (carotenogenesis) in these fungi, which confers to trisporoids an enormous industrial interest. Production of β-carotene is observed by

intensified red-orange coloration in the sexual area when two mycelia of different sex are close. Nowadays, all the experimental evidences suggest that specific trisporoids are the sexual pheromones responsible for these processes.

Due to the interest of this kind of compounds, a thorough chemical study of them (chemical identification, biosynthesis discussion and chemical synthesis) has been carried out in this Thesis.

In this study, twelve apocarotenoids have been isolated and identified in mated cultures of F986 (+) and F921 (-) strains of *Blakelea trispora*, being nine of them new natural products. Five of the new apocarotenoids have seven carbons (C7) and constitute a new family of apocarotenes, while other of them shows a heterocyclic structure that establishes a new trisporoid framework. Among all the metabolites found, C18, C15, C7 and C13 apocarotenoid families are identified. Due to the existence of the groups of compounds (C18, C15 and C7) in hardly equimolecular amount and having in consideration negligible proportion for C13, we have postulated a new first step in the biosynthesis of the apocarotenoids that postulate a double asymmetrical cleavage of β -carotene through $\Delta^{13,14}$ and $\Delta^{11',12'}$ double bonds. The compounds have been separated by semi-preparative normal-phase HPLC and structurally characterized by spectroscopic techniques, mainly NMR. The chemical syntheses of new C7 and C13 apocarotenoids have been also carried out in good yields. These syntheses have allowed to confirm both their structures and to obtain enough quantities of them for further biological evaluation.

In the case of *Phycomyces blakesleeanus*, eleven apocarotenoids have been isolated and identified in mated cultures of wild-type strains NRRL1555 (-) and A56 (+), along with the identification of two additional apocarotenoids from standards. Among them, five apocarotenoids are new natural products and six are identified for the first time in *Phycomyces*. Two of the new apocarotenoids are C7 and also they have been isolated from *Blakeslea*, and another one shows a heterocyclic structure which establishes a new trisporoid framework. Among all metabolites found, there are C18, C15 and C7 apocarotenoids in hardly

equimolecular quantities so we have been able to postulate, as in the case of *Blakeslea*, a new biosynthetic pathway through a double oxidative asymmetrical cleavage from β -carotene. The separation of the compounds and their identification is made similar to *Blakeslea*. The structure of the five new apocarotenoids has been confirmed by chemical synthesis.

C7 and C15 apocarotenoids have been isolated and identified from single cultures of these strains in *Phycomyces*, also identified from mated cultures. The amount of apocarotenoids in single cultures is about seven times smaller than in mixed cultures. Detailed biosynthetic proposals have been suggested for new C15 apocarotenoids.

First total and enantioselective synthesis of (+)-apotrisporin E and (+)-apotrietriols A and B (new apocarotenoids isolated in mated and single cultures from *Phycomyces blakesleeanus*) has been carried out. The methodology is based on biomimetic cyclizations from acyclic terpenoids using Cp_2TiCl or ZrCl_4 to give rise to the properly functionalized cyclohexenic ring and subsequently a Horner-Wadsworth-Emmons olefination to join the side chain. As consequence to these syntheses, we have been able to confirm the structures of apotrietriols A and B, and to establish the configuration *S* at the C-2 carbon. Furthermore, the products were obtained in enough quantities for further biological evaluation.

Finally, a new analytical method has been developed by HPLC-MS-DAD to identify fast and efficiently apocarotenoids, either in single or mated cultures of *Phycomyces blakesleeanus*. Using this method, the presence of new apocarotenoids have been established. These had never been reported in literature in cultures of this fungus. The two days-old incubation analyses show the most of apocarotenoids have already been formed including some precursors which will be become afterwards. In a comparative study between two and five days-old cultures, quali- and quantitative differences have been noticed among the distribution of apocarotenoids whose greater proportion of them with a high degree of oxidation and the disappearance of some starting metabolites is highlighted.

IV. INTRODUCCIÓN **Y OBJETIVOS**

El β -caroteno es uno de los pigmentos naturales más apreciados en las industrias farmacéutica, cosmética y agroalimentaria debido a sus propiedades provitamínica A, antioxidantes y colorantes.¹ Se obtiene comercialmente a través de Síntesis Química o por Biotecnología, a partir de los hongos filamentosos *Blakeslea trispora* y *Phycomyces blakesleeanus* (Orden Mucorales, Subfilum Mucoromycotina, Zygomycota) que acumulan este compuesto en proporciones relativamente considerables con respecto a su biomasa seca. La producción biotecnológica de β -caroteno actualmente es más atractiva para dichas industrias por ser una tecnología más ecológica y ofrecer condiciones flexibles de crecimiento, acompañado de la posibilidad de emplear modificaciones genotípicas y diferentes modificaciones experimentales de los cultivos.²

De los hongos anteriores, especialmente *Phycomyces* ha sido muy usado en investigaciones sobre genética clásica, fototropismo, metabolismo y biosíntesis de caroteno desde hace unos 140 años.³ Respecto a la biosíntesis, estos hongos usan los productos de degradación del caroteno como sistema de comunicación

¹ (a) Ciegler, A. *Adv. Appl. Microbiol.* **1965**, *7*, 1-34. (b) Ávalos, J.; Cerdá-Olmedo, E. *Fungal carotenoid production in Handbook of Fungal Biotechnology*, ed. Arora, D. K.; Marcel Dekker Inc, New York, **2004**, 367-378. (c) Bhosale, P. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2004**, *63*, 351-361. (d) Namitha, K. K.; Negi, P. S. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2010**, *50*, 728-760.

² Cerdá-Olmedo, E.; Mehta, B. J. *Microbial Carotenoids from fungi, Methods in Molecular Biology*, **2012**, *898*, 75-84.

³ (a) Cerdá-Olmedo, E.; Lipson, E. D. *Phycomyces*, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, **1987**. (b) Cerdá-Olmedo, E. *FEMS Microbiol. Rev.* **2001**, *25*, 503-512.

induciendo la primera etapa de la diferenciación sexual y posiblemente del desarrollo de las estructuras sexuales.⁴

A. F. Blakeslee clasificó las estirpes de estos Mucorales en dos tipos sexuales denominadas (+) y (-).⁵ Estos dos tipos son indistinguibles morfológicamente y sólo se pueden identificar debido a su comportamiento en presencia del otro sexo. Cuando se encuentran micelios de diferente sexo, incrementan la formación de caroteno y desarrollan hifas especializadas llamadas cigóforos. Se ha demostrado que el desarrollo sexual de estirpes de sexo opuesto se inicia con el intercambio de señales químicas cuya estructura se ha atribuido a apocarotenoides.¹ En este sentido se sabe que durante la interacción sexual el caroteno se degrada y los productos originados se conocen con el nombre genérico de apocarotenoides. Existe un elevado número de estos metabolitos en la naturaleza debido a la gran cantidad de carotenos precursores (más de 600 han sido identificados). Entre todos ellos, los más interesantes en nuestro caso desde el punto de vista biológico y funcional son los trisporoides C18 (con esqueleto de 18 átomos de C) y los apotrisporoides C15 (con esqueleto de 15 átomos de C), los cuales serán estudiados en profundidad en esta Tesis Doctoral (Figura 1).

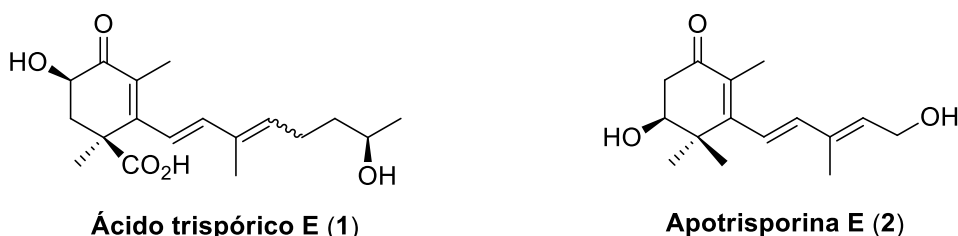


Figura 1. Ejemplos de apocarotenoides C18 y C15.

En cuanto a los objetivos de esta Memoria, se plantea avanzar en el estudio de las señales sexuales en estos hongos Mucorales (preferentemente, *Blakeslea trispora* y *Phycomyces blakesleeanus*), centrándonos en la producción, aislamiento e identificación de apocarotenos. Paralelamente se tratará de establecer las rutas

⁴ Schachtschabel, D.; David, A.; Menzel, K. D.; Schimek, C.; Wöstemeyer, J.; Boland, W. *Chem. Bio. Chem.* **2008**, *9*, 3004-3012.

⁵ Blakeslee, A. F. *Proc. Amer. Acad. Arts Sci.* **1904**, *40*, 205-319.

biosintéticas de formación, y adicionalmente se desarrollarán nuevas aproximaciones hacia la Síntesis Total de algunos de ellos. De esta forma se proponen los siguientes objetivos concretos.

1. Aislamiento e identificación de metabolitos en *Blakeslea trispora* y *Phycomyces blakesleeanus*. Apocarotenoides de la interacción sexual

Se pretende poner a punto un método para optimizar las condiciones de cultivo, así como la extracción y fraccionamiento de apocarotenoides en función de la naturaleza química de estos metabolitos. Por aplicación de las condiciones optimizadas se obtendrán fracciones diferenciadas por sus pH (ácido y neutro) que estarán enriquecidas en ácidos trispóricos o en metabolitos neutros (Figura 2).

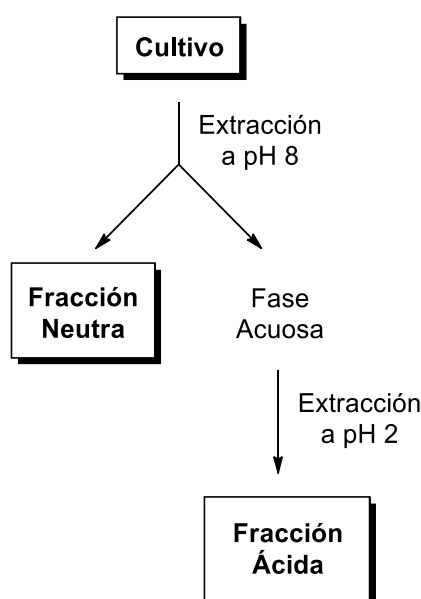


Figura 2. Extracción y fraccionamiento de cultivos mediante diferentes pH.

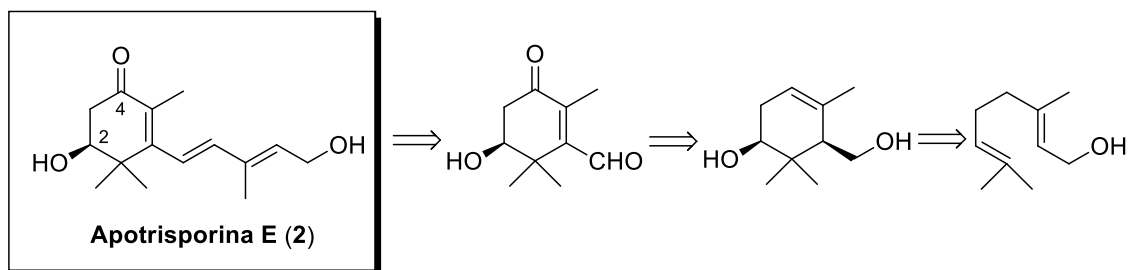
Para las separaciones se emplearán técnicas cromatográficas analíticas y semipreparativas incluyendo aquellas como la cromatografía en columna o la cromatografía líquida de alta presión (HPLC). En las elucidaciones estructurales se utilizarán técnicas de resonancia magnética nuclear (RMN), espectrometría de masas (EM), espectrofotometría UV-VIS-NIR y polarimetría.

Se estudiarán los componentes procedentes de cultivos individuales de estirpes (+) y (-) y cultivos mixtos tratando de comparar y poner de manifiesto las diferencias entre estirpes de uno u otro sexo y el cambio que se origina al cultivar ambos sexos conjuntamente.

2. Puesta a punto de nuevas estrategias hacia la Síntesis Total de trisporoides C18 y ciclofarnesoides C15 polifuncionalizados.

Se pretende abordar una aproximación para el acceso mediante síntesis química a los trisporoides C15 con funcionalización en C-2 y C-4, tal como apotrisporina E (**2**) (Esquema 1). La dificultad de este objetivo radica en la inestabilidad inherente de este tipo de compuestos por albergar trienos conjugados con un grupo carbonilo, así como su sensibilidad a la luz, humedad y oxígeno del aire.

Apotrisporina E (**2**) no ha sido sintetizado nunca previamente y pertenece a un reducido grupo de compuestos dentro de la familia de los C15 apocarotenoides. Su síntesis se ha planteado de acuerdo con el siguiente esquema retrosintético (Esquema 1) para confirmar su estructura, establecer su estereoquímica relativa y absoluta, disponer de cantidades de miligramos para evaluar su actividad biológica y como patrón interno.



Esquema 1. Análisis retrosintético de apotrisporina E (**2**).

Este tipo de metodología también puede ser aplicable a la síntesis de otros productos naturales que albergan esqueletos carbonados y funcionalidades relacionadas, tales como los terpenos Camelliol A y C o el anillo A del antitumoral Taxol™.

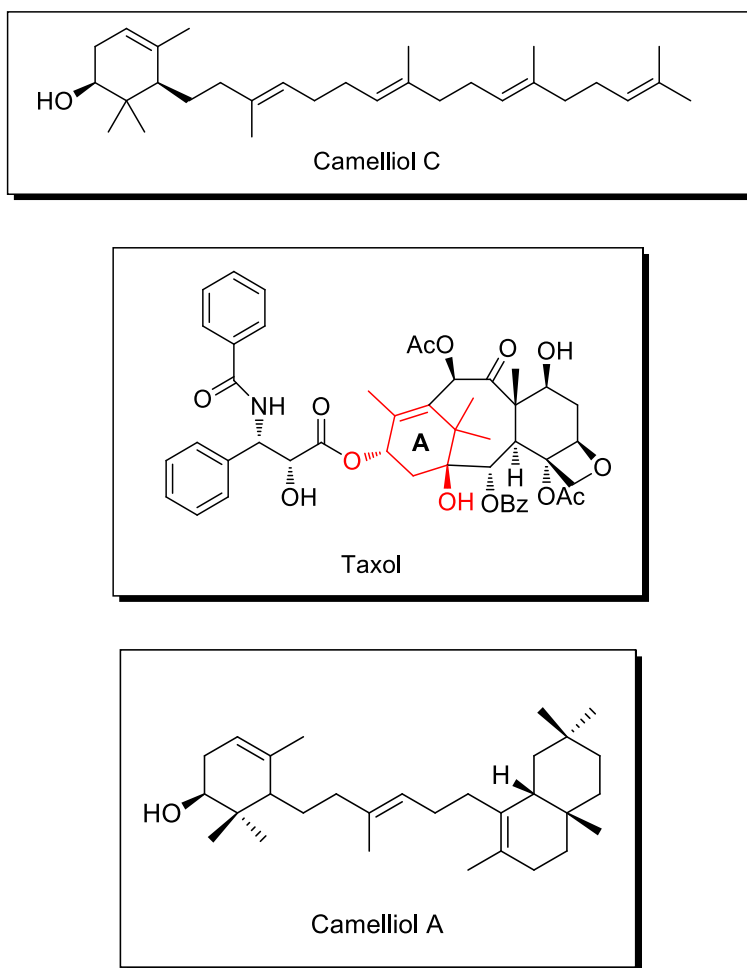


Figura 3. Estructuras químicas de Camelliol A, C y Taxol.

3. Desarrollo de un nuevo método analítico basado en HPLC/Masas/DAD para los trisporoides de Mucorales.

En tercer lugar se intentará desarrollar un sistema de HPLC analítico con distintos tipos de detección (UV-DAD) y EM de alta y de baja resolución adecuado para la identificación de apocarotenoides en medios de cultivo de Mucorales. Se trata de disponer de una metodología rápida y eficaz de análisis cuali- y semicuantitativo, con el objetivo de avanzar en estudios biosintéticos de apocarotenoides. Una metodología de este tipo, por una parte, debe de ayudar de manera extraordinaria a conocer los resultados de experimentos de biotransformación de intermediarios de la ruta hacia productos finales. Por otra parte, facilitaría estudios rápidos de la evolución del contenido de apocarotenoides en relación con el tiempo o con cambios en otros parámetros de cultivo. Se trataría también de rebajar las cantidades necesarias de extractos para poder identificar productos conocidos y detectar otros nuevos teniendo en cuenta la fórmula molecular y la presencia de agrupaciones funcionales que absorban en el UV-visible.

V. ANTECEDENTES

1. Mucorales

Los Mucorales son el orden más grande y mejor estudiado de los hongos *Zygomycetos*. Este orden incluye 12–13 familias, 56 géneros y unas 300 especies.⁶ La clasificación de los Mucorales se ha basado tradicionalmente en el desarrollo morfológico, y en sus caracteres ecológicos. Entre todas las familias, destacan las *Phycomycetaceae* y *Choaneforaceae* que incluyen a los géneros *Phycomyces* y *Blakeslea*, respectivamente, que serán los organismos objeto de estudio en esta Memoria.

1.1. *Phycomyces blakesleeanus*

El género *Phycomyces* se ha clasificado en dos especies, *Phycomyces nitens* y *Phycomyces blakesleeanus*, aplicando criterios morfológicos y genéticos.⁷ Su presencia en los trabajos de laboratorio se debe al tamaño de sus esporangióforos y a su fácil manejo. Blakeslee descubrió su reproducción sexual y la de otros Mucorales, e inició el estudio de su genética.⁵ Este tipo de organismos se localiza en ambientes húmedos repartidos por todo el mundo. Ha sido visto sobre la materia orgánica en descomposición, incluidos excrementos de pequeños mamíferos, harinas y residuos vegetales.⁶ Recientemente, ha aumentado el número de estirpes

⁶ (a) Zycha, H.; Siepmann, R.; Linnemann, G. *Blakeslea trispora* Thaxter. *Mucorales*. **1969**, Cramer, Lehre. Alemania. (b) Von Arx, J. A. *Sydowia Ann. Mycol.* **1982**, *35*, 10-26.

⁷ Burgeff, H. *Flora* **1925**, 40-46.

naturales aisladas incubando en el laboratorio excrementos de mamíferos de diferentes partes de la geografía española como zonas húmedas, cársticas y volcánicas. Su peculiaridad más llamativa es el tamaño de sus esporangióforos que permite distinguirlo inmediatamente de otros microorganismos (Figura 4).

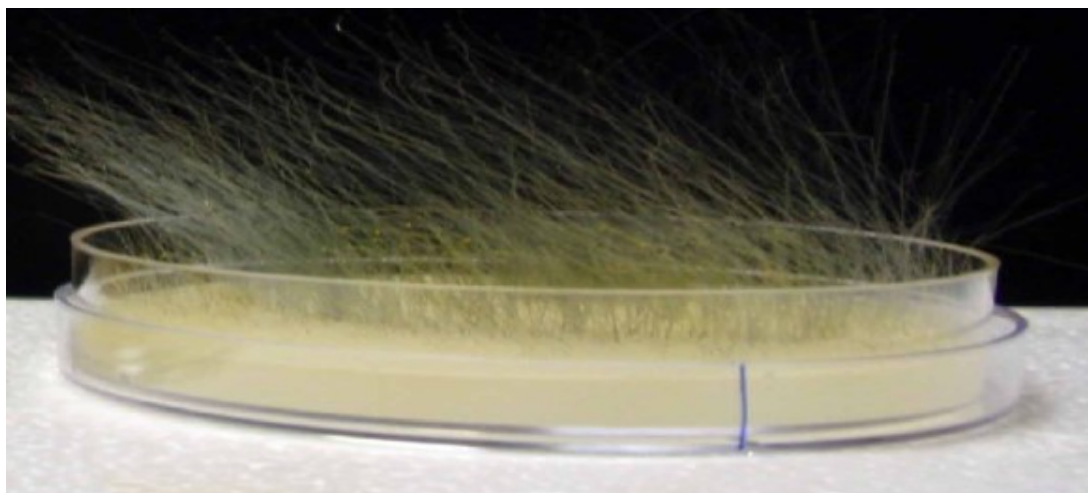


Figura 4. Esporangióforos en *Phycomyces blakesleeanus*.

Hace medio siglo las investigaciones con *Phycomyces* recibieron un gran impulso gracias a la dedicación y al empeño del premio Nobel Max Delbrück por encontrar la base de su comportamiento.⁸ *Phycomyces* ofrece actualmente las potentes aplicaciones de los heterocariontes (células con dos o más núcleos diferentes), métodos optimizados para el aislamiento de mutantes, protocolos rutinarios para los cruzamientos, construcción de mapas y otras técnicas genéticas.³ Una desventaja de este tipo de organismos es que se han conseguido diploides,^{9,10} pero no una transformación estable, ya que responden a la entrada de ADN exógeno con una destrucción masiva de ADN, incluyendo el propio.¹¹

⁸ Meissner, G.; Delbrück, M. *Plant Physiol.* **1968**, *43*, 1279-1283.

⁹ Las células diploides son las células que tienen un número doble de cromosomas (a diferencia de los gametos), es decir, poseen dos series de cromosomas.

¹⁰ Mehta, B. J.; Cerdá-Olmedo, E. *Genetics* **2001**, *158*, 635-641.

¹¹ Obratzsova, I. N.; Prados, N.; Holzmann, K.; Ávalos, J.; Cerdá-Olmedo, E. *Fungal Genet. Biol.* **2004**, *41*, 168-180.

1.2. *Blakeslea trispora*.

Blakeslea pertenece a la familia *Choanephoraceae* del mismo orden y clase que *Phycomyces*, sin embargo este hecho no implica el grado de parecido que se da entre plantas de un mismo orden. El género *Blakeslea* es tan próximo a *Choanephor* que algunos autores los reúnen en uno solo.^{6,12} *Blakeslea trispora* es la especie más frecuente en los laboratorios y la única usada en la industria (Figura 5). Se encuentra sobre todo en regiones tropicales como un parásito débil de las hojas de las plantas, pero no es un patógeno, sino un oportunista.¹³

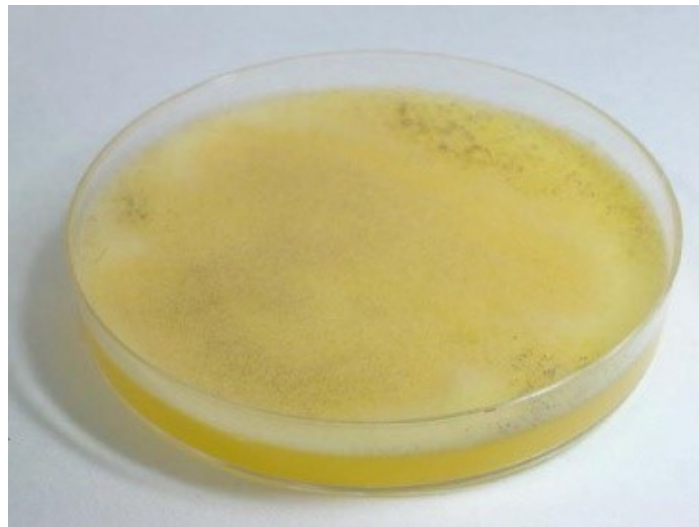


Figura 5. Cultivo de *Blakeslea trispora*.

Phycomyces y *Blakeslea*, como los Mucorales en general, presentan dos ciclos de vida, asexual (o vegetativo) y sexual, que consisten en una sucesión de fases diferentes en morfología, bioquímica, fisiología y comportamiento.

¹² (a) Thaxter, R. *Botanical Gazette* **1914**, 58, 353-366. (b) Currey, J. *Linn. Soc. Bot.* **1873**, 13, 578.

¹³ Webster, J. *Introduction to fungi*, **1993**, Cambridge University Press, Cambridge.

2. Ciclo asexual o vegetativo:

Ambos hongos se reproducen vegetativamente por medio de esporas multinucleadas que dan lugar a micelios formados por hifas cilíndricas (de 10 a 20 μm de diámetro), ramificadas y no tabicadas. En cultivos en medio líquido con agitación, los micelios aparecen como masas miceliales esféricas, mientras que en medio sólido o líquido sin agitación se extienden superficialmente a una velocidad de unos 2 cm por día y desarrollan hifas aéreas especializadas en la esporulación, llamadas esporangióforos.

2.1. Phycomyces.

Las esporas vegetativas de la estirpe patrón NRRL1555 de *Phycomyces blakesleeanus* son elipsoidales, con un tamaño medio de 9 μm de largo por 6 μm de ancho (Figura 4). Contienen entre 1 y 6 núcleos, aunque más del 80% son tri- o tetranucleadas.¹⁴

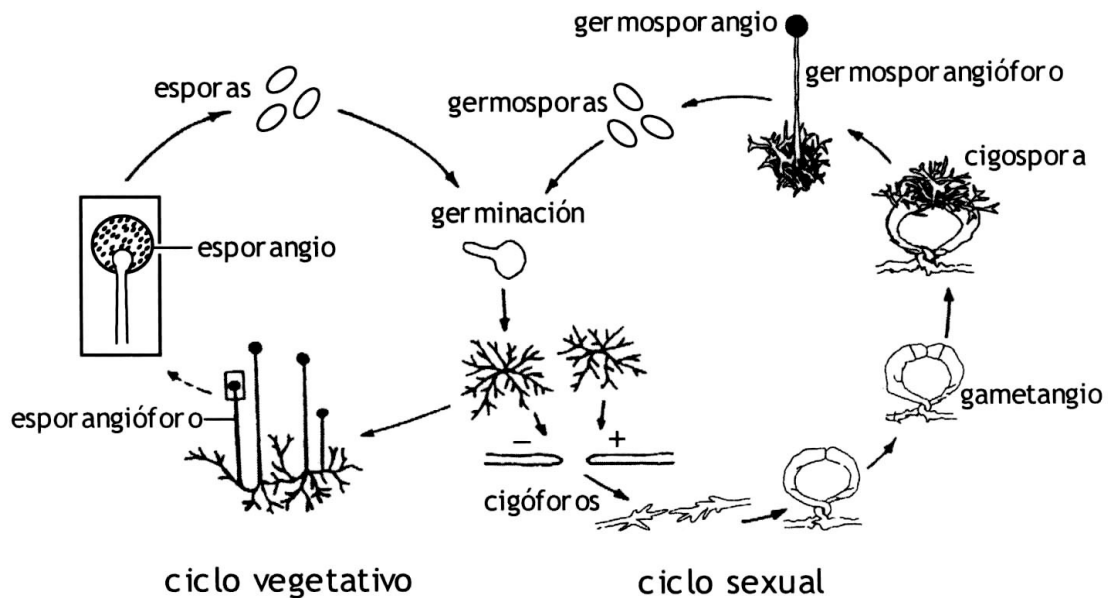


Figura 6. Ciclos de vida de *Phycomyces blakesleeanus*.

¹⁴ Heisenberg, M.; Cerdá-Olmedo, E. *Mol. Gen. Genet.* **1968**, *102*, 187-195.

Estas esporas se inoculan y se activan en un medio que permita un crecimiento y desarrollo normales, germinando así varias cada día (Figura 6).¹⁵ Sin embargo, un breve choque térmico o la exposición a determinadas sales como acetato o propionato, activa la germinación masiva.¹⁶ Tras dicha germinación, las esporas producen micelios formados por hifas cilíndricas, ramificadas, multinucleadas y no tabicadas. Las hifas aéreas producidas en medios sólidos o líquidos sin agitación, también llamadas esporangióforos, sobresalen del micelio y son de varios centímetros, formando en su extremo distal un esporangio que contiene usualmente unas 10^5 esporas. Estas esporas son liberadas al romperse la pared del esporangio cuando se seca o choca con alguna superficie. Puesto que existen dos sexos; cuando los micelios de cada sexo se encuentran, se desencadena una serie de acontecimientos bioquímicos y morfológicos que dan lugar a la formación de cigosporas. Tras un período de latencia de varios meses, la cigospora germina produciendo un germosporangióforo con su germosporangio y sus germosporas.

2.2. Blakeslea:

Las esporas de *Blakeslea trispora* tienen como media cinco (estirpe F986) ó seis núcleos (estirpe F921) y germinan espontáneamente en un medio apropiado.¹⁷ Para el ciclo vegetativo existen dos tipos de estructuras en la dispersión de esporas, los esporangios y esporangiolos (Figura 7).

¹⁵ Rivero, F.; Cerdá-Olmedo, E. *Exp. Mycol.* **1994**, *18*, 221-229.

¹⁶ (a) Robbins, W. J.; Kavanagh, V. W.; Kavanagh, F. M. *Bot. Gaz.* **1942**, *104*, 224-242. (b) Borchert, R. *Beitr. Biol. Pflanz.* **1963**, *38*, 31-61. (c) Van Mulders, R. M.; Van Laere, A. J.; Verbeke, M. N. *Biochem. Physiol. Pflanzen* **1986**, *181*, 103-115. (d) Van Laere, A. J.; Furch, B.; Van Assche, J. A. *Phycomyces*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, USA. **1987**, 247-279.

¹⁷ Mehta, B. J.; Obratsova, I. N.; Cerdá-Olmedo, E. *Appl. Environm. Microbiol.* **2003**, *69*, 4043-4048.

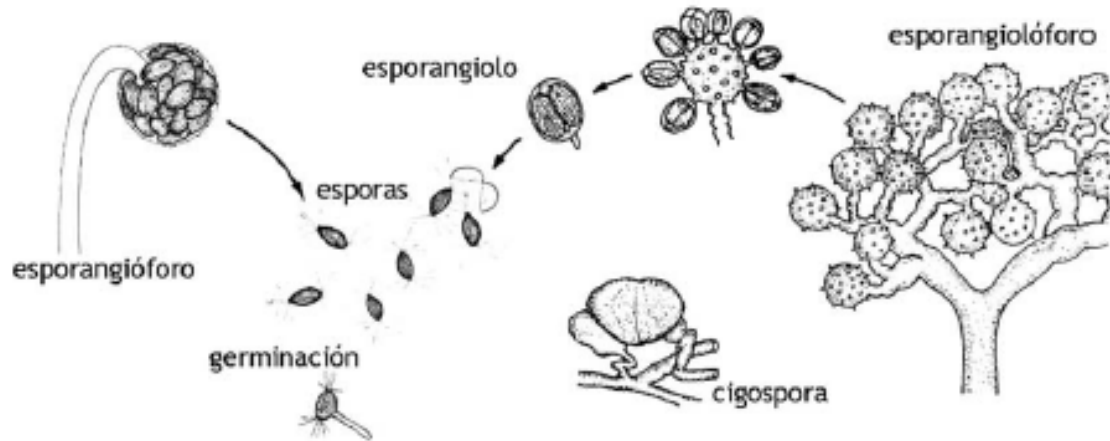


Figura 7. Principales estructuras en *Blakeslea trispora*.⁷

Los esporangiolos suelen tener entre tres y seis esporas. Las esporas de los esporangiolos y los esporangios son muy parecidas, marrón, rayadas longitudinalmente y con prolongaciones fibrilares en ambos extremos. Tienden a formar agregados, que deben disgregarse por tratamiento con detergentes antes de las siembras. Según Weber y Wolf, los esporangióforos de *Blakeslea* son muy fototrópicos.¹⁸

¹⁸ Weber, G. F.; Wolf, F. A. *Mycologia* **1927**, *19*, 302-307.

3. Ciclo sexual:

La sexualidad de *Phycomyces* y de otros Mucorales fue descubierta por Blakeslee introduciendo dos tipos sexuales, (+) y (-), indistinguibles morfológicamente y sólo identificables por su reacción mutua.⁵ *Phycomyces* es isogámico, es decir, ambos sexos contribuyen simétricamente al proceso sexual.¹⁹ Las asignaciones (+) y (-) se extienden a muchas especies de Mucorales ya que existen reacciones parciales interespecíficas. Estas reacciones indican que las primeras fases del desarrollo sexual son comunes para todos los Mucorales. Cuando se encuentran micelios de diferente sexo, incrementan la producción de carotenos intensificando su coloración y desarrollando unas hifas especializadas llamadas cigóforos (Figura 6). Burgeff demostró que el desarrollo sexual de estirpes de sexos opuestos se inicia con el intercambio de señales químicas.²⁰

Los cigóforos contactan con los del sexo contrario, crecen juntos en el aire, engrosando considerablemente y adoptando finalmente una disposición en tenazas, en la que cada mitad está compuesta por la región distal de un cigóforo, el progametangio. Una pared transversal tabica los ápices de cada progametangio, separando una célula llamada gametangio; la parte restante se llama suspensor. La fusión de dos gametangios origina una sola célula, la cigospora, con citoplasma y núcleos haploides aportados por ambas estirpes. Esta estructura sexual, una vez madura, es esférica, negra, mide unos 0.5 mm de diámetro y está rodeada por espinas negras ramificadas procedentes de los suspensores. La cigospora permanece en latencia durante meses antes de germinar produciendo un germosporangióforo, con su germosporangio y sus germospora. Las germosporas dan lugar a micelios vegetativos de ambos sexos.

¹⁹ Spalla, C. *Riv. Patol. Veg.* **1963**, 3, 189-198.

²⁰ Burgeff, H. *Bot. Abh.* **1924**, 4, 1-135.

4. Interacción sexual:

Muchos Mucorales²¹ y otros Zigomicetos, como los *Mortierelales*²² comparten su regulación y sus bases moleculares de los procesos sexuales, incluyendo las señales químicas iniciales. Estas señales químicas, llamadas feromonas, estimulan la actividad sexual. M. Plempel descubrió que los cultivos separados (+) y (-) de *Mucor mucedo* contienen feromonas que estimulan el desarrollo de cigóforos solo en cultivos de sexo opuesto.²³ En 1963, este mismo autor, intentó purificar dos feromonas de cultivos mixtos, pero en su lugar purificó un compuesto cristalizado que estimulaba el desarrollo de cigóforos en ambos sexos.²⁴ En 1964, investigadores de Italia y EE.UU emprendieron simultáneamente este estudio químico hasta que L. Caglioti y sus colaboradores identificaron ácidos trispóricos en cultivos mixtos de *Blakeslea trispora* como los compuestos que estimulan la carotenogénesis en cultivos separados de ambos sexos.²⁵ Los ácidos trispóricos también estimulan el desarrollo de cigóforos en cultivos separados (+) y (-) de *Mucor mucedo*.²⁶ Además, los cultivos separados (+) y (-) de *Blakeslea trispora* contienen precursores que son convertidos a ácidos trispóricos sólo por cultivos de sexo opuesto.²⁷ Esto sugiere que las feromonas son precursoras metabólicas inmediatas de las hormonas sexuales, los ácidos trispóricos.

²¹ Sutter, R. P. *Phycomyces*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, USA **1987**, 317-336.

²² Schimek, C.; Kleppe, K.; Saleem, A. R.; Voigt, K.; Burmester, A.; Wostemeyer, J. *Mycol. Res.* **2003**, *107*, 736-747.

²³ Plempel, M. *Arch. Mikrobiol.* **1957**, *26*, 151-174.

²⁴ Plempel, M. *Planta* **1963**, *59*, 492-508.

²⁵ Caglioti, L.; Cainelli, G.; Camerino, B.; Mondelli, R.; Prieto, A.; Quilico, A.; Salvatori, T.; Selva, A. *Tetrahedron Suppl.* **1966**, *22*, 175-187.

²⁶ Van den Ende, H. J. *Bacteriol.* **1968**, *96*, 1298-1303.

²⁷ (a) Sutter, R. P. *J. Gen. Microbiol.* **1970**, *64*, 215-221. (b) Sutter, R. P.; Capage, D. A.; Harrison, T. L.; Keen, W. A. *J. Bacteriol.* **1973**, *114*, 1074-1082. (c) Sutter, R. P.; Harrison, T. L.; Galazko, G. *J. Biol. Chem.* **1974**, *249*, 2282-2284. (d) Werkman, B. A.; Van den Ende, H. J. *J. Gen. Microbiol.* **1974**, *82*, 273-278.

5. Trisporoides: Generalidades

Los carotenoides son un subgrupo de compuestos isoprenoides que actualmente alberga alrededor de unas 700 estructuras.²⁸ La amplia mayoría de carotenoides son derivados del tetraterpeno lineal fitoeno (C40), aunque existen otros con 30 carbonos (C30) y 50 carbonos (C50). Se definen como “apocarotenoides” (apo significa “a partir de”) los metabolitos originados por degradación de carotenos mediante la pérdida de átomos de carbono de la cadena lineal por medio de reacciones oxidativas.²⁹ El enorme número de apocarotenoides que se encuentran en la naturaleza se debe a la gran cantidad de precursores carotenoides, variaciones en el sitio de oxidación en la cadena, y modificaciones funcionales.³⁰ De ellos, uno de los grupos más interesantes lo constituyen los Trisporoides.^{1a,b} Estos compuestos son metabolitos originados por Mucorales mediante degradación de β -caroteno. Esta degradación puede ocurrir por mecanismos no específicos tales como la oxidación (foto)química o la oxidación mediante enzimas no específicas en las que se incluyen las lipoxigenasas y peroxidasas, aunque estos mecanismos aún no están muy claros.³¹

Según su estructura química, los trisporoides se pueden clasificar en dos grupos (Esquema 2):

1. Trisporoides propiamente dichos, que contienen 18 átomos de carbono (C18) y son β -13-apocarotenos.
2. Apotrisporoides o monociclofarnesoides, que contienen 15 átomos de carbono (C15) y son β -11-apocarotenos.

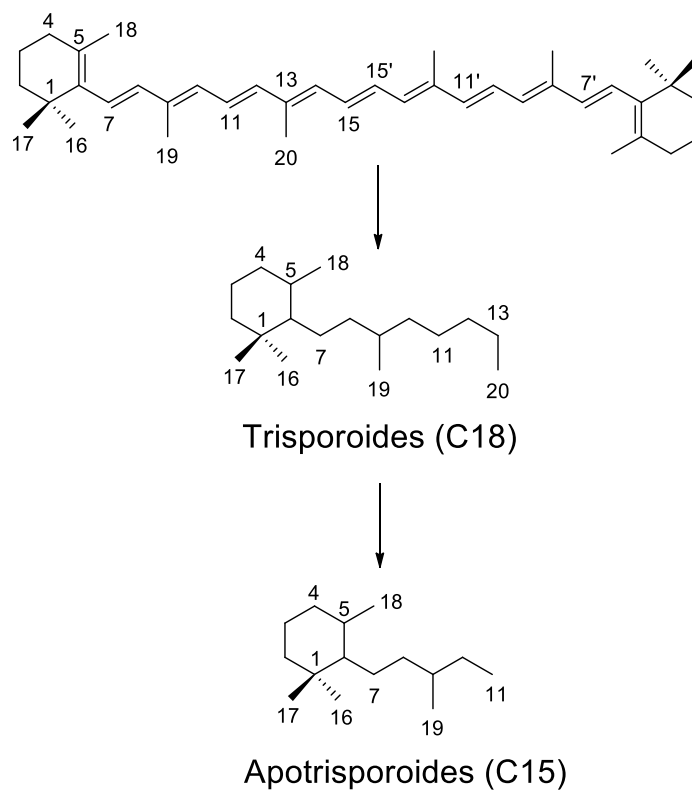
²⁸ (a) Britton, G. *Carotenoids*, Vol. 4, *Natural functions*, Birkhauser, Basel, Switzerland, **2008**. (b) Lu, S.; Li, L. *J. Integr. Plant Biol.* **2008**, *50*, 778-785. (c) Maresca, J. A.; Graham, J. E.; Bryant, D. A. *Photosynth. Res.* **2008**, *97*, 121-140. (d) Takaichi, S.; Mochimaru, M. *Cell. Mol. Life Sci.* **2007**, *64*, 2607-2619.

(d) Ye, Z. W.; Jiang, J. G.; Wu, G. H. *Biotechnol. Adv.* **2008**, *26*, 352-360.

²⁹ Marasco, E. K.; Vay, K.; Schmidt-Dannert, C. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 31583-31593.

³⁰ Schwartz S.; Qin X.; Zeevart J. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 25208-25211.

³¹ Carail, M.; Caris-Veyrat, C. *Pure Appl. Chem.*, **2006**, *78*, 1493-1503.



Esquema 2. Estructuras de los diferentes apocarotenoides.

Se conocen 5 familias de trisporoides designadas por las letras A-E según las funciones oxigenadas presentes en las posiciones C-2, C-3 y C-13 (Figura 8).^{3a} Se describen 5 grupos de trisporoides dentro de cada familia, según sea -R y la naturaleza de la función oxigenada en C-4 del anillo.

Familia	C-2	C-3	C-13
A	H, H	H, H	H, H
B	H, H	H, H	C=O
C	H, H	H, H	OH, H
D	OH, H	H, H	C=O
E	H, H	OH, H	OH, H

Figura 8. Familias de trisporoides.

Un ejemplo de los grupos de trisporoides de una de estas familias se muestra en la Figura 9:

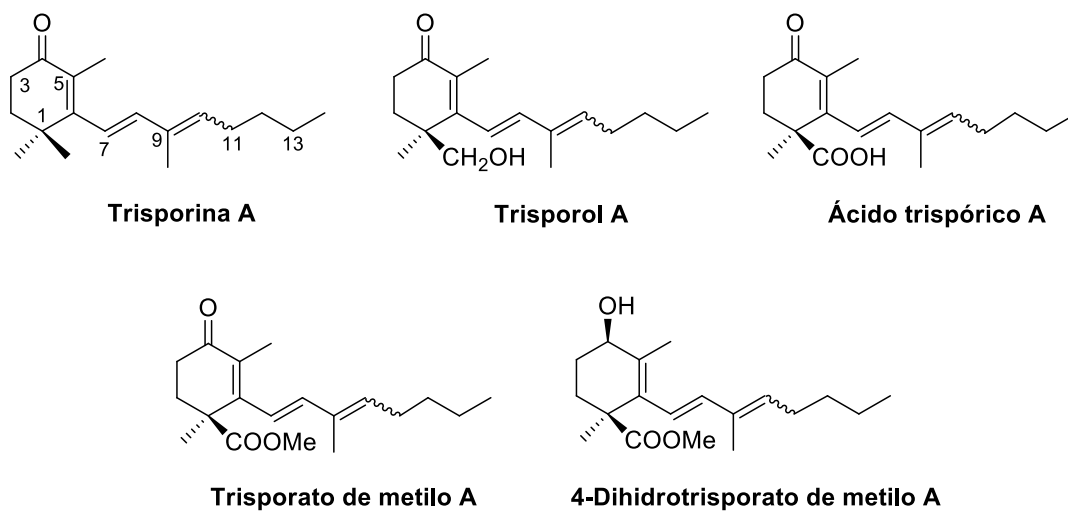
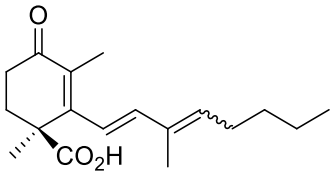
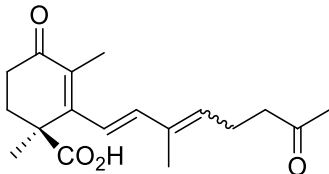
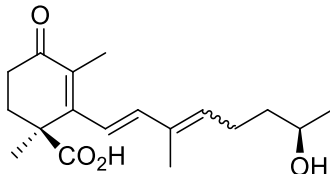
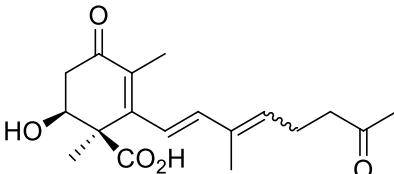
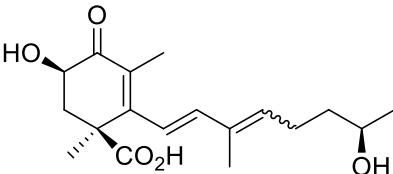
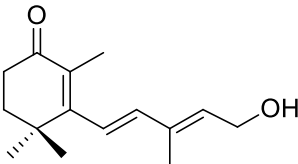
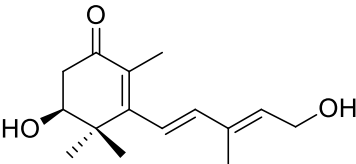
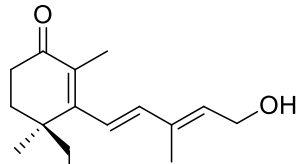
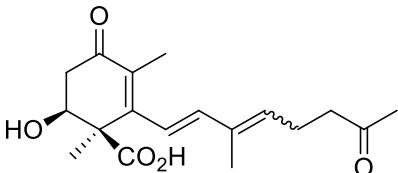
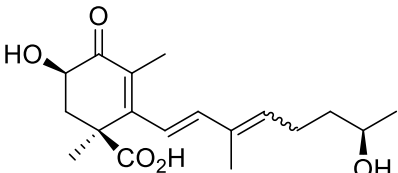
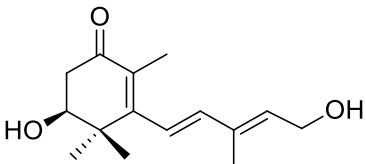


Figura 9. Ejemplos de los diferentes trisporoides de la familia A.

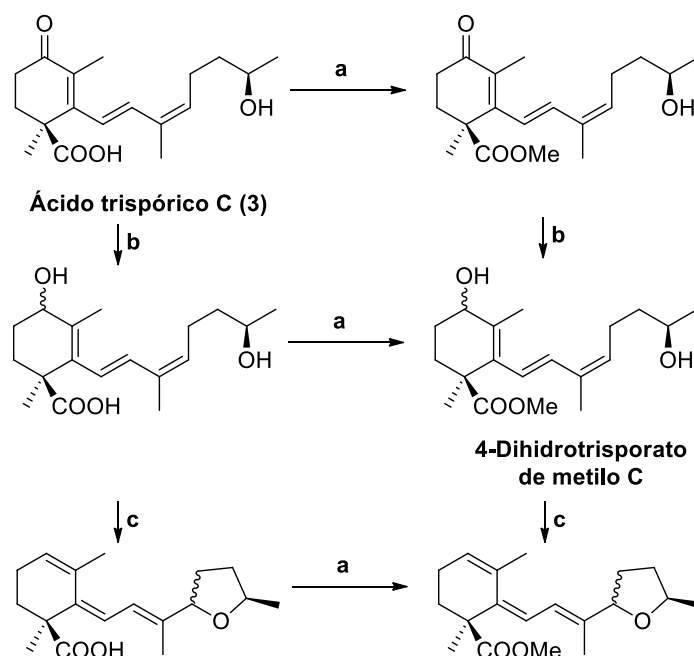
Muchos de estos metabolitos han sido aislados, purificados e identificados en diferentes cultivos de Mucorales, y algunos de ellos sintetizados químicamente. A continuación, se resume en la Tabla 1 los trisporoides encontrados en *Phycomyces blakesleanus* y *Blakeslea trispora*:

Tabla 1. Tabla resumen de los metabolitos encontrados en Mucorales.

METABOLITOS ENCONTRADOS EN MUCORALES		
<i>Blakeslea trispora</i>		
		
Ácido trispórico A ³²	Ácido trispórico B ²⁵	Ácido trispórico C ²⁵
		
Ácido trispórico D ³⁴	Ácido trispórico E ³⁴	
		
Apotrisporina ³³	Apotrisporina E ³⁵	Apotrisporol ³³
<i>Phycomyces blakesleanus</i>		
		
Ácido trispórico D ³⁴	Ácido trispórico E ³⁴	
		
Apotrisporina E ³⁵		

6. Síntesis Química de Apocarotenoides:

El desarrollo de metodologías para la síntesis de trisporoides se ha debido fundamentalmente a la necesidad de la confirmación de su estructura, como ha sucedido en el caso de los ácidos trispóricos B y C, sintetizados inicialmente por diferentes grupos de investigación en las décadas de los 70 y 80.³⁶ No obstante, hasta la fecha parece más sencillo la obtención de los ácidos trispóricos B y C a partir de cultivos mixtos de (+) y (-) *Blakeslea trispora* se puede emplear para efectuar semisíntesis. Así, ácido trispórico C (**3**) natural se ha utilizado por ejemplo para sintetizar varios trisporoides (Esquema 3) identificados en cultivos de la estirpe (+) de *Blakeslea trispora*.³⁷ El 4-dihidrotrisporato de metilo C se prepara en dos etapas desde **3** con un 85% de rendimiento.



a. TMSCHN₂. b. NaBH₄. c. deshidratación en medio ácido.

Esquema 3.

³² Bu'lock, J. D.; Drake, D.; Winstanley, D. J. *Phytochemistry* **1972**, *11*, 2011-2018.

³³ Cainelli, G.; Grasselli, P.; Selva, A. *Chim. Ind.* **1967**, *49*, 628-629.

³⁴ Sutter, R. P.; Dadok, J.; Bothner-By, A. A.; Smith, R. R.; Mishra, P. K. *Biochemistry* **1989**, *28*, 4060-4066.

³⁵ Sutter, R. P. *Exp. Mycol.* **1986**, *10*, 256-258.

³⁶ (a) Edwards, J. A.; Schwarz, V.; Fajkos, J.; Maddox, M. L.; Fried, J. H. *J. Chem. Soc. D* **1971**, *7*, 292-293.

(b) Isoe, S.; Hayase, Y.; Sakan, T. *Tetrahedron Lett.* **1971**, *40*, 3691-3694. (c) Prisbylla, M. P.; Takabe, K.; White, J. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 762-763. (d) Trost, B. M.; Ornstein, P. L. *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 2833-2836.

³⁷ (a) Bu'lock, J. D.; Jones, B. E.; Winskill, N. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1974**, *17*, 708-709. (b) Nieuwenhuis, M.; van den Ende, H. *Arch. Microbiol.* **1975**, *102*, 167-169. (c) Wurzt, T.; Jockush, H. *Mol. Gen. Genet.* **1978**, *159*, 249. (d) Sutter, R. P.; Whitaker, J. P. *Naturwissenschaften* **1981**, *68*, 147-148.

Los trisporoides acumulados en cultivos (-) de *Blakeslea trispora* son más difíciles de preparar. Trisporol C ha sido preparado a partir de ácido trispórico C en cuatro etapas, aunque el procedimiento experimental detallado y los rendimientos no fueron publicados.³² Por otro lado, la síntesis total de trisporol C junto con otros derivados ha sido llevada a cabo en 11 etapas^{36c}.

Desde un punto de vista puramente sintético existen varias metodologías para la preparación de este tipo de estructuras y se pueden clasificar en tres grupos:

1. Construcción inicial del correspondiente trimetilciclohexeno base de la molécula y posterior unión de la cadena carbonada necesaria para cada trisporoide concreto, mediante reacciones de acoplamiento, generalmente olefinaciones de Wittig.

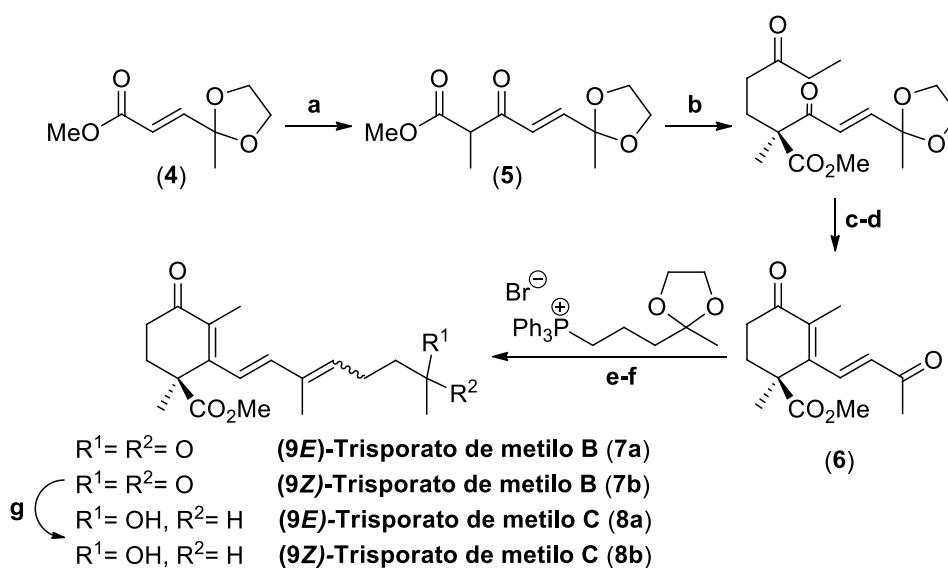
2. Funcionalización en las etapas iniciales de la cadena carbonada de manera adecuada según el compuesto a preparar para, en las últimas etapas, proceder a la ciclación hacia el anillo de seis miembros.

3. En síntesis enantioselectivas, se pueden usar sintones orgánicos con la estructura trimetilciclohexénica ya construida y las configuraciones relativas de cada uno de los centros quirales definidos desde el comienzo de la secuencia.

Dentro del primer grupo de síntesis con formación del anillo previa al acoplamiento de la cadena lateral, en 1971 S. Isoe *et al.*^{36b} publicaron una ruta fácil y eficiente para la síntesis de (9*Z*)- y (9*E*)-trisporato de metilo B partiendo del correspondiente acetal éster insaturado **4** (Esquema 4) preparado a partir del β-acetoacrilato de metilo. Este éster es condensado con propionato de metilo para dar el β-cetoéster **5**, cuyo enolato es tratado con una disolución metanólica de yoduro de dietilmetil(3-oxopentil)amonio y el producto resultante es ciclado en medio básico en una sola reacción aldólica. Tras la hidrólisis del grupo protector, se obtiene el dicetoéster **6**, intermedio en la síntesis de los trisporatos de metilo, a través de la correspondiente olefinación de Wittig. En este caso, el iluro de fósforo

es formado a partir del 5-bromo-pentan-2-ona para rendir casi cuantitativamente la mezcla de isómeros (9*E*)- y (9*Z*)-trisoratos de metilo B (**7a** y **7b**).

Cabe destacar que la reacción de Wittig del dicetoéster ocurre exclusivamente en la cadena carbonada debido a la enolización del grupo carbonilo en el anillo.³⁸ Una reducción selectiva del (9*Z*)-trisorato de metilo B con borohidruro sódico rinde una mezcla diastereomérica del (9*Z*)-trisorato de metilo C.



a. Propionato de metilo, NaH, benceno; b. yoduro de dietilmetil(3-oxopentil)amonio, NaH, benceno; c. NaOMe, MeOH; d. AcOH ac.; e. Fosfonato, BuLi, THF, -50 °C; f. H₃O⁺; g. NaBH₄.

Esquema 4. Síntesis de trisoratos de metilo B y C (**7** y **8**, respectivamente).

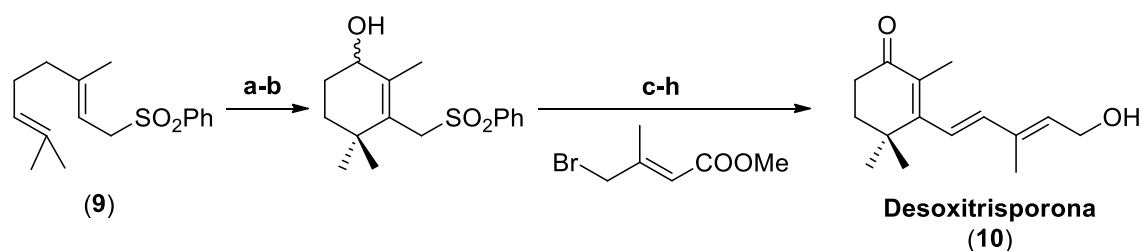
S. Torii y K. Uneyama estudiaron en 1976 el desarrollo de una metodología simple y práctica para la preparación de derivados de ciclocitral adecuadamente funcionalizados. Éstos podrían ser un intermedio versátil para la síntesis de terpenoides biológicamente activos tales como vitamina A y ácido abscísico, entre otros.³⁹ Durante estos estudios realizaron la síntesis de desoxitrisporona (**10**) (Esquema 5) a través de una sulfona cíclica como intermedio clave,⁴⁰ por un

³⁸ Bose, A. K.; Dahill Jr., R. T. *J. Org. Chem.* **1965**, *30*, 505.

³⁹ Devon, T. K.; Scott, A. I. "*Handbook of Naturally Occurring Compounds*", Vol.11, Academic Press, New York and London, **1972**.

⁴⁰ Uneyama, K.; Torii, S. *Tetrahedron Lett.* **1976**, *6*, 443-444.

proceso simple de ciclación de (*E*)-[(3,7-dimetilocta-2,6-dien-1-il)sulfonyl]benceno (**9**) catalizado por ácido sulfúrico. La posterior oxidación con SeO₂ permite la obtención del alcohol correspondiente que es tratado con 2.0 equivalentes de LDA y con (*2E*)-3-metil-4-bromobutenoato de metilo para obtener el compuesto sulfonado acoplado. La desulfonación se realiza con MeONa en *t*-BuOH y tras ser tratado con LiAlH₄ se obtiene el diol correspondiente. Finalmente, una acilación selectiva con anhídrido isobutanoico, oxidación con CrO₃ e hidrólisis en KOH-MeOH permite obtener la desoxitrisporona deseada **10**.



a. H⁺; b. SeO₂, dioxano, 80 °C, 74%; c. LDA, THF, -78 °C, 76%; d. MeONa, *t*-BuOH, ta, 90%; e. LiAlH₄, 90%; f. Anhídrido isobutanoico, piridina, 90%; g. CrO₃, piridina, 15 °C, 80%; h. KOH-MeOH, ta.

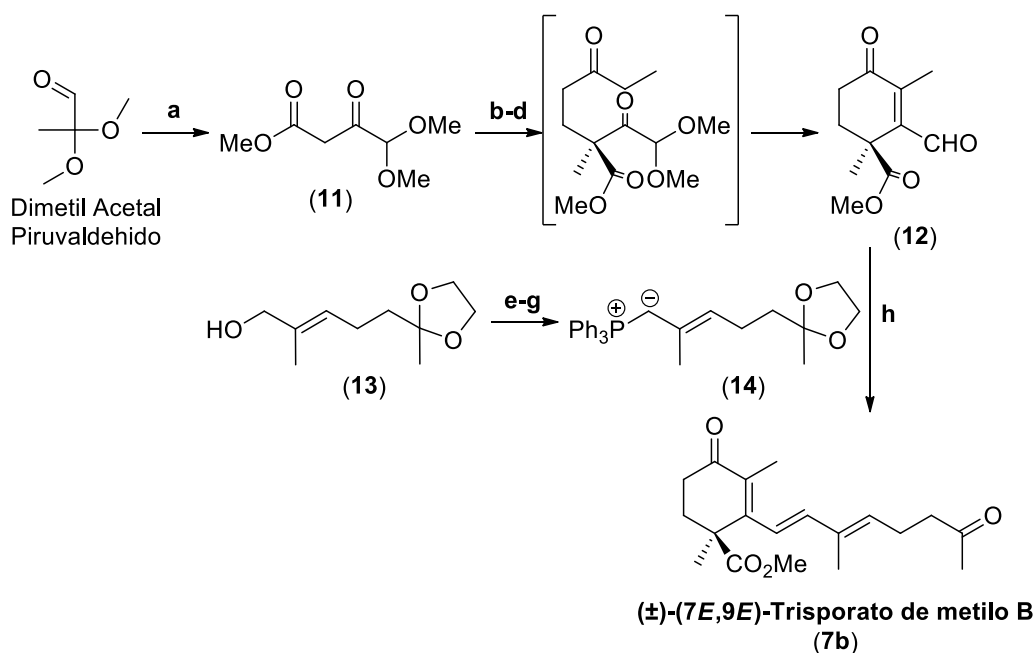
Esquema 5. Síntesis de desoxitrisporona (**10**).

En 1977 J. A. Secrist III *et al.*⁴¹ publicaron la síntesis convergente del (\pm)-(7*E*,9*E*)-trisorato de metilo B (**7b**), teniendo en cuenta que la característica más notable de esta molécula es la parte del anillo de ciclohexenona, al cual se puede acceder a partir de una secuencia Michael-aldólica. Contrariamente a trabajos anteriores,^{36a,b} se ha intentando construir el esqueleto cíclico lo más rápido posible, antes de acoplar el fragmente en C-6. Para ello, eligieron el aldehído **12** y la sal de fosfonio **14** (Esquema 6), ambos disponibles en pocos pasos y que son acoplados por una reacción de Wittig,⁴² accediendo directamente al producto objetivo. El aldehído **12** se preparó desde el acetal dimetilico del pirivaldehído obteniendo el β -cetoéster metilado **11** como se indica en el esquema 9. Este intermedio reacciona con etilvinilcetona para proceder a la ciclación en medio básico con NaOMe. Por otra parte, la síntesis de la sal de fosfonio **14** se realizó a

⁴¹ Secrist III, J. A.; Hickey, C. J.; Norris, R. E. *J. Org. Chem.* **1976**, *42*, 525-527.

⁴² Pommer, H. *Angew. Chem.* **1960**, *72*, 811-819.

través del alcohol **13**, disponible en tres etapas desde 6-metil-5-hepten-2-ona comercial. La adición de PBr_3 a una disolución de **13** en 2,4,6-colidina da el bromuro alílico inestable, que es rápidamente disuelto en éter y calentado a reflujo con PPh_3 toda la noche para obtener así la sal incolora **14**. Finalmente, el iluro generado se condensa con el aldehído **12** y la desprotección del acetal con HCl al 5% origina (\pm)-(7*E*,9*E*)-trisorato de metilo B (**7b**) que es purificado por cromatografía en capa fina preparativa rindiendo un 28% en los dos últimos pasos.



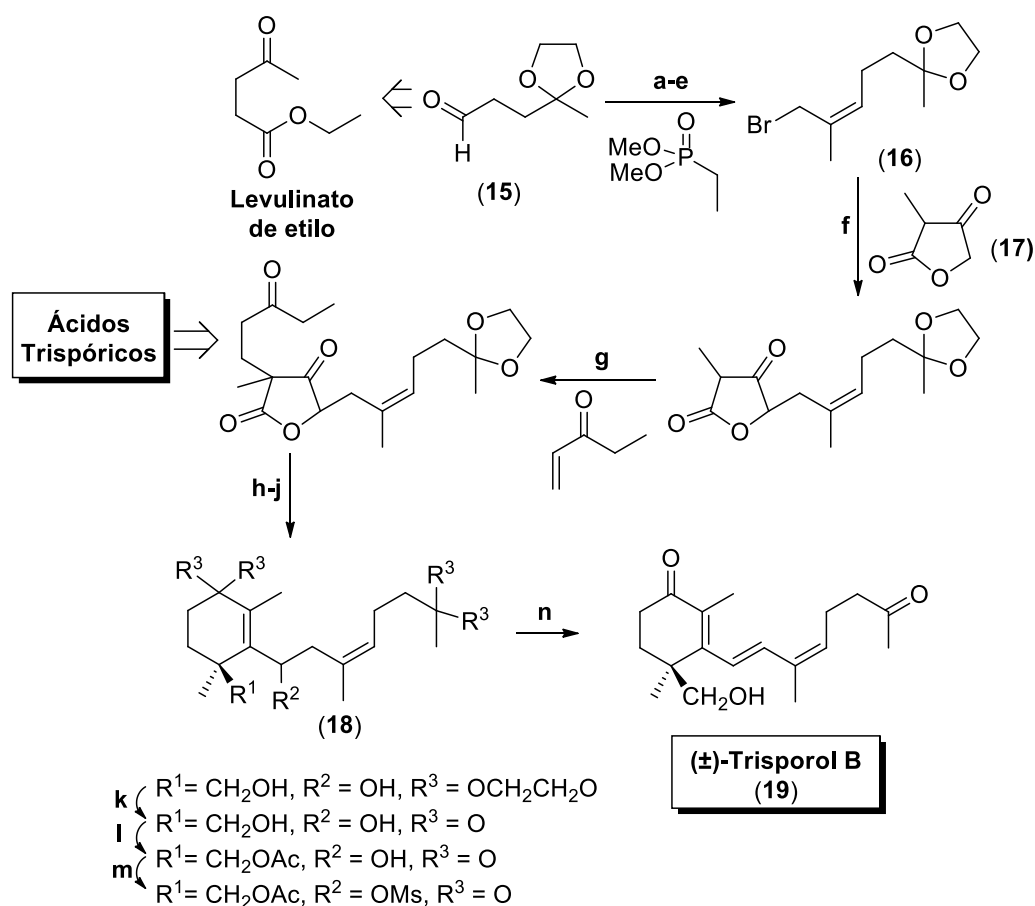
a. NaH , Me_2CO_3 ; b. NaH , MeI ; c. i. NaOMe , MeOH , etilvinilcetona, ii. NaOMe , MeOH , 45%; d. H_3O^+ ; e. PBr_3 , 2,4,6-colidina; f. PPh_3 , reflujo; g. Tratamiento básico; h. HCl 5%.

Esquema 6. Síntesis de (\pm)-(7*E*,9*E*)-trisorato de metilo B (**7b**).

En 1979, J. D. White *et al.* llevaron a cabo la síntesis estereoespecífica del (\pm)-trisorol B (**19**) (Esquema 7) y ácidos trispóricos relacionados, con el objetivo de emplearlos como elementos clave en la elucidación del proceso sexual de los hongos Mucorales.^{36c} El requisito para la estereoquímica 9*Z* en **19**, junto con la definida geometría del fragmento olefínico en los ácidos y ésteres trispóricos, dirigieron la estrategia de una forma diferente a síntesis anteriores de estos metabolitos. Así inicialmente, se preparó una unidad funcionalmente equivalente

al fragmento C8–C14 del (±)-trisorol B (**19**), desde el aldehído **15**. Éste es asequible desde levulinato de etilo,^{36a} que tratado con etiliditriphenilfosforano y paraformaldehído conduce a un alcohol primario adecuadamente funcionalizado. La transformación al derivado bromado **16** y su posterior reacción con **17** (procedente del ácido α -metiltetrónico),⁴³ permite obtener el sintón adecuado para realizar la anelación con etilvinilcetona dando **18**. Para llegar al (±)-trisorol B (**19**) deseado, la ciclohexenona **18** es desprotegida con *p*-TsOH, reducida con LiAlH₄ e hidrolizada con una disolución de AcOH acuoso para obtener el diol correspondiente. El grupo hidroxilo alílico en la cadena sorprendentemente resiste a varias condiciones de deshidratación, así pues, se acetiló selectivamente el alcohol primario para posteriormente mesilar el secundario. El tratamiento de este mesil derivado volvió a resistir condiciones ácidas y básicas de eliminación, sin embargo, cuando se calienta a 80 °C en Me₂SO, se forma el trieno con un moderado rendimiento del 34%. Finalmente, la saponificación con K₂CO₃ metanólico produce el trisorol B (**19**).

⁴³ Knight, D. W.; Pattenden, G. J. *Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1975**, 635-640.



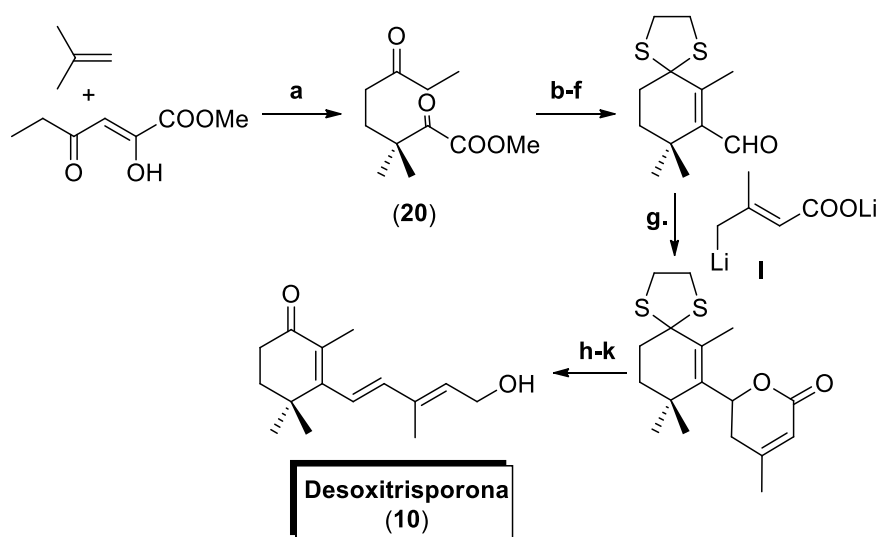
a. THF, fosfonato, $-78\text{ }^\circ\text{C}$; b. *n*-BuLi, paraformaldehido, $0\text{ }^\circ\text{C}$, 69%; c. i. MeLi, Et₂O:HMPA (3:1), TsCl, $0\text{ }^\circ\text{C}$, 82%; d. LiCl, ta; e. NaBr, DMF, ta, 85%; f. i. NaH, THF-HMPA (1:1); ii. *n*-BuLi; g. Et₃N, THF, etilvinilcetona, 97%; h. TsOH, Benceno, reflujo, 59%; i. Etilenglicol, HC(OEt)₃, TsOH, ta; j. LiAlH₄, THF:Et₂O; k. AcOH, H₂O; l. Ac₂O, piridina, ta, 56%; m. MsCl, piridina, 90%; n. i. Me₂SO, $80\text{ }^\circ\text{C}$, 34%; ii. K₂CO₃, H₂O:EtOH, ta, 98%.

Esquema 7. Síntesis de (±)-trisporol B (19).

En 1984 se llevó a cabo la síntesis de desoxitrisporona (10) mediante el empleo, en este caso para la formación del trimetilciclohexeno, de una etapa clave inicial de ciclación aldólica del correspondiente intermedio 20. Este es obtenido por fotoadición 2+2 regiodirigida de isobuteno y 2,4-dioxohexanoato de metilo y consiguiente cicloversión del ciclobutanol resultante (Esquema 8).⁴⁴ El tratamiento de 20 con *p*-TsOH da lugar al ciclo con funcionalización de cetona α,β -insaturada, que es posteriormente protegida con 1,2-etanoditiol y cuyo metil éster es transformado en aldehído. La homologación de la cadena lateral en esta secuencia se produce entre dicho aldehído y el dianión generado desde el ácido 3-

⁴⁴ Takeshita, H.; Hatta, S.; Hatsui, T. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1984**, *57*, 619-620.

metil-2-butenoico. Se obtiene una δ -lactona que es convertida a un trienoéster metílico con estereoquímica $2Z,4E$ por tratamiento con NaOMe (Esquema 8). La isomerización del doble enlace 2,3 a la estereoquímica E por tratamiento con I_2 , seguido de la reducción con $LiAlH_4$ y desprotección con $AgNO_3$ originó desoxitrisporona (**10**).



a. $h\nu$, 56%; b. TsOH; c. $NaBH_4$; d. 1,2-Etanoditiol, BF_3 ; e. $LiAlH_4$; f. Reactivo de Colling; g. LDA, **1**, -30 °C, 74%; h. NaOMe; i. I_2 , benceno; j. $LiAlH_4$; k. $AgNO_3$.

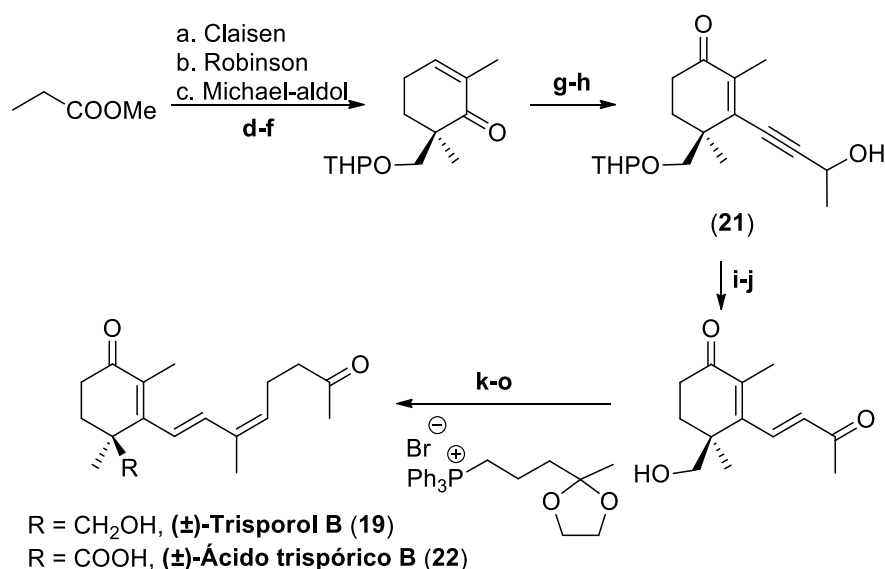
Esquema 8. Síntesis de desoxitrisporona (**10**).

En 1987 S. Takahashi *et al.* afrontaron la preparación de (\pm)-trisorol B (**19**) a partir de (\pm)-6-hidroximetil-2,6-dimetil-2-ciclohexen-1-ona, un intermedio clave muy útil para la síntesis de productos naturales (Esquema 9).⁴⁵ Este sintón ha sido sintetizado a partir de propionato de metilo, vía condensación de Claisen en presencia de NaH seguido de anelación de Robinson con acroleína, reducción con $LiAlH_4$ y oxidación por MnO_2 . Después de proteger el alcohol con 2,3-dihidropirano, se lleva a cabo el acoplamiento con el derivado de litio del 1-metil-2-propinil tetrahidropiranyl éter para dar el alcohol acetilénico **21**.⁴⁶ La oxidación con PCC dio como resultado la correspondiente dicetona α,β -insaturada, la cual se hidroliza con PPTS y se reduce con Red-Al®. El dien-triol inestable se oxida con MnO_2 , se acetila con anhídrido acético y se condensa con el iluro de fósforo

⁴⁵ Takahashi, S.; Oritani, T.; Yamashita, K. *Agric. Biol. Chem.* **1987**, *51*, 1143-1147.

⁴⁶ Do, U. H.; Sprecher, H. *Chem. Phys. Lipids* **1976**, *16*, 255-266.

formado desde bromuro de 3-(2-metil-1,3-dioxolan-2-il)propiltrifenilfosfonio rindiendo una mezcla 1:1 (*E:Z*) del correspondiente acetal. Finalmente, el acetal es desprotegido con una disolución acuosa de HCl en THF y el acetato con K₂CO₃ metanólico para obtener una mezcla 1:1 de (±)-(7*E*,9*Z*)-trisorporol B (**19b**) y (±)-(7*E*,9*E*)-trisorporol B (**19a**).



a. NaH, benceno, 87%; b. Acroleína, Tritón B, benceno; c. NaOMe, MeOH, 69%; d. LiAlH₄, éter; e. MnO₂, CHCl₃, 87%; f. 2,3-dihidropirano, PPTS, DCM; g. 1-metil-2-propinil de litio, 94%; h. PCC, DCM; i. PPTS, etanol, 85%; j. Red-Al®, THF; k. MnO₂, DCM; l. Ac₂O, piridina; m. Wittig, n. HCl acuoso; o. K₂CO₃, MeOH.

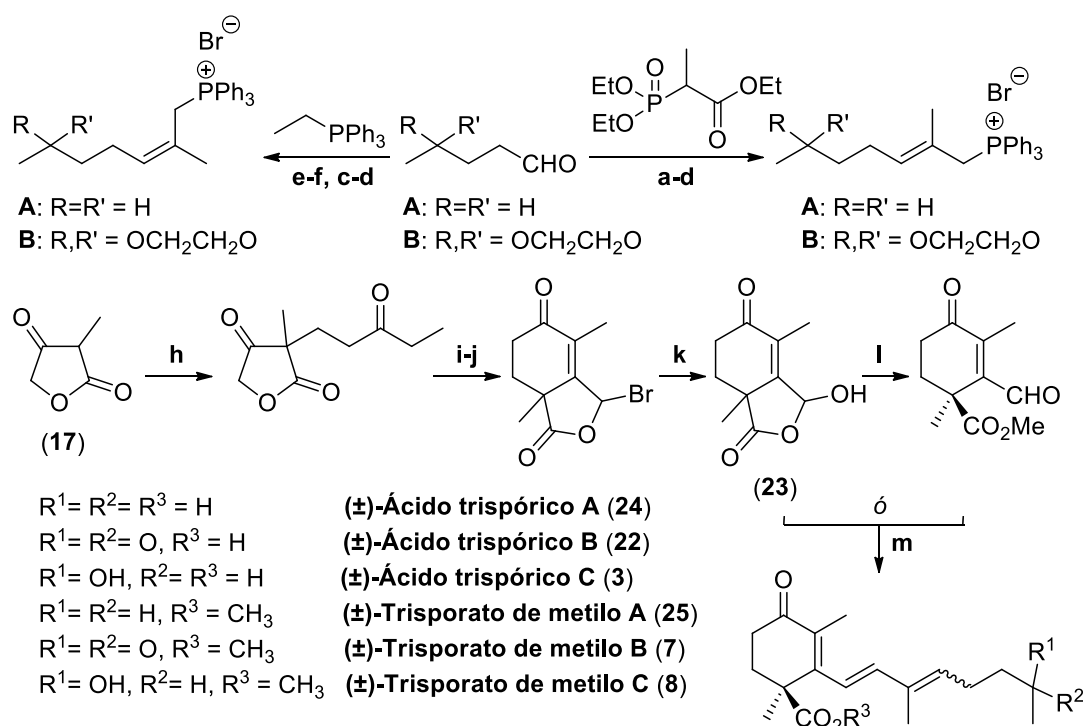
Esquema 9. Síntesis de (±)-trisorporol B (**19**) y (±)-ácido trispórico B (**22**).

La síntesis estereoselectiva de los ácidos trispóricos A (**24**) y B (**22**), y sus metil ésteres (**25** y **7**) se llevó a cabo en 1985 por J. D. White *et al.*⁴⁷ Las síntesis de (9*E*)- y (9*Z*)-ácidos trispóricos A y B, y los correspondientes metil ésteres fueron llevadas a cabo vía reacción de Wittig de un sintón lactol (**23**) (Esquema 10) con el correspondiente fosforano. Dicho lactol **23** se preparó a través de anelación de Robinson del ácido α-metiltetrónico (**17**) con etilvinilcetona, seguido de bromación alílica e hidrólisis. La elección de una aproximación convergente hacia el esqueleto de los ácidos trispóricos, parte de la necesidad de ratificar la configuración relativa en el doble enlace Δ^{9,10} de la serie B de estos compuestos. La

⁴⁷ White, J. D.; Takabe, K.; Prisbylla, M. P. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 5233-5244.

reacción de Wittig de la parte ciclohexenoica con una cadena apropiada es una buena estrategia para unir los dos fragmentos.⁴¹

Con esta idea en mente, las cadenas laterales de los ácidos trispóricos A y B se prepararon a partir de las sales de fosfonio con ambas configuraciones, tanto la *E* como la *Z*. Por otra parte, la isomerización del doble enlace que acompaña la reacción de Wittig, junto con la dificultad de separar los trisporatos puros con configuración *9Z*, llevó a buscar una alternativa para unir los dos fragmentos de estas estructuras. Para confirmar la asignación estructural y estereoquímica previamente indicada para esta prohormona de *Blakeslea trispora*, se sintetizó en el mismo trabajo el 4-dihidrotrisporato de metilo B siguiendo la misma ruta.



a. Reacción de Horner-Emmons, 91%; b. LiAlH₄; c. PBr₃; d. PPh₃; e. Reacción de Wittig; f. BuLi, CH₂O; g. H₃O⁺; h. Etilvinilcetona, Et₃N; i. TsOH, Benceno, reflujo; j. NBS; k. H₂O; l. CH₂N₂; m. Reacción de Wittig.

Esquema 10. Síntesis de (±)-ácidos trispóricos A (**24**), B (**22**) y C (**3**), y sus metil ésteres (**25**, **7** y **8**).

En 1999 después de los exitosos esfuerzos sintéticos para alcanzar los distintos sistemas de ácidos trispóricos que habían sido publicados anteriormente^{36a,36d,41,47,48} y el establecimiento de la configuración absoluta en C-1, A. I. Meyers *et al.* emplearon lactamas quirales en un intento de desarrollar una

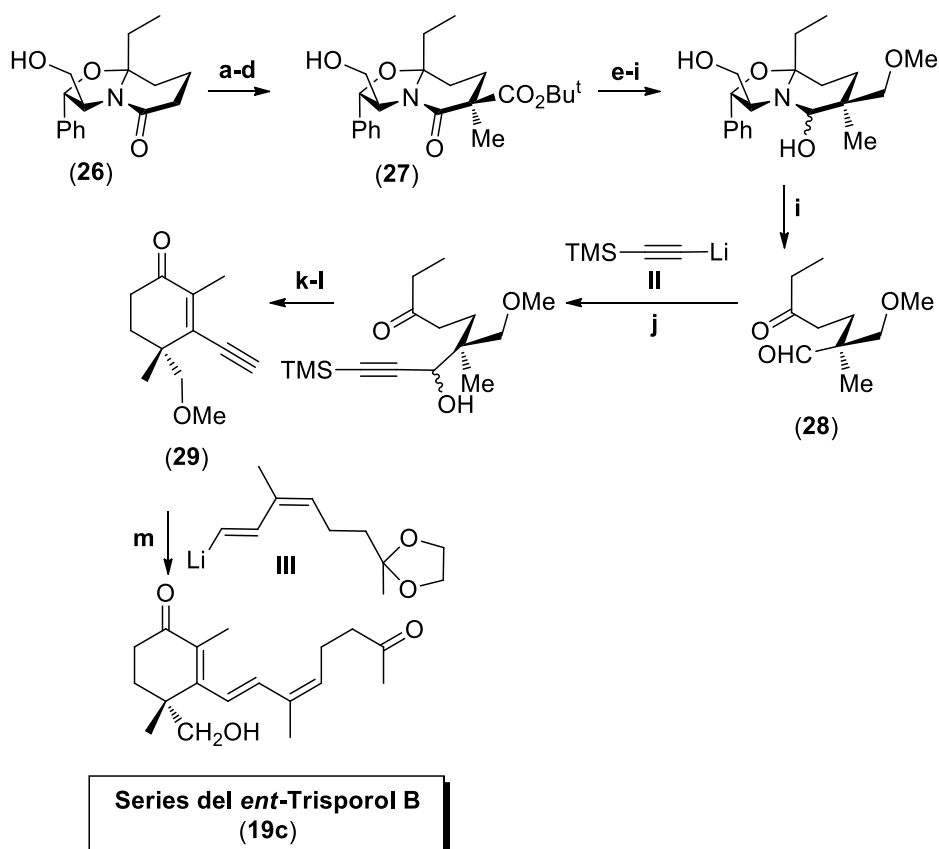
ruta enantioselectiva general para estas moléculas (Esquema 11).⁴⁸ La hipótesis se basa en el uso de la hidroxilactama **26**,⁴⁹ que fue transformada en su *tert*-butildimetilsililéter y posteriormente acilada para dar una mezcla diastereomérica 1:1. La desprotección del grupo hidroxilo, seguido de C-alkilación con MeI dio la lactama cuaternaria **27** como único diastereómero con un 87% de rendimiento como único diastereómero. La reducción de **27** como único diastereómero con un 87% de rendimiento. La reducción de **27** con Red-Al® seguida de hidrólisis originó el ceto-aldehído **28**. La condensación de este con el acetiluro **II** en presencia de CeCl₃ para evitar la enolización, con posterior oxidación y ciclación mediante reacción aldólica rindió la ciclohexenona **29**.

El acoplamiento de Suzuki catalizado por Pd,⁵⁰ entre **29** y **III**, seguido de hidrogenación parcial del triple enlace y desprotección de los grupos -OH y carbonilo originó trisporol B (**19c**), cuya oxidación seguida de metilación rindió el éster metílico. Esta síntesis permite acceder a **19** con configuración 1*R* no natural.

⁴⁸ Reeder, M. R.; Meyers, A. I. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 3115-3118.

⁴⁹ Romo, D.; Meyers, A. I. *Tetrahedron* **1991**, *47*, 9503-9569.

⁵⁰ Suzuki, A. *Appl. Chem.* **1985**, *57*, 1749-1758.



a. TBSCl; b. *n*-BuLi, (Boc)₂O; c. TBAF, THF, ta; d. *s*-BuLi, THF, -78 °C, MeI, 87%; e. TBSCl; f. LiBH₄, Et₂O-MeOH, 0 °C, 85%; g. NaH, MeI; h. Red-Al®, -78 °C; i. Bu₄NH₂PO₄, EtOH, H₂O, ta, 24h; j. **II**, CeCl₃; k. Dess-Martin; l. *t*-BuOK; m. Acoplamiento de Suzuki.

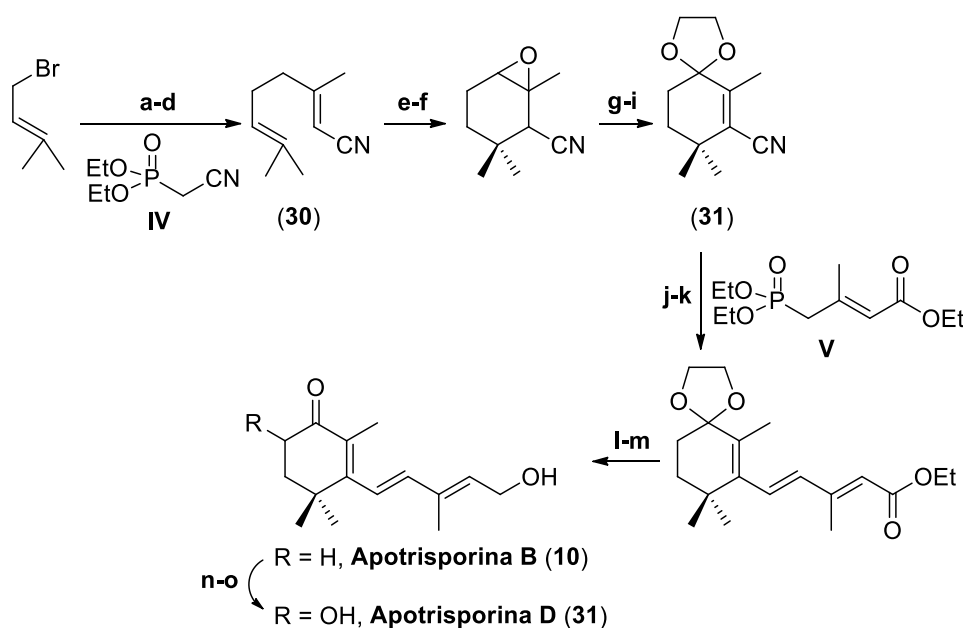
Esquema 11. Síntesis de *ent*-trisporol B (**19c**).

La preparación de las apotrisporinas B y D, anteriormente llamadas desoxitrisporonas, formó parte en el año 2000 de una secuencia sintética más compleja que buscaba la preparación de la astaxantina marcada con ¹³C en los carbonos 4 y 4', a partir de acetonitrilo comercial (Esquema 12).⁵¹ Esta síntesis se planteó de manera convergente entre fragmentos C15 + C10 + C15, lo que implicó la preparación de las apotrisporinas deseadas. El compuesto C10, 3,7-dimetil-2,6-octadienonitrilo (**30**), se preparó por condensación de los fragmentos C5 + C2 + C1 + C2, comenzando con bromuro de prenilo, acetonitrilo y metillitio usando el método de Courtin *et al.*,⁵² seguido de una ciclación hacia el anillo de 6 miembros

⁵¹ Jansen, F. J. H. M.; Lugtenburg, J. *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 829-836.

⁵² Gebhard, R.; Courtin, J. M. L.; Shadid, J. B.; van Haveren, J.; van Haeringen, C. J.; Lugtenburg, J. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1989**, *108*, 207-214.

usando el método descrito por Oh *et al.*⁵³ Este producto se epoxidó con AMCPB. La apertura del epóxido formado con LDA, seguida de oxidación con PCC y protección con etilenglicol dio **31**. La reducción del grupo ciano a formilo con DIBALH y posterior olefinación de Horner-Wadsworth-Emmons con el fosfonato adecuado, seguido nuevamente de una reducción con DIBALH y desprotección condujo a apotrisporina B (**10**), la cual se transformó en apotrisporina D (**32**) por tratamiento con LDA y oxaziridina.



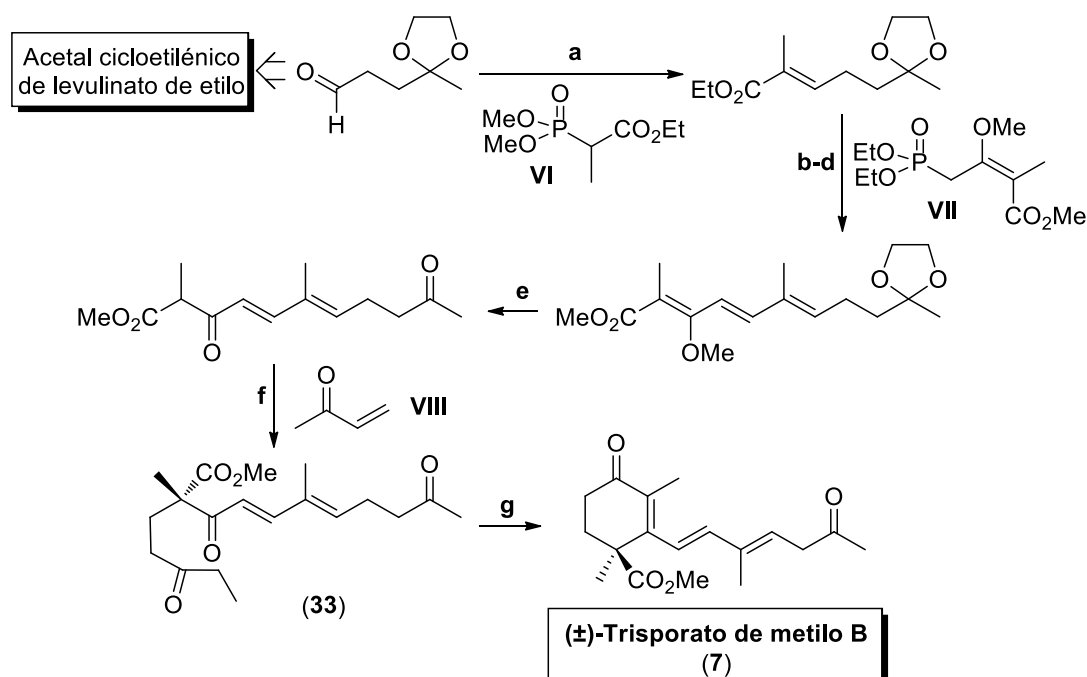
a. CH₃CN, *n*-BuLi; b. MeLi; c. HCl 3N; d. **IV**, LDA; e. H₂SO₄, CH₃NO₂; f. AMCPB; g. LDA; h. PCC; i. etilenglicol, HC(OMe)₃, TsOH; j. DIBALH; k. LDA, **V**; l. DIBALH; m. HCl, acetona; n. 2.0 LDA; o. oxaziridina.

Esquema 12. Síntesis de apotrisporinas B y D (**10** y **31**).

En cuanto a las metodologías con un proceso de ciclación final, en el año 1971 y como resultado de los estudios sobre diferentes hormonas sexuales de hongos, se describió la síntesis de (±)-trispurato de metilo B (**7**) empleando acetal cicloetilénico de levulinato de etilo como producto de partida. Su reducción con DIBAL origina 3-(2-metil-1,3-dioxolan-2-il)propanal. El acoplamiento de este con un fosfonato, como sintón acetoacético, origina una unidad C8, que por sucesivas

⁵³ Oh, J. H.; Kim, K.; Kim, Y. T. *J. Korean Chem. Soc.* **1985**, 29, 311-318.

transformaciones, acoplamiento y condensación de Michael da lugar a la tricetona lineal C18 (**33**) que posteriormente se cicla vía aldólica por tratamiento básico para obtener **7** (Esquema 13). Este trabajo también revisa las asignaciones estereoquímicas en C-9 del ácido trispórico C^{36a} definiendo la configuración del doble enlace como *E* en base a los desplazamientos en ¹H RMN de los protones olefínicos.

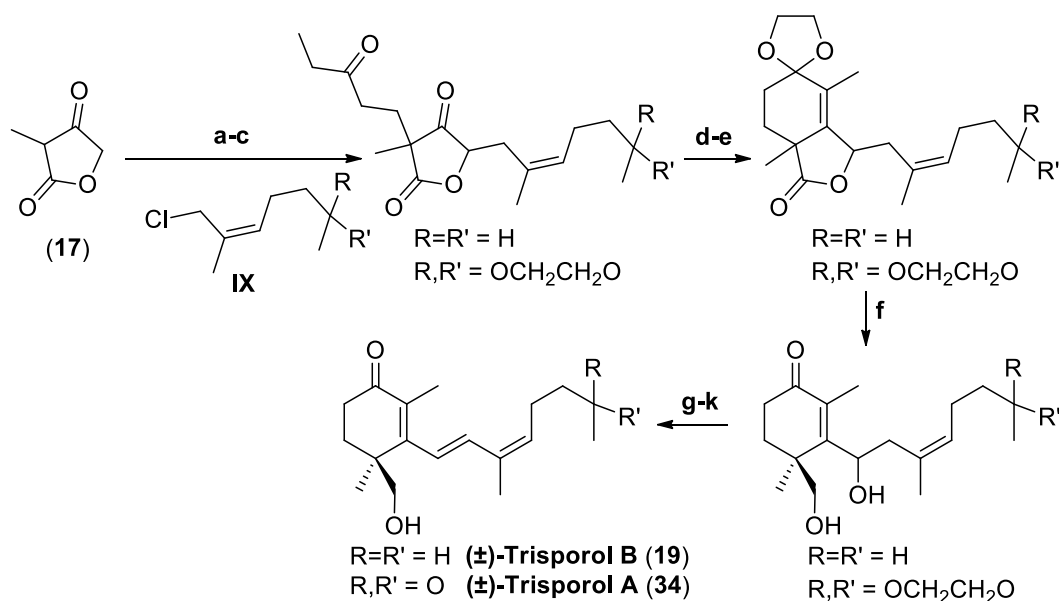


a. VI; b. LiAlH₄; c. MnO₂; d. VII, THF; e. HCl, MeOH; f. etilvinilcetona VIII, *t*-BuOK; g. MeOK, MeOH.

Esquema 13. Síntesis de (±)-trisporato de metilo B (**7**).

En 1985, J. D. White *et al.* llevaron a cabo la síntesis de trisporoles A (**34**) y B (**19**) (Esquema 14).⁴⁷ Basándose en bibliografía previa para la γ -alquilación de dianiones de β -cetoéster,⁵⁴ y variando algunos pasos empleados para la preparación de los ácidos trispóricos ya comentada, la γ -alquilación del conocido dianión de **17** con el apropiado cloruro alílico IX seguida de anelación de Robinson con etilvinilcetona condujo a los trisporoles A y B (**34** y **19**).

⁵⁴ Huckin, S. N.; Weiler, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 1082-1087.



a. i. NaH, THF-HMPA, ii. *n*-BuLi; b. **IX**; c. Etilvinilcetona, Et₃N; d. H₃O⁺; e. Etilenglicol; f. LiAlH₄; g. H₃O⁺; h. Ac₂O, Piridina; i. MsCl, Piridina; j. Me₂SO₄, reflujo; k. Saponificación.

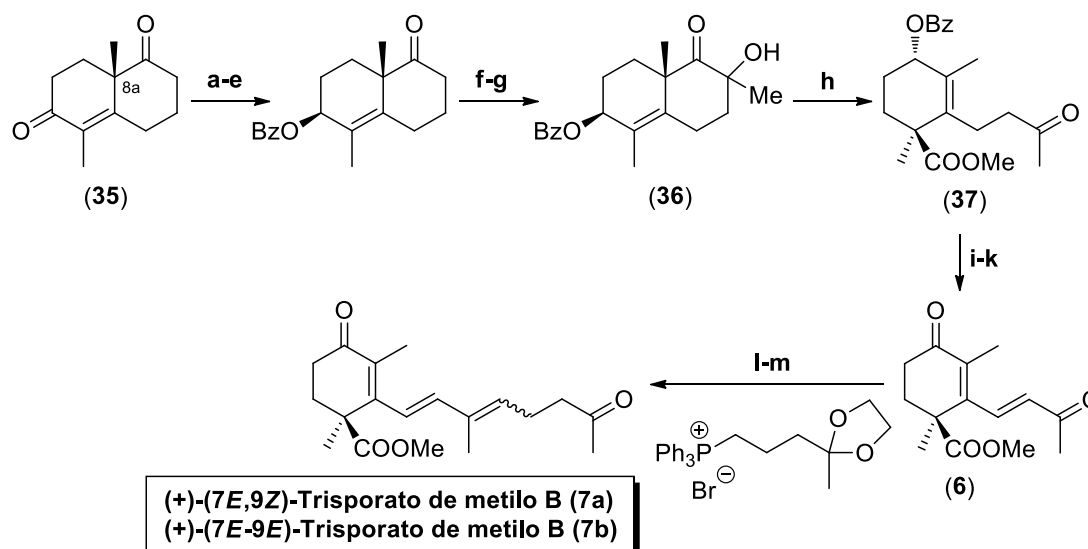
Esquema 14. Síntesis de (±)-trisporol A y B (**34** y **19**).

Otra estrategia parte de la estructura cíclica y estereoquímica ya formada desde el inicio. Así, por ejemplo la síntesis enantioespecífica de (+)-trisporato de metilo B (**7**) requiere de una secuencia sintética de mayor dificultad y partir de un substrato con la quiralidad adecuada. De esta forma en 1987 el grupo de S. Takahashi⁵⁵ llevó a cabo la síntesis desde la cetona de Wieland-Miescher (CWM) con la configuración *S* requerida en el C-8a, a través de una etapa clave de degradación oxidativa de enolato sódico con O₂ en presencia de fosfito de trietilo. Un año más tarde, los mismos autores⁵⁶ modifican la síntesis vía la CWM quiral **35**, que se convirtió a la α-hidroxicetona **36** precursora de la molécula objetivo (Esquema 15). Posteriormente, la ruptura de la parte aciloínica en **36** con tetraacetato de plomo permite obtener el derivado de β-ionona **37**. Este intermedio **37** se hace reaccionar con cloruro de fenilselenio produciendo el consiguiente selenuro y tras tratamiento con H₂O₂ se obtiene el sistema olefínico conjugado, que después de un tratamiento básico para desproteger el alcohol, se oxida con MnO₂ para rendir **6**. Finalmente una reacción de Wittig regioselectiva de

⁵⁵ Takahashi, S.; Oritani, T.; Yamashita, K. *Agric. Biol. Chem.* **1987**, *51*, 2291-2293.

⁵⁶ Takahashi, S.; Oritani, T.; Yamashita, K. *Tetrahedron* **1988**, *44*, 7081-7088.

6 con el adecuado iluro de fósforo protegido, seguido de la desprotección del acetal condujo a (+)-(7*E*,9*Z*)-trisorato de metilo B (**7a**) y a su isómero 9*E* (**7b**). A partir de este trabajo sintético, se pudo confirmar la configuración absoluta de los ácidos trispóricos B.



a. NaBH₄, EtOH; b. DHP, PPTS, DCM; c. LiAlH₄, éter, -75 °C; d. BzCl, Piridina; e. *p*-TsOH, MeOH; ii. PCC, DCM; f. LDA, MeI, -78 °C; g. NaH, P(OEt)₃, O₂, *t*-BuOH, THF, DMF; h. Pb(OAc)₄, Benceno, MeOH; i. PhSeCl, H⁺; ii. H₂O₂, DCM; j. NaOH, MeOH; k. MnO₂, DCM; l. *n*-BuLi, fosfonato, THF, -20 °C; m. HCl.

Esquema 15. Síntesis enantioselectiva de (+)-(7*E*,9*Z*)-trisorato de metilo B (**7a**) y su isómero 9*E* (**7b**).

Siguiendo la misma filosofía de partir de estructuras ciclohexénicas, en 2007 D. Schachtschabel y W. Boland describieron un protocolo sintético muy flexible, para acceder rápidamente al esqueleto apocarotenoide C18 no funcionalizado a partir de β-ionona (Esquema 16).⁵⁷ Esta metodología incluye una funcionalización oxidativa regioespecífica de β-ionona que permite obtener 4-acetoxi-β-ionona, dando ésta acceso a trisoroides sintéticos funcionalizados, intermediarios iniciales en el proceso biosintético. La biotransformación de estos trisoroides en cultivos de *Blakeslea trispora*, origina trisoroides tardíos incluyendo los ácidos trispóricos. Principalmente, esta aproximación no tiene la necesidad de usar complejos funcionalizados o precursores quirales porque los

⁵⁷ Schachtschabel, D.; Boland, W. J. *Org. Chem.* **2007**, 72, 1366-1372.

cultivos de estos hongos oxidan adecuadamente el *gem*-dimetilo C-1 en el ciclohexeno.

Usando el sintón **38** (*E/Z* = 1/1), obtenido a partir de β -ionona mediante una reacción de Wittig con bromuro de metilidientrifetilfosforano, se sintetizaron trisporoides tempranos no funcionalizados (Esquema 18). La transformación de **38** en la β -C₁₈-cetona **39** se realizó fácilmente por una alquilación tipo Heck con but-3-en-2-ona.⁵⁸ Este tipo de alquilación puede ser extendida satisfactoriamente a la acetoxi- β -ionona **40** que es adsequible a partir de β -ionona por oxidación alílica, seguida de acetilación.⁵⁹ Una olefinación de Wittig seguida de desacetilación con potasa metanólica⁶⁰ permite obtener el intermedio clave **41**. El siguiente precursor (**42**) se obtiene preferiblemente por oxidación de **41** mediante MnO₂.⁵⁶

Las dos series de trisporoides, una hidroxilados en C-4 (**43-45**) y otra con el grupo cetónico en esa misma posición (**46-48**), se obtuvieron en un proceso sencillo y con altos rendimientos usando **41** ó **42** para el acoplamiento cruzado catalizado por Pd(0) con el adecuado organozincato en cada caso.⁶¹ Dichos compuestos fueron obtenidos a partir de sus correspondientes yoduros sin necesidad de grupos protectores,⁶² minimizando así el número de reacciones sensibles, tanto ácidas como básicas, para el esqueleto de trisporoides. Finalmente, para mostrar el éxito en la administración y transformación de estos precursores sintéticos en los cultivos de *Blakeslea trispora*, se añade [²H₃]-trisporina B (**49**) a cultivos de sexo (-) precultivados en un medio SUP durante 3 días,⁶³ produciendo después de 48 horas, [²H₃]-trisporoles B y C, **50** y **51** respectivamente. Se debe destacar que esta formación de **50** y **51** no es consistente con la propuesta cooperativa biosintética original pero experimentalmente confirma una necesidad de una revisión alternativa en la interacción propuesta.^{37d,64}

⁵⁸ Naora, H.; Ohnuki, T.; Nakamura, A. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1988**, *61*, 2859-2863.

⁵⁹ McMurry, J. E.; Kocovsky, P. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 4187-4190.

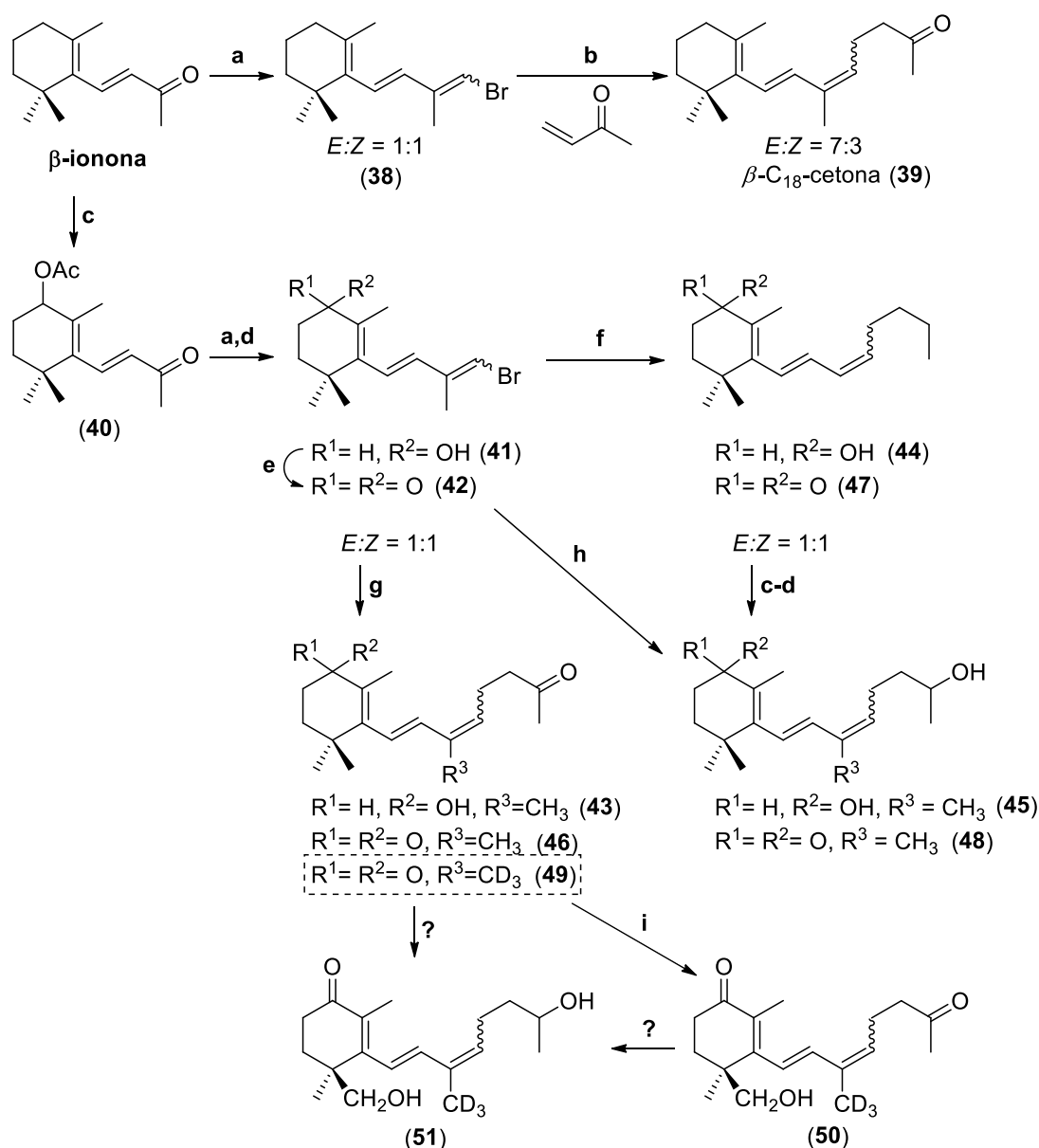
⁶⁰ Barrero, A. F.; Alvarez-Manzaneda, E. J.; Alvarez-Manzaneda, R.; Chahboun, R.; Meneses, R.; Aparicio, M. *Synlett* **1999**, 713-716.

⁶¹ (a) Gooday, G. W. *Phytochemistry* **1968**, *7*, 2103-2105. (b) Knochel, P.; Perea, J. J. A.; Jones, P. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 8275-8319.

⁶² Huo, S. Q. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 423-425.

⁶³ Wostemeyer, J. *Eur. J. Biochem.* **1985**, *146*, 443-448.

⁶⁴ Bu'lock, J. D.; Jones, B. E.; Winskill, N. *Pure Appl. Chem.* **1976**, *47*, 191-202.

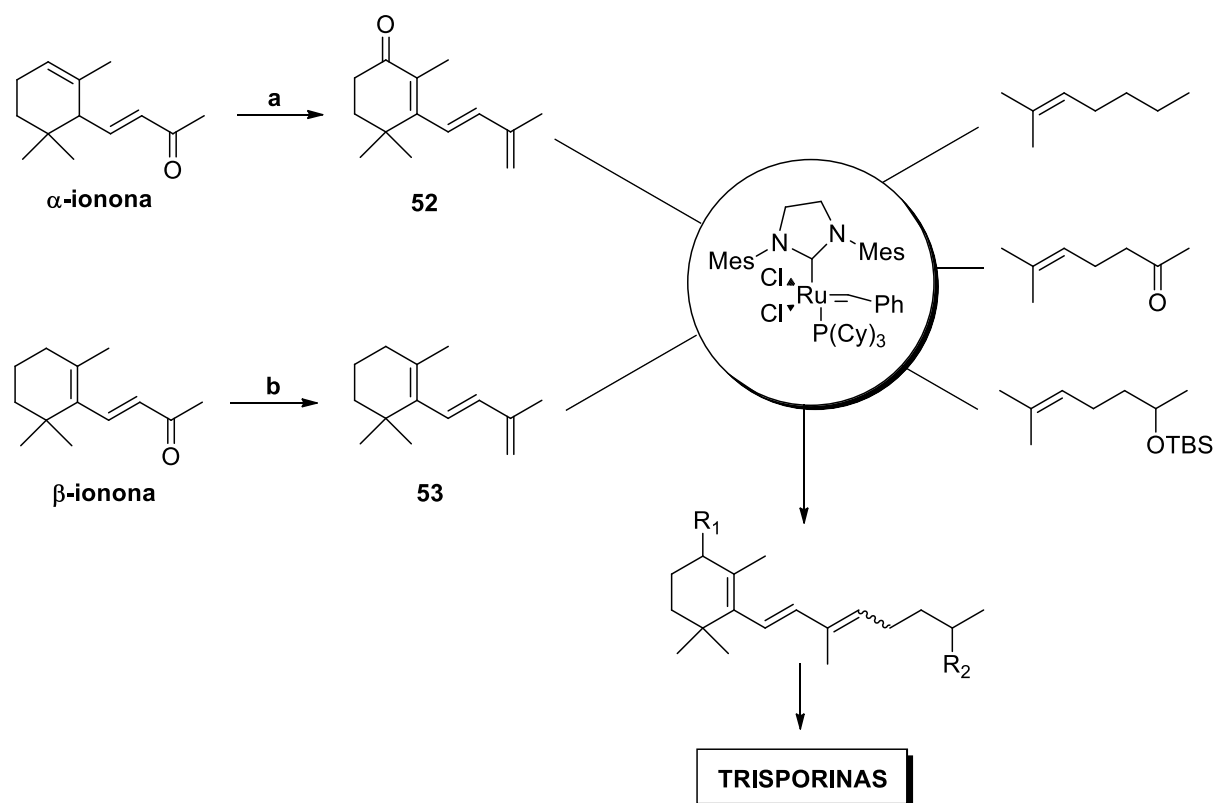


a. $(BrCH_2PPh_3)^+Br^-$, LiHDMS, THF. b. $Pd(OAc)_2$, PPh_3 , Et_3N , 60 °C. c. $Pd(O_2CCF_3)_2$, *o*-metoxiacetofenona. d. KOH , $MeOH$, ta. e. MnO_2 . f. Bu_2Zn , $Pd(PPh_3)_4$, THF. g. zincato de 4-iodobutan-2-ona, $Pd(PPh_3)_4$, THF. h. i. zincato de $[(4\text{-iodobutan-2-iloxi})(tert\text{-butil})dimetilsilano]$, $Pd[PPh_3]_4$, THF. ii. HF acuoso en $MeCN$ (0.1%). i. i. Cultivo del sexo (-) de *Blakeslea trispora* precultivado en un medio SUP durante 3 días, 48 h. ii. Eliminación de micelios y ajuste del caldo de cultivo a pH 8. iii. extracción con cloroformo/isopropanol.

Esquema 16. Síntesis de $[^2H_3]$ -trisporena B (49) y su biotransformación en cultivos de *Blakeslea trispora*.

Recientemente, el grupo de C. López-Sánchez *et al.* dentro de un proyecto en colaboración con nuestro grupo, ha usado la novedosa metodología de la metátesis

cruzada para la obtención de multitud de apocarotenoides (Esquema 17).⁶⁵ Partiendo de α -ionona, seguida de su adecuada funcionalización, o de β -ionona se llega a los intermedios triénicos **52** y **53**, los cuales son susceptibles de originar con el sintón correspondiente la metátesis cruzada, mediada por el catalizador de Grubb de segunda generación. La estereoselectividad de la reacción es baja, pudiendo separar los isómeros *E* y *Z*.



a. i. AMCPB, DCM, 78%. ii. K_2CO_3 , MeOH, 95%. iii. TBSCl, DMF, 70%. iv. Ph_3PCH_3Br , *n*-BuLi, THF, 76%. v. TBAF, THF, 97%. vi. MnO_2 , Hexano, 95%. b. Ph_3PCH_3Br , *n*-BuLi, THF, 65%.

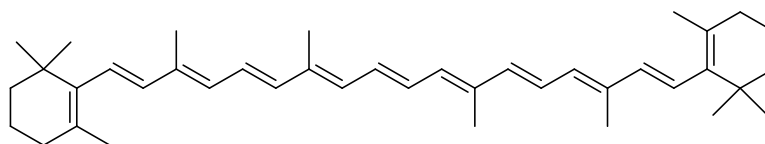
Esquema 17. Síntesis de trisporinas por metátesis de olefinas.

⁶⁵ López-Sánchez, C.; Hernández-Cervantes, C.; Rosales, A.; Álvarez-Corral, M.; Muñoz-Dorado, M.; Rodríguez-García, I. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 9542-9549.

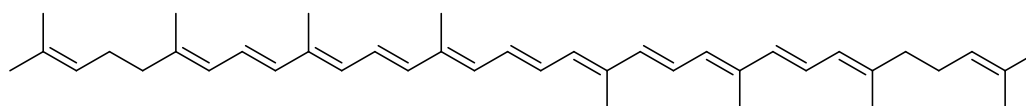
7. Actividades Biológicas de Apocarotenoides:

7.1. Carotenoides:

Los carotenoides pueden actuar como pigmentos y modificar la apariencia de diversos organismos. En plantas proporcionan colores llamativos a sus flores y frutos, resultando llamativos para los animales y se facilita la polinización y la dispersión de semillas. En los cloroplastos son indispensables como protectores del sistema fotosintético y como fotorreceptores que absorben luz y transfieren su energía a los centros activos.⁶⁶ En animales proporcionan los colores característicos de muchos pájaros, insectos e invertebrados marinos y pueden jugar un papel importante en su etología, por ejemplo, en la atracción sexual.⁶⁷



β-caroteno



Licopeno

Figura 10. Estructuras químicas de β-caroteno y licopeno.

El contenido de β-caroteno en la dieta ha alcanzado un interés considerable debido a sus funciones como provitamina A y antioxidante.⁶⁸ Este carotenoide es la principal fuente del retinol necesario para la recepción de la luz en la retina y por tanto se comprende que la visión dependa de su ingesta. Al licopeno se le atribuyen

⁶⁶ Edge, R.; McGarvey, D. J.; Truscott, T. G. *J. Photochem. Photobiol. B* **1997**, *41*, 189-200.

⁶⁷ (a) Faivre, B.; Gregoire, A.; Preault, M.; Cezilly, F.; Sorci, G. *Science* **2003**, *300*, 103. (b) Blount, J. D.; Metcalfe, N. B.; Birkhead, T. R.; Surai, P. F. *Science* **2003**, *300*, 125-127.

⁶⁸ (a) Olson, J. A.; Hayaishi, O. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1965**, *54*, 1364-1370. (b) Nagao, A.; Doring, A.; Hoshina, C.; Terao, J.; Olson, J. A. *Arch. Biochem. Biophys.* **1997**, *328*, 57-68. (c) Sies, H.; Stahl, W. *Am. J. Clin. Nutr.* **1995**, *62*, 1315S-1321S.

efectos beneficiosos para la salud,⁶⁹ como prevención de ciertos tipos de cáncer y mejora de la respuesta inmunológica (Figura 10).⁷⁰ Estos efectos son incluso mayores que los de los carotenoides más comunes, presumiblemente porque es un antioxidante más potente.⁷¹

Las insaturaciones de los carotenoides en general permiten neutralizar especies de oxígeno reactivas,⁷² como los radicales generados por la peroxidación lipídica.^{68c} Además, pueden actuar sinérgicamente con algunas vitaminas que protegen contra la fotooxidación.^{66,73}

La función de los carotenoides en hongos no se ha esclarecido en muchos casos, pero existen numerosas observaciones que les atribuyen efectos antioxidantes y de protección frente a radicales libres, aunque con algunas contradicciones.⁷⁴ La luz aumenta el estrés oxidativo de la célula, lo que podría explicar que en muchos organismos aumente la carotenogénesis con la luz,⁷⁵ excepto en *Blakeslea trispora*, donde la luz disminuye el contenido de β -caroteno.⁷⁶ En algunos hongos se han demostrado conexiones entre el estrés oxidativo y la regulación de la carotenogénesis. El oxígeno singlete estimula la carotenogénesis en cultivos de *Xanthophyllomyces dendrorhous* crecidos en oscuridad.⁷⁷ En *Phycomyces blakesleanus*, la luz azul incrementa el contenido de β -caroteno, pero ni este pigmento ni sus precursores lo protegen frente a las radiaciones gamma y ultravioleta C, y al peróxido de hidrógeno.⁷⁸

⁶⁹ (a) Heber, D.; Lu, Q. Y. *Exp. Biol. Med.* **2002**, *227*, 920-923. (b) Rao, A. V. *Exp. Biol. Med.* **2002**, *227*, 908-913. (c) Willcox, J. K.; Catignani, G. L.; Lazarus, S. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2003**, *43*, 1-18.

⁷⁰ (a) Giovannucci, E. *J. Natl. Cancer Inst.* **1999**, *91*, 317-331. (b) Gann, P. H.; Ma, J.; Giovannucci, E.; Willett, W.; Sacks, F. M.; Hennekens, C. H.; Stampfer, M. J. *Cancer Res.* **1999**, *59*, 1225-1230. (c) Jyocouchi, H.; Hill, R. J.; Tomita, Y.; Good, R. A. *Nutr. Cancer* **1991**, *16*, 93-105.

⁷¹ Di Mascio, P.; Kaiser, S.; Sies, H. *Arch. Biochem. Biophys.* **1989**, *274*, 532-538.

⁷² Conn, P. F.; Schalch, W.; Truscott, T. G. *J. Photochem. Photobiol. B* **1991**, *11*, 41-47.

⁷³ Sies, H.; Stahl, W. *Int. J. Vit. Nutr. Res.* **2003**, *73*, 95-100.

⁷⁴ (a) Gessler, N. N.; Sokolov, A. V.; Bykhovskii, V.; Belozerskaia, T. A. *Appl. Biochem. Microbiol.* **2002**, *38*, 205-209. (b) Ligusa, H.; Yoshida, Y.; Hasunuma, K. *FEBS Lett.* **2005**, *18*, 4012-4016.

⁷⁵ Ávalos, J.; Bejarano, E. R.; Cerdá-Olmedo, E. *Methods Enzymology* **1993**, *214*, 283-294.

⁷⁶ Kuzina, V.; Cerdá-Olmedo, E. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *76*, 991-999.

⁷⁷ Schroeder, W. A.; Johnson, E. A. *J. Ind. Microbiol.* **1995**, *14*, 502-507.

⁷⁸ Martín-Rojas, V.; Gómez-Puerto, A.; Cerdá-Olmedo, E. *Radiat. Environ. Biophys.* **1996**, *3*, 193-197.

El descubrimiento reciente de proteínas de la familia de las opsinas que requieren retinal en hongos, ofrece nuevas perspectivas sobre las funciones de los carotenoides. Los carotenoides se usan principalmente en la alimentación y en la fabricación de productos cosméticos, pero tienen muchos más usos, tan diversos como sus estructuras.^{1d,79} El β -caroteno y el licopeno también se usan como colorantes en la preparación de bebidas.

⁷⁹ Bramley, P. M. *Phytochemical Functional Foods* **2003**, 253-279, Johnson, I. and Williamson, G. Eds. Woodhead Publishing Ltd, Cambridge.

7.2. Trisporoides:

El β -caroteno es el precursor biosintético de otras moléculas como los ácidos trispóricos,⁸⁰ implicados en la sexualidad de los Mucorales y tiene un papel fundamental en la fotomorfogénesis de *Phycomyces*. Algunos apocarotenoides suficientemente pequeños para ser volátiles son responsables de muchos aromas y sabores naturales, como los de las rosas, el pimiento, el azafrán y el achiote o urucú. La propiedad biológica más singular de los ácidos trispóricos y de sus precursores es su capacidad para inducir la formación de cigóforos.

Los ácidos trispóricos son los únicos metabolitos conocidos que provocan la formación de cigóforos en cultivos separados de ambos sexos. Algunos precursores de los ácidos trispóricos muestran especificidad sexual: la trisporina y el trisporol del sexo (-) y el dihidrotrisorato de metilo y el trisorato de metilo del sexo (+) sólo son activos en el sexo (+) y en el sexo (-) respectivamente. Este hecho se demostró en *Phycomyces blakesleeanus* al observar el desarrollo de cigóforos sólo en mutantes sin β -caroteno, en cruzamientos con cultivos de la estirpe silvestre.⁸¹ Existe una evidencia inequívoca de la relación entre la sexualidad y la síntesis de β -caroteno.²⁵ Así, los ácidos trispóricos inducen la carotenogénesis que acompaña a la actividad sexual. Cuando se encuentran micelios de distinto sexo, las estructuras sexuales y el micelio en la zona sexual intensifican su coloración. Este mismo efecto se observa cuando ambos micelios están separados por una membrana semipermeable.²⁰ Govind y Cerdá-Olmedo observaron una activación de la carotenogénesis en cultivos de sexo (-) de *Phycomyces blakesleeanus*, ya fuera en presencia de trisorato de metilo sintético, o de ácidos trispóricos procedentes de un cultivo mixto de *Blakeslea trispora*.⁸²

En 2005, C. Schimek *et al.* sintetizaron algunos análogos de trisporoides para evaluar su inducción en la formación de cigóforos y en la detención del

⁸⁰ (a) Austin, D. G.; Bu'Lock, J. D.; Winstanley, D. J. *Biochem. J.* **1969**, *113*, 34-35. (b) Austin, D. J.; Bu'Lock, J. D.; Drake, D. *Experientia* **1970**, *26*, 348-349.

⁸¹ Sutter, R. P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1975**, *72*, 127-130.

⁸² Govind, N. S.; Cerdá-Olmedo, E. *J. Gen. Microbiol.* **1986**, *132*, 2775-2780.

crecimiento en cultivos del sexo (-) de *Mucor mucedo*.⁸³ Así pues, se ha podido proponer una relación estructura-actividad general para la acción de trisporoides, en la cual, parece ser determinante una longitud de nueve carbonos en la cadena lineal, pudiendo albergar o no el grupo carbonilo en C-13 en trisporoides de la serie B. En esa misma posición, con un grupo hidroxilo, los productos resultan ser inactivos. En cuanto a la sustitución del anillo ciclohexénico, la sustitución oxigenada en C-4 no es esencial. Estos requisitos no parecen ser independientes, sino que la combinación de varios de ellos puede proporcionar la actividad a un determinado metabolito. La detención del crecimiento es un requisito indispensable para que se produzca la interacción sexual en *Phycomyces blakesleeanus*, al contrario que en *Mucor mucedo*.⁸⁴ Un ejemplo de compuesto que induce ambas actividades es d'orenona o β -apo-13-carotenona (Figura 11).⁸³

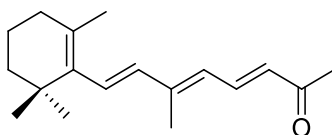


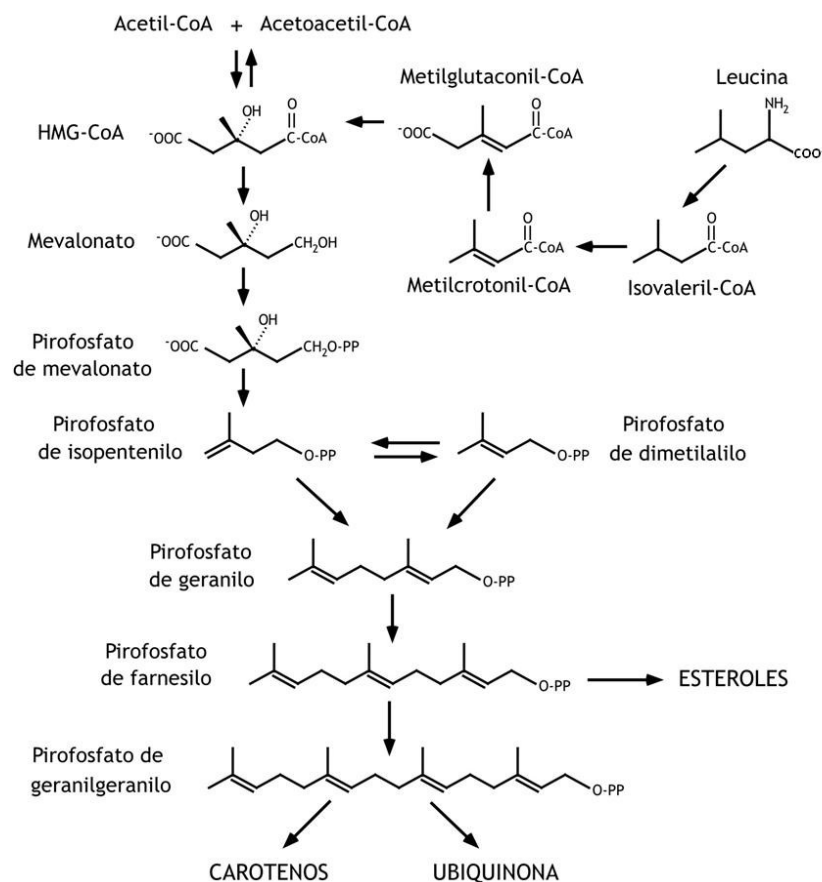
Figura 11. Estructura química de D'orenona.

⁸³ Schachtschabel, D.; Schimek, C.; Wostemeyer, J.; Boland, W. *Phytochemistry* **2005**, *66*, 1358-1365.

⁸⁴ Drinkard, L. C.; Nelson, G. E.; Sutter, R. P. *Exp. Mycol.* **1982**, *6*, 52-59.

7.3. Biosíntesis de β -caroteno

Hay dos vías muy diferentes para sintetizar unidades isopreno. La vía del mevalonato (Figura 12) que parte de acetil-CoA o leucina,⁸⁵ y la vía independiente del mevalonato que tiene a 1-deoxi-D-xilulosa-5-fosfato como intermediario (vía Rohmer).⁸⁶ Los eucariontes, no fotosintéticos, como los hongos, usan exclusivamente la vía del mevalonato. La vía independiente de mevalonato se ha corroborado en muchas plantas y bacterias.^{86b,87} *Phycomyces* usa la vía del mevalonato (Figura 12).⁸⁸



CoA: coenzima A; HMG-CoA: 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA.

Figura 12. Biosíntesis de algunos terpenoides en *Phycomyces*.

⁸⁵ (a) Goodwin, T. W.; Lijinski, W. *Biochem. J.* **1951**, *50*, 268-273. (b) Yokoyama, H.; Chichester, C. O.; Mackinney, G. *Nature* **1960**, *185*, 687-688. (c) McGarvey, D. J.; Croteau, R. *Plant Cell* **1995**, *7*, 1015-1026.

⁸⁶ (a) Rohmer, M.; Knani, M.; Simonin, P.; Sutter, B.; Sahn, H. *Biochem. J.* **1993**, *295*, 517-524. (b) Eisenreich, W.; Rohdich, F.; Bacher, A. *Trends Plant Sci.* **2001**, *6*, 78-84.

⁸⁷ (a) Rohmer, M. *Nat. Prod. Rep.* **1999**, *16*, 565-574. (b) Lange, B. M.; Rujan, T.; Martín, W.; Croteau, R. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2000**, *97*, 13172-13177. (c) Rodríguez-Concepción, M.; Boronat, A. *Plant Physiol.* **2002**, *3*, 1079-1089.

⁸⁸ Ruiz-Albert, J.; Cerdá-Olmedo, E.; Corrochano, L. M. *Molec. Genet. Genom.* **2002**, *266*, 768-777.

Todos los terpenoides derivan del precursor de cinco carbonos, pirofosfato de isopentenilo, y pueden ser sintetizados por la ruta del mevalonato o por la vía Rohmer. 3-Hidroximetilglutaril CoA (HMG-CoA) y el mevalonato son los intermediarios mayoritarios de la primera ruta y D-1-desoxixilulosa 1-fosfato de la segunda.^{86a} La vía Rohmer no ocurre en hongos.

La biosíntesis de terpenoides procede a través de la condensación de unidades de 5 carbonos para formar moléculas más grandes tales como pirofosfato de geranilo, pirofosfato de farnesilo (precursor de los esteroides), pirofosfato de geranilgeranilo y demás. El fitoeno, el primer caroteno, se produce por la condensación de dos moléculas de pirofosfato de geranilgeranilo catalizada por la enzima fitoeno sintasa. El fitoeno se convierte a β -caroteno a través de los seis pasos de la ruta de Porter y Lincoln, la cual incluye cuatro deshidrogenaciones y dos ciclaciones.⁸⁹ El fitoeno es incoloro, pero las sucesivas deshidrogenaciones producen moléculas con dobles enlaces conjugados que absorben a radiaciones de longitudes de ondas más altas. Hay dos tipos de ciclaciones que dan lugar a diferentes isómeros en el anillo, A y B, dependiendo de la posición del doble enlace. El nombre de β -caroteno denota la presencia de anillos betas al final de la molécula. Otras posibles modificaciones son la introducción de átomos de oxígeno y ruptura oxidativa, la cual da lugar a derivados más pequeños, los apocarotenoides.

Las rutas biosintéticas de carotenoides en los hongos se inician con la unión de dos moléculas de pirofosfato de geranilgeranilo para producir fitoeno (C₄₀), un tetraterpeno lineal (Figura 13), seguida de la introducción de cuatro o cinco enlaces dobles conjugados. Estas deshidrogenaciones o desaturaciones generan diversos productos intermedios. El licopeno, producto final de la serie de desaturaciones, se cicla en uno de sus extremos para producir γ -caroteno y en ambos para producir β -caroteno. Esta biosíntesis de β -caroteno, propuesta para *Lycopersicon esculentum* (tomate o jitomate),⁸⁹ se ha corroborado en varios

⁸⁹ Porter, J. W.; Lincoln, R. E. *Arch. Biochem. Biophys.* **1950**, *27*, 390-403.

Mucorales, como *Phycomyces*,⁹⁰ *Mucor*⁹¹ y *Blakeslea*,⁹² y Ascomicetos, como *Aspergillus*⁹³ y *Cercospora*.⁹⁴

Los hongos tienen varias características destacables en la síntesis de sus carotenoides.^{1b} La primera, un solo gen, *carB*, que es el responsable de las insaturaciones del fitoeno. La segunda consiste en la combinación de las funciones enzimáticas sintasa y ciclasa en un gen bifuncional, *carRA*, que contiene el dominio R responsable de la ciclasa y el A responsable de la sintasa. Así las siete reacciones enzimáticas se llevan a cabo con los productos de solo dos genes estructurales y tres proteínas diferentes.

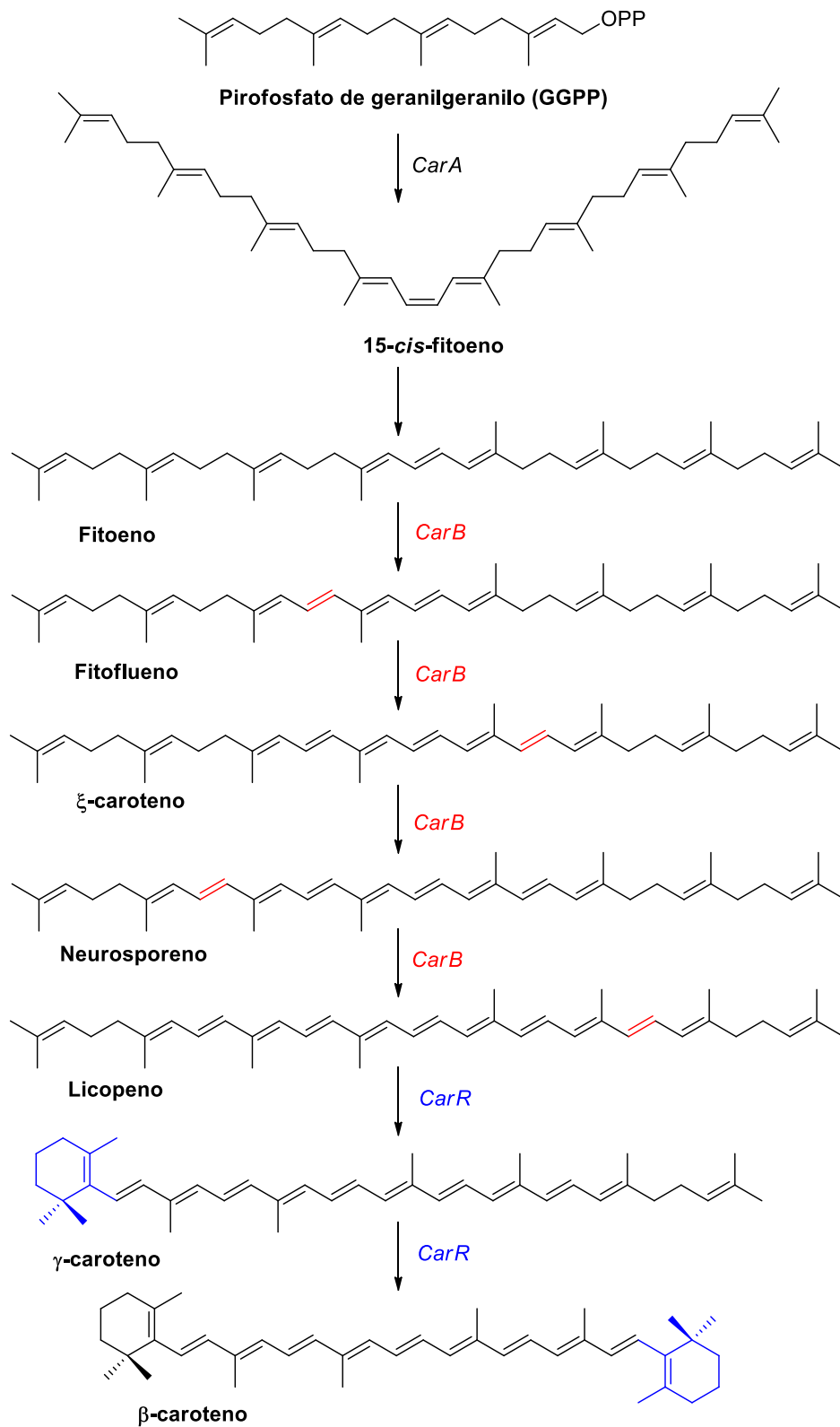
⁹⁰ De la Guardia, M. D.; Aragón, C. M. G.; Murillo, F. J.; Cerdá-Olmedo, E. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1971**, *68*, 2012-2015.

⁹¹ Fraser, P. D.; Ruiz-Hidalgo, M. J.; Lopes-Matas, M. A.; Álvarez, M. I.; Eslava, A. P.; Bramley, P. M. *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, *1289*, 203-208.

⁹² Mehta, B. J.; Cerdá-Olmedo, E. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1995**, *42*, 836-838.

⁹³ El-Jack, M.; Mackenzie, A.; Bramley, P. *Planta* **1988**, *174*, 59-66.

⁹⁴ (a) Norman, S. *Plant Growth Reg.* **1991**, *10*, 103-108. (b) Ehrenshaft, W.; Daub, M. E. *Appl. Environ. Microbiol.* **1994**, *60*, 2766-2771.

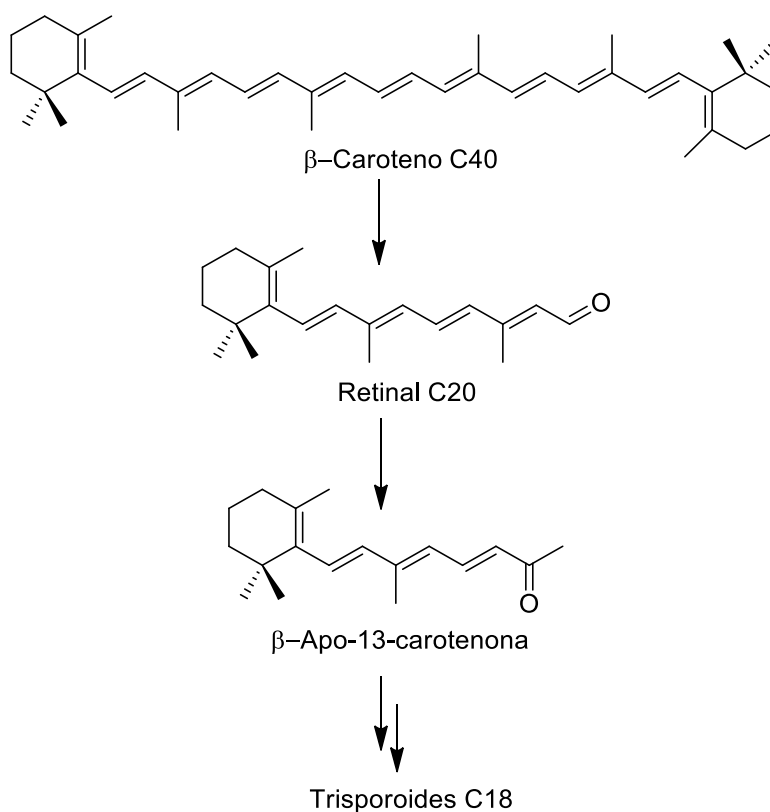


CarA: sintasa de fitoeno; *CarB*: desaturasa de fitoeno; *CarR*: ciclasa de licopeno.

Figura 13. Biosíntesis de β -caroteno en *Phycomyces*.

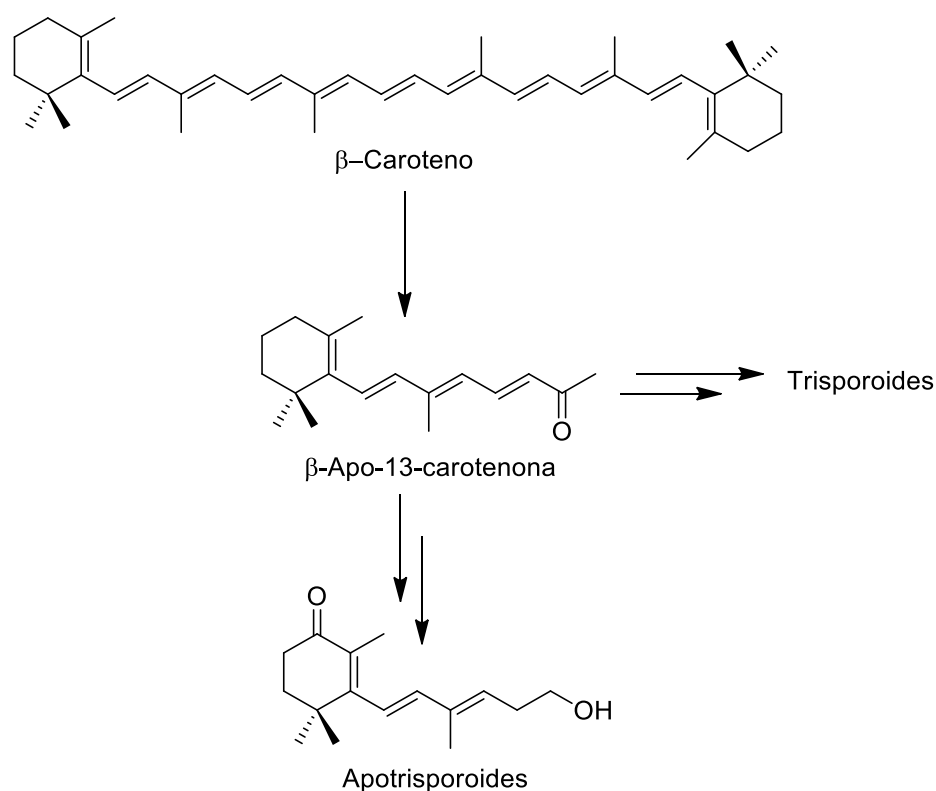
7.4. Propuestas biosintéticas para apocarotenoides:

En 1970 Austin *et al.*^{80b} proponen la siguiente ruta biosintética en base a la creencia de haber encontrado retinal en *Phycomyces blakesleeanus*^{27d} y que este puede dar lugar a ácidos trispóricos (Esquema 18).^{21,97} En esta ruta el β -caroteno sufre una ruptura oxidativa simétrica originándose dos moléculas de retinal (apocarotenoide C20), el cual pierde dos carbonos para dar lugar a β -apo-13-carotenona, un C18 apocarotenoide, a partir del cual se originan los trisporoides (C18 apocarotenoides).



Esquema 18. Propuesta biosintética de la formación de trisporoides C18 a través de retinal C20.

Como posteriormente nunca se pudo confirmar la presencia de retinal en *Phycomyces*, se propuso una ruta biosintética alternativa, en la que β -apo-13-carotenona, un C18 es directamente desde caroteno el precursor de los ácidos trispóricos y otros trisporoides C18 (Esquema 19). Cuando posteriormente se descubrieron compuestos C15 similares, se llamaron apotrisporoides y se supuso que proceden de la pérdida de tres carbonos de la cadena lateral de β -apo-13-carotenona u otros trisporoides.^{37d,95} Ambas rutas han sido asumidas hasta hace poco tiempo.^{57,83}



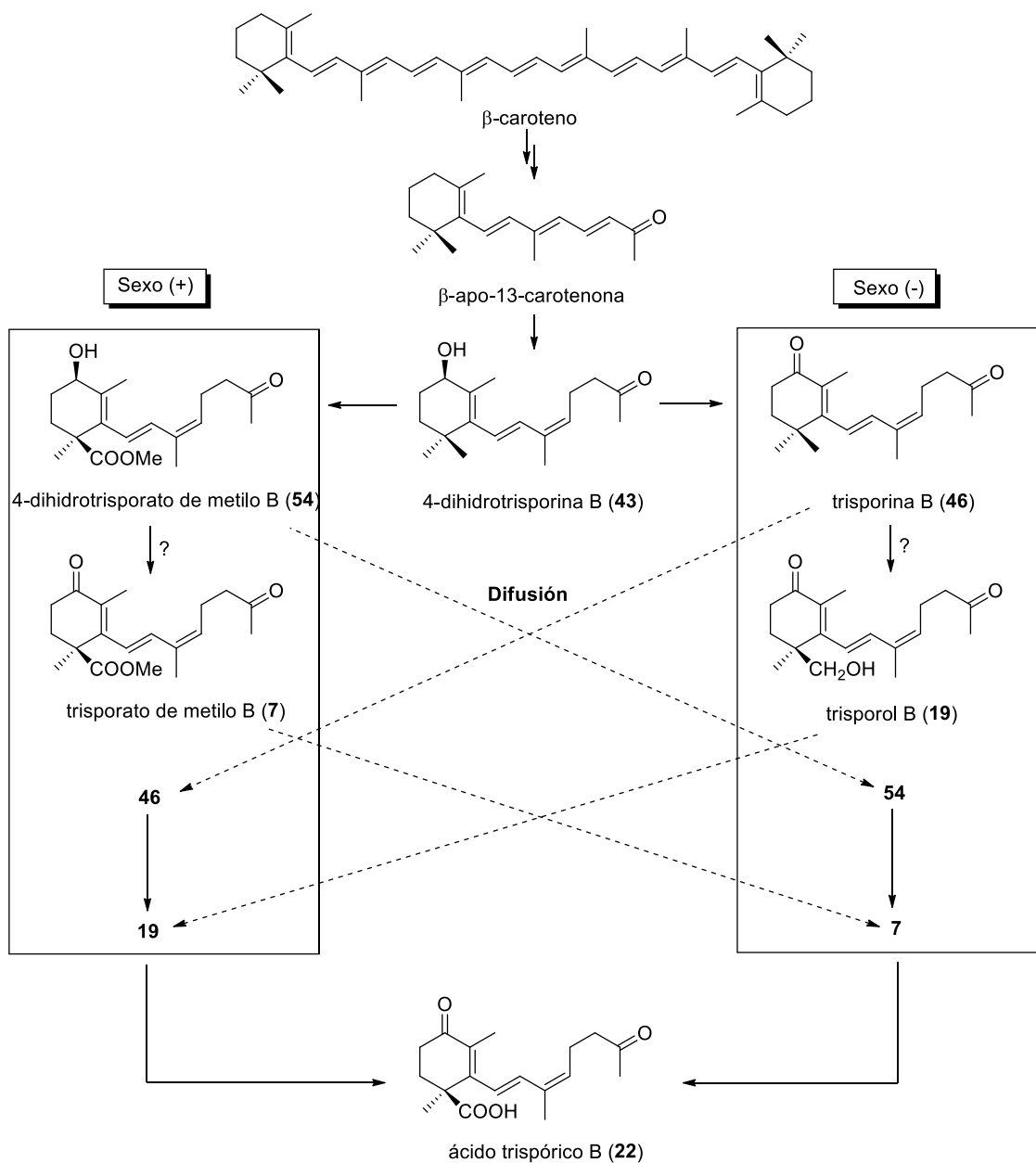
Esquema 19. Propuesta biosintética de la formación de trisporoides y apotrisporoides a través de β -apo-13-carotenona.

⁹⁵ (a) Sutter, R. P.; Whitaker, J. P. *J. Biol. Chem.* **1981**, *5*, 2334-2341. (b) Sutter, R. P.; Zawodny, P. D. *Exp. Myco.* **1984**, *8*, 89-92.

Los ácidos trispóricos se producen en grandes cantidades en cultivos mixtos y se ha propuesto que requieren de una cooperación entre los dos sexos para su biosíntesis en *Blakeslea trispora*.^{3a} Ciertos productos de un sexo solo podrían ser metabolizados por el sexo opuesto. En la ruta biosintética postulada (Esquema 20), ambos sexos comparten los pasos iniciales, empezando por el β -caroteno vía retinal,^{27d,80b} hasta la producción del último intermediario común, la 4-dihidrotrisorina B (**43**). El corte simétrico de β -caroteno es el paso inicial necesario en la biosíntesis de los ácidos trispóricos y podría estar mediado por una presunta oxigenasa de β -caroteno.^{74a,96} El siguiente paso biosintético es específico del sexo^{27b,37b} y permite la formación de 4-dihidrotrisorato de metilo B (**54**) y trisorato de metilo B (**7**) en el sexo (+) y de trisorina B (**46**) y trisorol B (**19**) en el sexo (-). En los cultivos separados la producción de estos intermediarios es baja, pero aumenta por la acción de los ácidos trispóricos.⁹⁷ Estos precursores actúan como feromonas y necesitan de un intercambio mutuo: en el sexo (+) el ácido trispórico B (**22**) se forman desde trisorol B (**19**), y en el sexo (-) desde trisorato de metilo B (**7**). Esta ruta es extensible a la biosíntesis de otros ácidos trispóricos.

⁹⁶ (a) Von Lintig, J.; Vogt, K. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 11915-11920. (b) Burmester, A.; Richter, A.; Schultze, K.; Voelz, K.; Schachtschabel, D.; Boland, W.; Wöstemeyer, J.; Schimek, C. *Fungal Genet. Biol.* **2007**, *44*, 1096-1108.

⁹⁷ Werkman, B. A.; Van den Ende, H. *Arch. Microbiol.* **1973**, *90*, 365-374.



Esquema 20. Biosíntesis postulada del ácido trispórico B (22) en *Blakeslea trispora*.

B. A. Werkman estudió las últimas reacciones de la ruta biosintética de los ácidos trispóricos en la estirpe (-) de *M. mucedo*.⁹⁸ Hay tres enzimas implicadas en estas reacciones: dos deshidrogenasas dependientes de NADP, en la que una cataliza la oxidación del dihidrotrisporato de metilo a trisporato de metilo⁹⁹ y otra

⁹⁸ Werkman, B. A. *Arch. Microbiol.* **1976**, *109*, 209-213.

⁹⁹ (a) Czempinski, K.; Kruft, V.; Wöstemeyer, J.; Burmester, A. *Microbiology* **1996**, *142*, 2647-2654. (b) Schimek, C.; Petzold, A.; Schultze, K.; Wetzel, J.; Wolschendorf, F.; Burmester, A.; Wöstemeyer, J. *Fungal Genet. Biol.* **2005**, *42*, 804-812.

aquella de 4-dihidrotrispোরina a trispোরina;¹⁰⁰ y una esterasa, implicada en la producción de ácidos trispóricos a partir de trispорato de metilo. Los ácidos trispóricos, una vez formados en los cultivos mixtos, estimulan su propia síntesis y la de ambas enzimas. R. P. Sutter y J. P. Whitaker propusieron un modelo de ruta biosintética que tenía en cuenta el paso de 4-dihidrotrispорato de metilo B (**54**) a trispорato de metilo B (**7**) en ambos sexos.^{95a} El trispорato de metilo B (**7**) que resulta en el sexo (+) también actuaría como una feromona. Sin embargo, la trispোরina B (**46**) y el trispорol B (**19**) están ausentes en cultivos de este sexo, por lo que sugirieron un mecanismo de inactivación para estos compuestos que los convertiría en apotrisporina y apotrisporol, respectivamente.

En 2007, D. Schachtschabel y W. Boland sintetizaron trispорoides iniciales en la ruta metabólica marcados isotópicamente con objeto de biotransformarlos en cultivos de *Blakeslea trispora*.⁵⁷ Para ello, suministraron trispোরina B marcada con deuterio en cultivos del sexo (-) de dicho hongo. Después de 48 horas y el adecuado ajuste de pH hasta medio básico, se extrajeron trispорol B y C ambos marcados isotópicamente y en cantidades equimoleculares. Estos productos deuterados confirman la lógica sintética de los diferentes pasos de la ruta. Bajo las mismas condiciones de cultivo, para el sexo (+) se encuentra ácido trispórico C con la misma estereoquímica absoluta que los naturales.

Solo un año más tarde, estos mismos autores estudian más exhaustivamente estas biotransformaciones mostrando que la actividad metabólica en ambos sexos es muy flexible. Se muestra que el primer producto de ruptura de β -caroteno llamado d'orenona (Figura 11) produce trispорinas y trispорoles B y C, aunque con eficiencias diferentes. También se postula que algunos compuestos derivados de β -caroteno como isocriptoxantina (**55**) podrían contribuir a la diversidad metabólica de estos compuestos ya que se aísla un nuevo compuesto no deuterado, ácido 4-dihidrotrispórico B (**56**) (Figura 14). Así pues, la biosíntesis y la degradación oxidativa del β -caroteno pueden ser diferencialmente estimuladas por combinación de estos trispорoides tempranos y tardíos.⁴

¹⁰⁰ Wetzels, J.; Scheibner, O.; Burmester, A.; Schimek, C.; Wöstemeyer, J. *Eukaryot. Cell* **2009**, *8*, 88-95.

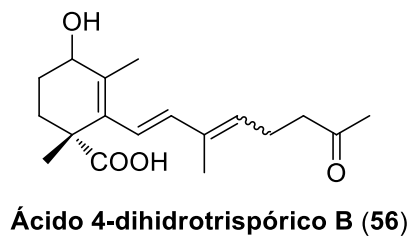
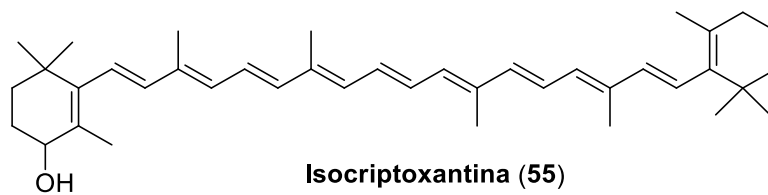
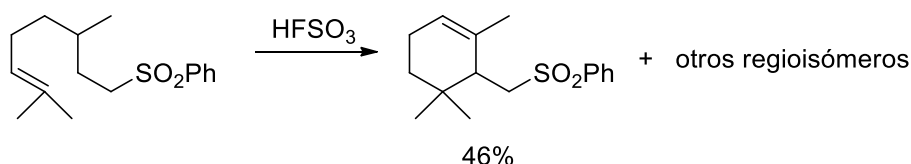


Figura 14. Posibles compuestos relacionados con la diversidad estructural encontrada en *Blakeslea trispora*.

8. Ciclaciones Biomiméticas: Generalidades.

Las estructuras cíclicas que la Naturaleza consigue tan eficientemente sobre todo dentro de la familia de los terpenos, y cuya preparación dentro del laboratorio no resulta siempre sencilla, han sido objeto de estudio de los químicos sintéticos a lo largo de muchos años. Los métodos más habituales para conseguir dichas estructuras se basan en ciclaciones carbocatiónicas o radicalarias.

Las ciclaciones biomiméticas carbocatiónicas se pueden inducir sobre dobles enlaces mediante protonación. Así, son bien conocidos los trabajos de P. F. Vlad con superácidos protónicos (Esquema 21).¹⁰¹

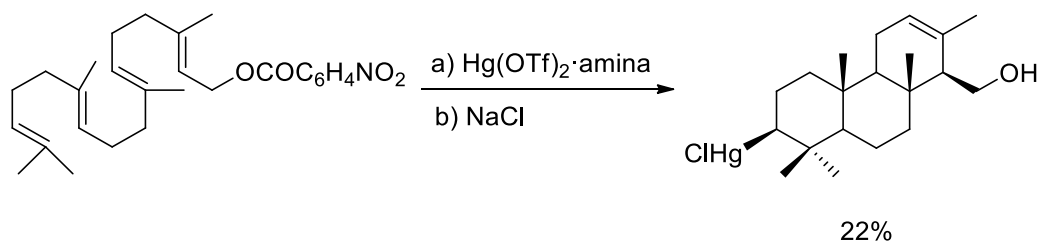


Esquema 21. Ciclación carbocatiónica con el superácido protónico FSO₃H.

También se han usado sales mercúricas como electrófilos para inducir las ciclaciones. Los reactivos son quimioselectivos, dan rendimientos moderados y son versátiles, puesto que el mercurial intermedio se puede transformar en diferentes grupos funcionales. M. Nishizawa *et al.* encontraron que el triflato mercúrico complejoado con dimetilfenilamina da los mejores resultados.¹⁰² Así cuando se emplea sobre geranilgeraniol, se obtiene con un 22% el producto de triple ciclación (Esquema 22). Generalmente el cloromercurial se reduce a lo largo del proceso sintético aunque se puede eliminar, vía fenilselenoéter, a doble enlace o transformar en el hidroxilo correspondiente.

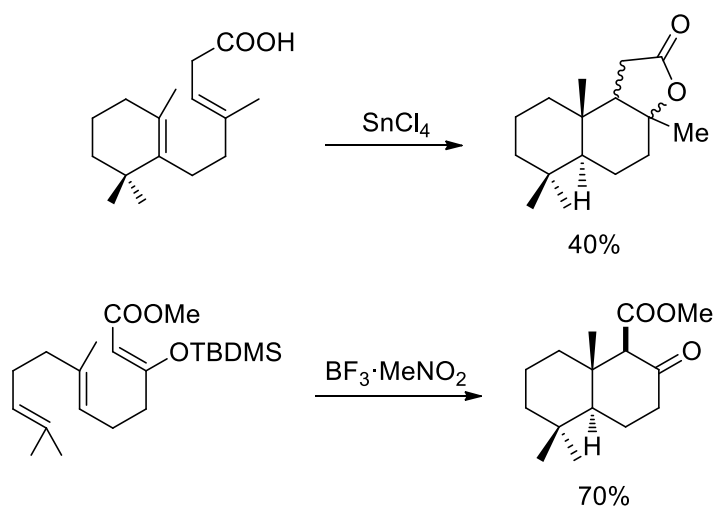
¹⁰¹ (a) Vlad, P. F.; Ungur, N. D. *Synthesis* **1983**, 3, 216-219. (b) Vlad, P. F.; Ungur, N. D.; Koltza, M. N. *Tetrahedron* **1983**, 39, 3947-3958. (c) Kulcitki, V.; Ungur, N.; Vlad, P. F. *Tetrahedron* **1998**, 54, 11925-11934. (d) Vlad, P. F. *Pure and Applied Chemistry* **1993**, 65, 1329-1336.

¹⁰² Nishizawa, M.; Takenaka, H.; Hayashi, Y. *J. Org. Chem.* **1986**, 51, 806-813.



Esquema 22. Policiclación con triflatos mercúricos.

También se pueden emplear como iniciadores de la reacción de ciclación ácidos de Lewis. En este caso el rendimiento y la reactividad de los precursores acíclicos dependen del ácido usado y de la funcionalidad del polipreno.¹⁰³ Algunos ejemplos de ácidos de Lewis usados son SnCl_4 ¹⁰⁴ y BF_3 ¹⁰⁵ (Esquema 23).



Esquema 23. Ciclaciones con ácidos de Lewis, tales como SnCl_4 y BF_3 .

Otros tipos de ciclaciones relacionadas son las que utilizan como iniciadores para generar el carbocatión, alcoholes o derivados, acetales, etc. En este campo son bien conocidas las aplicaciones de W. S. Johnson *et al.*¹⁰⁶ que pusieron de

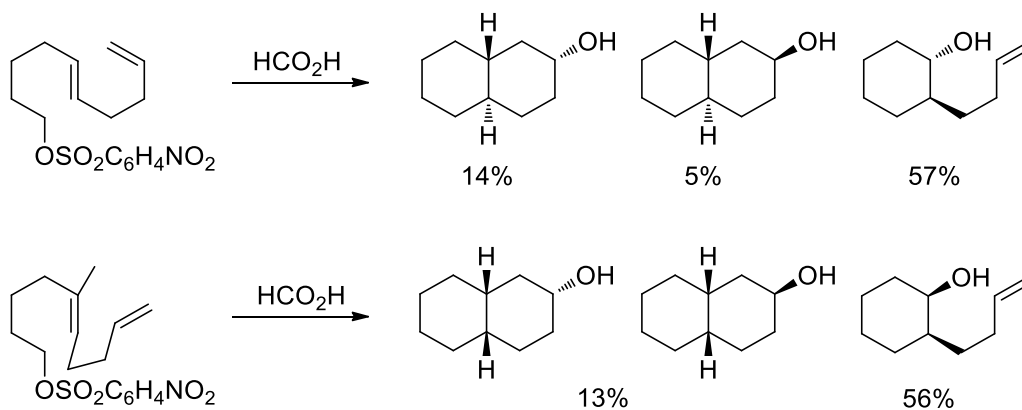
¹⁰³ Sadler, P. A.; Eschenmoser, A.; Schinz, H.; Stork, G. J. *Helv. Chim. Acta* **1957**, *40*, 2191-2198.

¹⁰⁴ Saito, A.; Matsushita, H.; Tsujino, Y.; Kaneko, H. *Chem. Lett.* **1981**, 757-760.

¹⁰⁵ Harring, S. R.; Livinghouse, T. J. *Chem. Soc., Chem. Comm.* **1992**, 503-504.

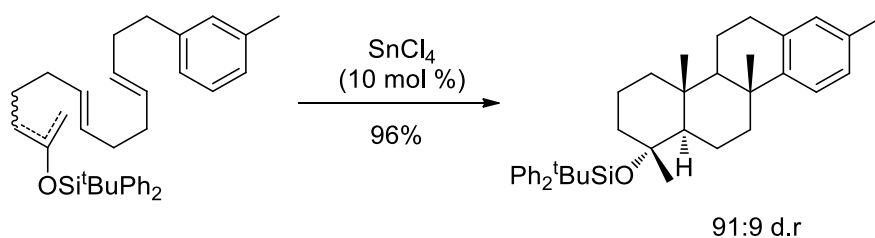
¹⁰⁶ Johnson, W. S.; Bailey, D. M.; Owyang, R.; Bell, R. A.; Jaques, B.; Crandall, J. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 1959-1966.

manifiesto que la reacción es estereoespecífica con respecto a la estereoquímica de la olefina (en ellas se modifica sustancialmente el precursor acíclico natural).¹⁰⁷



Esquema 24. Ciclaciones usando iniciadores como HCOOH.

Una policiclación altamente diastereoselectiva se produce catalíticamente con SnCl_4 , cuando el sintón acíclico sostiene un grupo siloxivinil terminal, obteniendo un excelente rendimiento y una inusual α -selectividad debido a la voluminosidad del grupo protector.¹⁰⁸

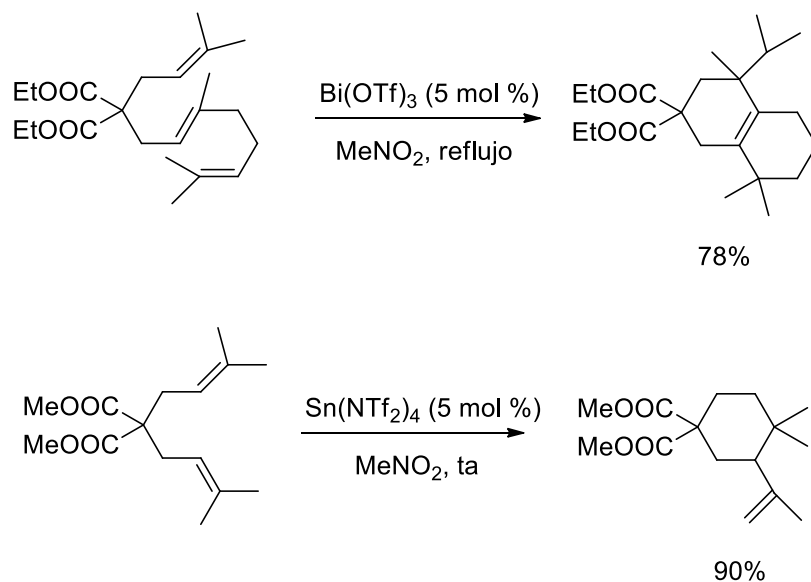


Esquema 25. Policiclación de silil derivados mediante SnCl_4 .

¹⁰⁷ Johnson, W. S.; Lunn, W. H.; Fitz, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 1972-1978.

¹⁰⁸ Uyaki, M.; Ishihara, K.; Yamamoto, H. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 5649-5652.

Recientemente, se han publicado trabajos empleando triflatos y triflimidatos¹⁰⁹ metálicos para ciclaciones de polienos no activados con rendimientos de buenos a excelentes.¹¹⁰



Esquema 26. Ciclaciones empleando triflatos y triflimidatos metálicos.

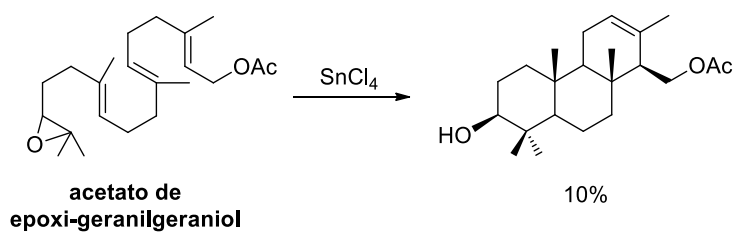
Con epoxiliprenos también existen trabajos de ciclaciones en medios ácidos. En este campo destacan los trabajos iniciales de E. E. van Tamelen *et al.*¹¹¹ que emplean ácidos de Lewis. Lo más destacable en estas ciclaciones es la obtención de las estructuras cíclicas con un hidroxilo en C-3. En el caso del epóxido de acetato de geranilgeraniol se obtiene un 10% del espongiario correspondiente (Esquema 27).¹¹² El principal inconveniente es la formación de productos de ciclación incompleta, reordenamiento u óxidos.

¹⁰⁹ (a) Favier, I.; Duñach, E. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 2031-2032. (b) Antoniotti, S.; Duñach, E. *Chem. Comm.* **2008**, 993-995. (c) Antoniotti, S.; Dalla, V.; Duñach, E. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 7860-7888. (d) Vece, V.; Hassen, K. B. H.; Antoniotti, S.; Duñach, E. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 5102-5105.

¹¹⁰ Godeau, J.; Olivero, S.; Antoniotti, S.; Duñach, E. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 3320-3323.

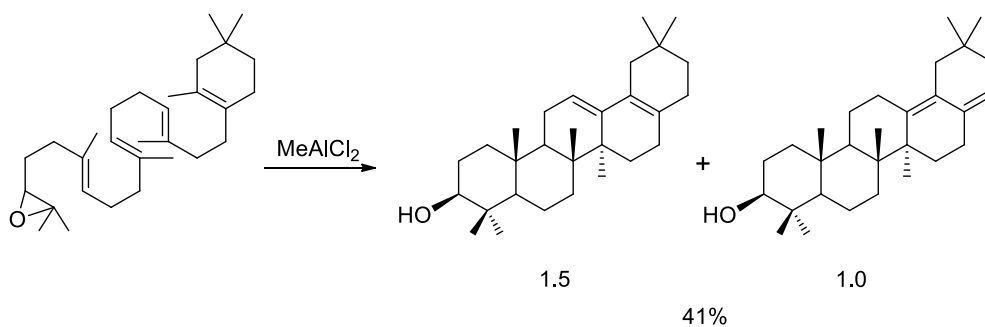
¹¹¹ Van Tamelen, E. E.; James, D. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 950-952.

¹¹² Van Tamelen, E. E.; Storni, A.; Hessler, E. J.; Schwartz, M. J. *Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 3295-3296.



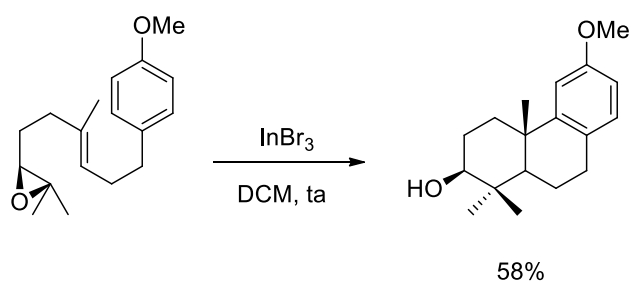
Esquema 27. Ciclación de epoxipoliprenos mediante SnCl_4 .

Cuando se emplean sustratos de partida elaborados, esta metodología ha servido para la síntesis de terpenos naturales. Son de destacar las síntesis de E. J. Corey *et al.* en el campo de los triterpenos.¹¹³



Esquema 28. Policiclación de epoxipolipreno con ácido de Corey.

Este tipo de epoxiciclaciones terminadas en arenos también se han realizado con ácidos de Lewis tolerantes a agua, obteniendo moderados rendimientos.¹¹⁴

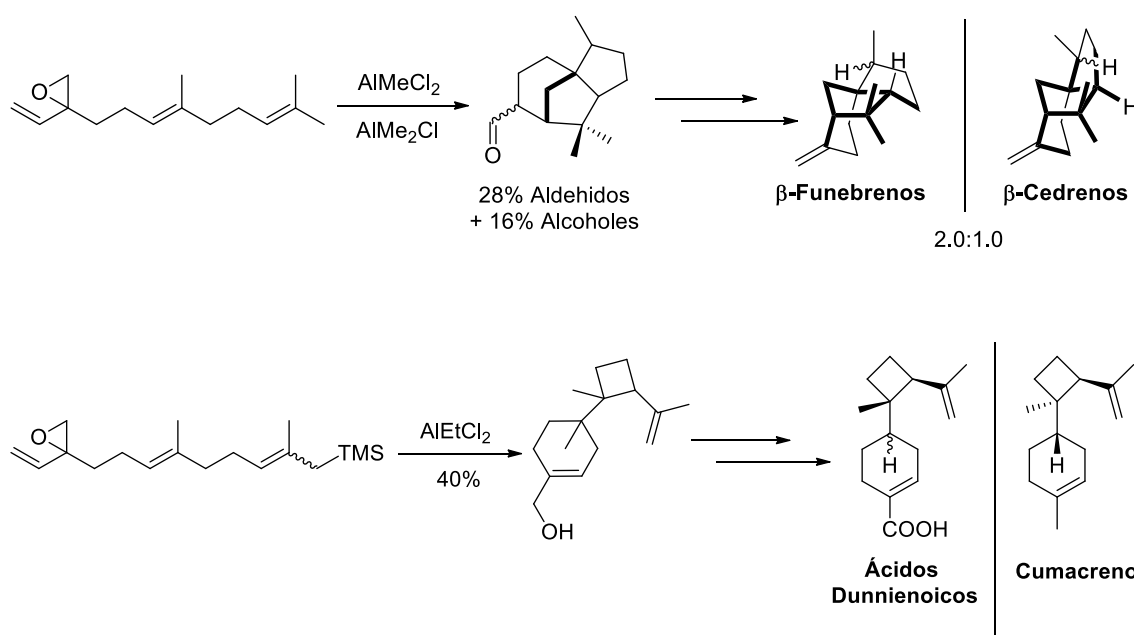


Esquema 29. Ciclación de epóxido terminado en areno mediante InBr_3 .

¹¹³ Corey, E. J.; Sodeoka, M. *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 7005-7008.

¹¹⁴ Jun-Feng, Z.; Yu-Jun, Z.; Teck-Peng, L. *Chem. Comm.* **2008**, 11, 1353-1355.

Recientemente, estas policiclaciones aplicadas a vinil-epóxidos en presencia de ácidos de Lewis han permitido obtener terpenos tensionados e inestables nunca antes sintetizados, con moderados rendimientos.¹¹⁵ En estas ciclaciones cola-cabeza no se consigue un buen estereocontrol, al contrario de lo que ocurre casi exclusivamente en las ciclaciones cabeza-cola,¹¹⁶ obteniendo un estado de transición tipo silla bien definido para dar el esqueleto de *trans*-decalina.



Esquema 30. Ciclaciones usando ácidos de Lewis para obtener terpenos altamente tensionados e inestables.

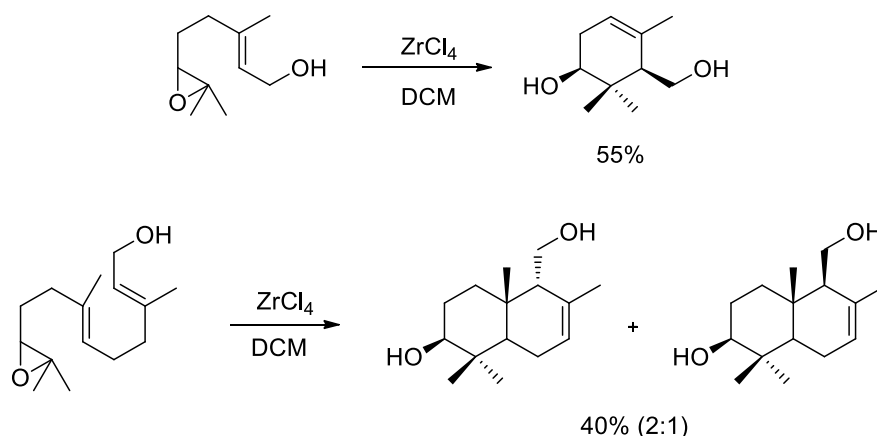
No existen prácticamente antecedentes de ciclaciones de epoxipoliprenos con $ZrCl_4$, excepto para el epoxifarnesol y epoxigeraniol (Esquema 31),¹¹⁷ y sus aplicaciones para la síntesis de α -ionona y α -damascona.¹¹⁸

¹¹⁵ Pronin, S. V.; Shenvi, R. A. *Nat. Chem.* **2012**, *4*, 915-920.

¹¹⁶ Shenvi, R. A.; Corey, E. J. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 3548-3551.

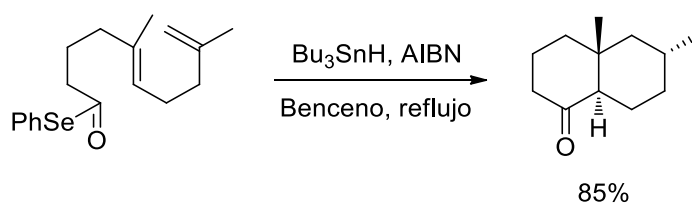
¹¹⁷ Vidari, G.; Beszant, S.; El Merabet, J.; Bovolenta, M.; Zanoni, G. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 2687-2690.

¹¹⁸ Bovolenta, M.; Castronovo, F.; Vadalá, A.; Zanoni, G.; Vidari, G. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 8959-8962.



Esquema 31. Ciclación de epoxigeraniol y epoxifarnesol con $ZrCl_4$.

En cuanto a ciclaciones biomiméticas radicalarias, merece mencionarse el método puesto a punto por G. Pattenden y colaboradores, que emplea acilselenios.¹¹⁹ Mediante reducción de acilselenios con $Bu_3SnH/AIBN$ preparan el acilradical que origina las ciclaciones (Esquema 32). En estos procesos aunque hay que sintetizar el precursor inicial, y la reacción de ciclación termina de manera reductora con incorporación final de hidrógeno, los rendimientos mejoran a los catiónicos. La estereoquímica de las ciclaciones es idéntica a la observada en procesos iónicos.



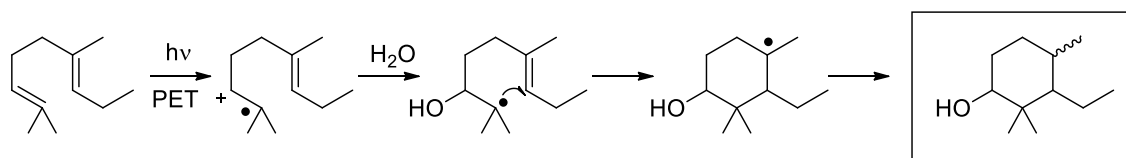
Esquema 32. Ciclación radicalaria usando derivado de acilselenio.

Otra metodología interesante es la ciclación fotoinducida en polienos, vía catión-radical, puesta a punto por H. Demuth *et al.*,¹²⁰ que consiste en la irradiación de una olefina disuelta en $CH_3CN:H_2O$ (20:1), en presencia de un aceptor de

¹¹⁹ (a) Chen, L.; Gill, G. B.; Pattenden, G. *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 2593-2596. (b) Pattenden, G.; Handa, S. J. *Chem. Soc. Perkin Trans I* **1999**, 843-847.

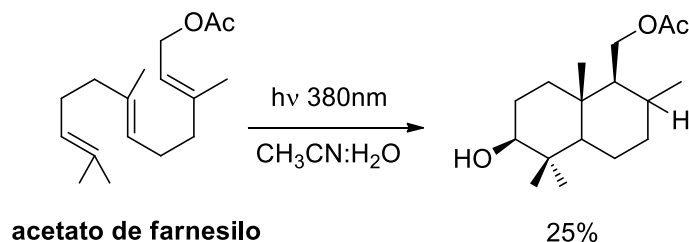
¹²⁰ Hoffman, U.; Gao, Y.; Pandey, B.; Kingle, S.; Warzecha, K.; Krüger, C.; Roth, H. D.; Demuth, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 10358-10359.

electrones como 1,4-dicianobenceno. El catión-radical intermedio es generado vía PET (photoinduced electron transfer) y capturado por un nucleófilo presente en el medio, normalmente agua, de manera regioselectiva (anti-Markovnikov) (Esquema 33).



Esquema 33. Ciclación fotoinducida de polienos (PET).

En el proceso, tras la adición nucleófila de H₂O al catión-radical, se produce la ciclación, finalizando con la reducción del radical final a hidrocarburo. Cuando se aplica sobre acetato de farnesilo se obtiene un 25% de 11-acetoxi-3-hidroxi-3-drimano (Esquema 34).

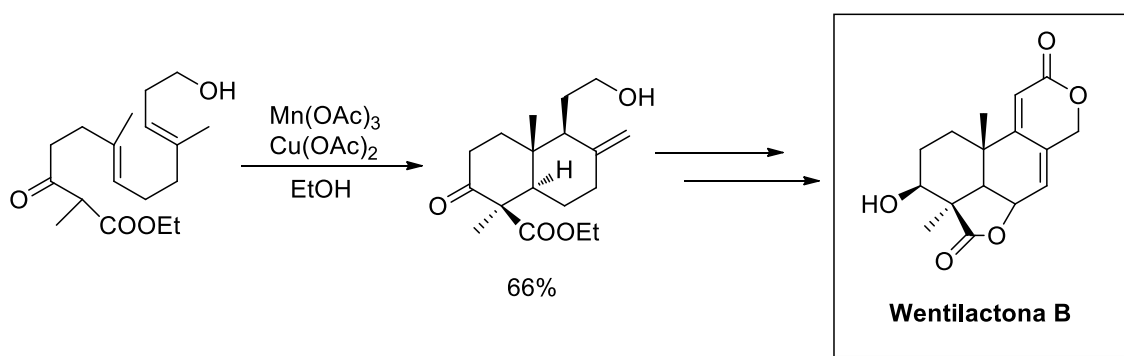


Esquema 34. Ciclación de acetato de farnesilo fotoquímicamente.

Dentro de las ciclaciones radicalarias se han usado también metales de transición¹²¹ como alternativa a la química radicalaria de estannanos, ya que los intermedios de estas reacciones se pueden comportar de manera diferente. Así se emplean sales de Mn^{III}¹²² o Fe^{III} [Cp₂Fe^{III}PF₆]¹²³ para oxidar enolatos a radicales.

¹²¹ (a) Gansäuer, A.; Bluhm, H. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2771-2788. (b) Iqbal, J.; Bhatia, B.; Nayyar, N. K. *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 519-564.

¹²² (a) Heiba, E. I.; Dessau, R. M.; Koehl Jr., W. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 2706-2707. (b) Heiba, E. I.; Dessau, R. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 524-527. (c) Heiba, E. I.; Dessau, R. M.; Rodewald, P. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 7977-7981. (d) Heiba, E. I.; Dessau, R. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 3456-3462. (e) Snider, B. B. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 339-364. (f) Melikyan, G. G. *Org. React.* **1997**, *49*, 427-675. (g) Melikyan, G. G. *Aldrichimica Acta* **1998**, *31*, 50-64. (h) Demir, A. S.; Emrullahoglu, M. *Curr. Org. Synth.*



Esquema 35. Ciclación radicalaria con sales de Mn y Cu.

Una herramienta muy versátil y usada por diferentes autores es la utilización del reactivo de Nugent (monocloruro de titanoceno, Cp_2TiCl) para la ciclación de terpenos puesto a punto inicialmente por nuestro grupo de investigación en 2001.¹²⁴ Se ha demostrado como un agente de transferencia electrónica suave y altamente quimioselectivo, tal y como se observa en aperturas de oxiranos regioselectivas produciendo un β -titanoxi radical. Este intermedio es capaz de adicionarse intramolecularmente a alquenos y alquinos (Esquema 36).¹²⁵ Esta interesante característica lo convierte en una potente ciclase de terpenos artificial. Un desarrollo reciente de la química del titanoceno(III) permite el uso de Cp_2TiCl en cantidades subestequiométricas, junto con agentes de regeneración de Ti^{III} .^{125b,126} Además, su uso en catálisis asimétrica y en síntesis de anillos pequeños,

2007, 4, 321-351. (i) Bush Jr., J. B.; Finkbeiner, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, 90, 5903-5905. (j) Kochi, J. K. *Acc. Chem. Res.* **1974**, 7, 351-360. (k) Kates, S. A.; Dombroski, M. A.; Snider, B. B. *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 2427-2436. (l) Paquette, L. A.; Schaefer, A. G.; Springer, J. P. *Tetrahedron* **1987**, 43, 5567-5582. (m) Snider, B. B.; Merritt, J. E.; Dombroski, M. A.; Buckman, B. O. *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 5544-5553. (n) Barrero, A. F.; Herrador, M. M.; Quílez del Moral, J. F.; Valdivia, M. V. *Org. Lett.* **2002**, 4, 1379-1382.

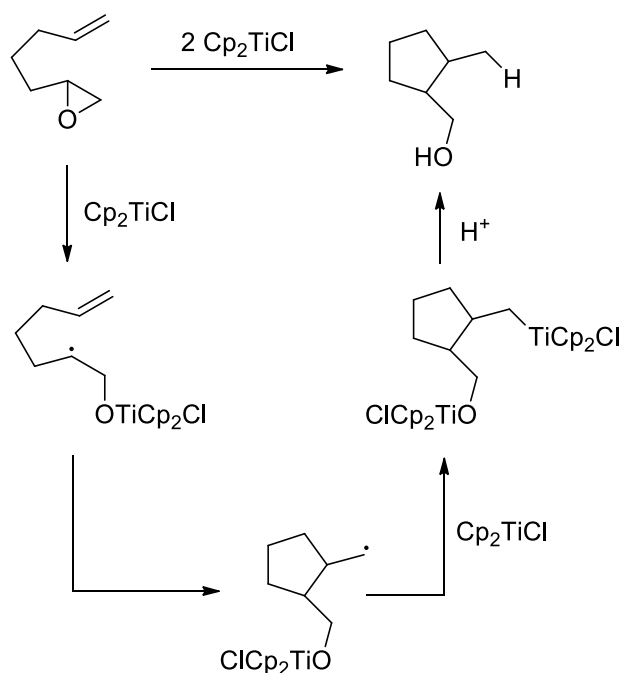
¹²³ Jahn, U.; Hartmann, I. D.; Jones, P. G. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 3333-3355.

¹²⁴ (a) Barrero, A. F.; Quílez del Moral, J. F.; Sánchez, E. M.; Arteaga, J. F. *Eur. J. Org. Chem.*, **2006**, 7, 1627-1641; (b) Barrero, A. F.; Cuerva, J. M.; Herrador, M. M.; Valdivia, M. V. *J. Org. Chem.*, **2001**, 66, 4074-4078. (c) Justicia, J.; Álvarez de Cienfuegos, L.; Campaña, A. G.; Miguel, D.; Jakoby, V.; Gansauer, A.; Cuerva, J. M. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40, 3525-3537. (d) Barrero, A. F.; Herrador, M. M.; Quílez del Moral, J. F.; Arteaga, P.; Arteaga, J. F.; Diéguez, H. R.; Sánchez, E. M. *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 2988-2995. (e) Barrero, A. F.; Herrador, M. M.; Quílez del Moral, J. F.; Arteaga, P.; Arteaga, J. F.; Piedra, M.; Sánchez, E. M. *Org. Lett.* **2005**, 7, 2301-2304. (f) Jimenez, T.; Morcillo, S. P.; Martín-Lasanta, A.; Collado-Sanz, D.; Cárdenas, D. J.; Gansauer, A.; Justicia, J.; Cuerva, J. M. *Chem. Eur. J.* **2012**, 18, 12825-12833.

¹²⁵ (a) RajanBabu, T. V.; Nugent, W. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 986-997. (b) Gansauer, A.; Bluhm, H.; Pierobon, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 12849-12859.

¹²⁶ Barrero, A. F.; Rosales, A.; Cuerva, J. M.; Oltra, J. E. *Org. Lett.* **2003**, 5, 1935-1938.

permite un control de la concentración de especies activas.¹²⁷ Esto es crucial para el éxito de muchas ciclaciones complejas.

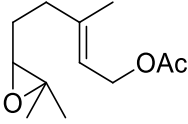
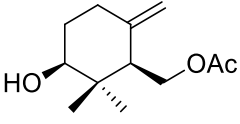
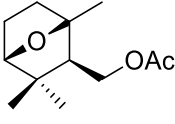
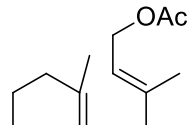
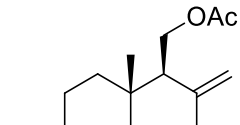
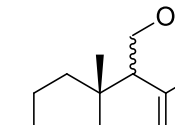
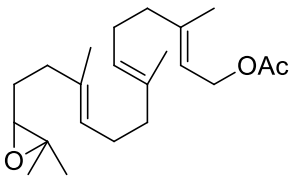
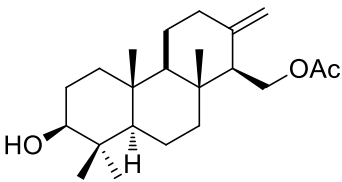
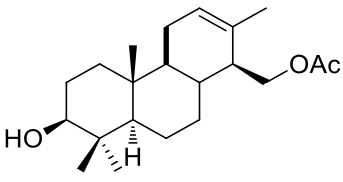


Esquema 36. Mecanismo de la ciclación de epóxidos sobre olefinas mediadas por $Ti^{(III)}$.

Así pues, una comparación entre resultados de ciclaciones radicalarias y catiónicas puede mostrar las principales diferencias entre los dos métodos: (i) Dobles enlaces endocíclicos o éteres cíclicos se forman en el paso final bajo condiciones ácidas en contraposición de las olefinas exocíclicas formadas en condiciones radicalarias; (ii) las reacciones catiónicas no son estereoselectivas pudiéndose obtener mezclas de estereoisómeros; (iii) en ausencia de grupos activantes, los rendimientos de poliprenos simples son bastantes más bajos en ciclaciones catiónicas.

¹²⁷ (a) Gansauer, A.; Fan, C. A.; Piestert, F. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 6916-6917. (b) Gansauer, A.; Lei, S.; Otte, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 11858-11859. (c) Friedrich, J.; Walczak, K.; Dolg, M.; Piestert, F.; Lauterbach, T.; Worgull, D.; Gansauer, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 1788-1796. (d) Gansauer, A.; Worgull, D.; Knebel, K.; Huth, I.; Schankenburg, G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 8882-8885.

Tabla 2. Comparativa entre ciclaciones radicalarias y carbocatiónicas.

Epoxipolipreno	Condiciones radicalarias con Ti(III)	Condiciones catiónicas
	 51%	 22%
	 40%	 10%
	 31%	 10%

Nuestro Grupo de Investigación viene investigando desde hace más de veinte años en Química de Productos Naturales, manteniendo líneas de trabajo en a) Biotecnología de Hongos, b) Búsqueda de nuevas moléculas naturales bioactivas o de interés sintético y c) Síntesis de Terpenoides Bioactivos. Dentro de esta última ha profundizado en la aplicación de dos estrategias generales, por una parte el uso de sintones naturales novedosos obtenidos en su mayor parte de fuentes vegetales,¹²⁸ resultado de trabajos del grupo, y por otra el empleo de ciclaciones biomiméticas.¹²⁹

¹²⁸ (a) Barrero, A. F.; Herrador, M. M.; Arteaga, P.; Arteaga, J. F.; Arteaga, A. F. *Molecules* **2012**, *17*, 1448-1467. (b) Barrero, A. F.; Herrador, M. M.; Arteaga, P.; Castillo, A.; Arteaga, A. F. *Nat. Prod. Comm.* **2011**, *6*, 439-442. (c) Barrero, A. F.; Herrador, M. M.; Quílez del Moral, J. F.; Arteaga, P.; Meine, N.; Pérez-Morales, M. C.; Catalán, J. V. *Org. Biom. Chem.* **2011**, *9*, 1118-1125. (d) Barrero, A. F.; Herrador, M. M.; Arteaga, P.; Catalán, J. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, *21*, 3589-3594. (e) Barrero, A. F.; Herrador, M. M.; Arteaga, P.; Catalán, J. V. *Nat. Prod. Comm.* **2008**, *3*, 567-576. (f) Barrero, A. F.; Herrador, M. M.;

Arteaga, P.; Arteaga, J. F.; Burillo, J. *Nat. Prod. Comm.* **2008**, *3*, 379-381. (g) Aranda, G.; Azerad, R.; Maurs, M.; Bertho, G.; Jiménez-González, D.; Cabrera-Torres, E.; Barrero, A. F. *Phytochemistry* **2000**, *54*, 23-27. (h) Barrero, A. F.; Álvarez-Manzaneda, E.; Lara, A. *Tet. Lett.* **1995**, *36*, 6347-6350. (i) Barrero, A. F.; Altarejos, J.; Álvarez-Manzaneda, E. J.; Ramos, J. M.; Salido, S. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 9525-9534. (j) Barrero, A. F.; Oltra, E. J.; Cabrera, E.; Herrador, M. M.; Rojas, F. J.; Reyes, J. F.; Godoy, F. *Nat. Prod. Lett.* **1992**, *1*, 155-160. (k) Barrero, A. F.; Oltra, J. E.; Herrador, M. M.; Cabrera, E.; Sánchez, J. F.; Quílez del Moral, J. F.; Rojas, F. J.; Reyes, J. F. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 141-150.

¹²⁹ (a) Pérez-Morales, M. C.; Catalán, J. V.; Domingo, V.; Jaraiz, M.; Herrador, M. M.; Quílez del Moral, J. F.; López-Pérez, J. L.; Barrero, A. F. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 6598-6612. (b) Domingo, V.; Arteaga, J. F.; López-Pérez, J. L.; Peláez, R.; Quílez del Moral, J. F.; Barrero, A. F. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 341-350. (c) Barrero, A. F.; Herrador, M. M.; López-Pérez, J. L.; Arteaga, J. F.; Catalán, J. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 4782-4785. (d) Sánchez, E. M.; Arteaga, J. F.; Domingo, V.; Quílez del Moral, J. F.; Herrador, M. M.; Barrero, A. F. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 5111-5118. (e) Barrero, A. F.; Herrador, M. M.; Quílez del Moral, J. F.; Arteaga, P.; Sánchez, E. M.; Arteaga, J. F.; Piedra, M. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, *15*, 3434-3441. (f) Barrero, A. F.; Oltra, E.; Morales, V.; Álvarez, M.; Rodríguez-García, I. *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 1034-1035. (g) Barrero, A. F.; Sánchez, J. F.; Barrón, A.; Ramírez, A. *Phytochemistry* **1991**, *31*, 332-335.

VI. ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN

ARTÍCULO 1



	Title20	Year	IMPACT_FACTOR	EIGENFACTOR	CATEGORY_RANKING	QUARTILE_RANK	Categorías
1	ORG BIOMOL CHEM	2011	3.696	0.052	11/56	Q1	EE

Copyright 2013 Thomson Reuters®. Source : Journal Citation Reports
 Para cualquier uso derivado de los indicadores u otras preguntas del JCR por favor contactar con infowok@fecyt.es

New apocarotenoids and β -carotene cleavage in *Blakeslea trispora*†Alejandro F. Barrero,^{*a} M. Mar Herrador,^a Pilar Arteaga,^a Jesús Gil,^a Jose-Antonio González,^a Eugenio Alcalde^b and Enrique Cerdá-Olmedo^{*b}

Received 5th May 2011, Accepted 17th June 2011

DOI: 10.1039/c1ob05712j

Mixed cultures of strains of opposite sex ("mated" cultures) of *Blakeslea trispora* contain trisporic acids and other apocarotenoids, some of which mediate the sexual responses of this fungus and other Mucorales. In mated cultures of the wild-type strains F986 and F921 we identified eleven apocarotenoids: two C₁₈ trisporoids, three C₁₅ compounds with a monocyclofarnesane skeleton, a C₁₃ compound, and five C₇ compounds with a 2-methylhexane skeleton. Six of them are new natural products and two others are new for *Blakeslea*. Their structures were established by NMR and mass spectra and those of the C₇ and C₁₃ compounds were confirmed by chemical synthesis. The finding of these compounds and the presence of approximately equimolar amounts of the C₁₈, C₁₅, and C₇ families led to the conclusion that β -carotene is initially split in three fragments by cleavage of its 13,14 and 11',12' double bonds.

Introduction

β -Carotene (**1**, Fig. 1) is a natural pigment, antioxidant, and provitamin A with many applications in the alimentary, pharmaceutical, and cosmetic industries.¹ It is obtained commercially by either chemical synthesis or biotechnology, particularly from the fungus *Blakeslea trispora* (syn. *Choanephora trispora*, Mucoromycotina, Mucorales, Choanephoraceae). The wild-type strains of this fungus belong to either the (+) or the (−) sex, and many pairs of strains of opposite sex, cultured together ("mated" cultures), increase their β -carotene content and start the morphological program of the sexual cycle. These physiological effects were attributed to apocarotenoids such as trisporic acid **2** and similar compounds present in mated cultures of *Blakeslea*.² The culture media of *Blakeslea* contain apocarotenoids with 18 carbons (**2–14**),^{2a,3} called trisporoids, or with 15 carbons (**15–17**),⁴ often called apotrisporoids because they were presumed to derive from the former.⁵ On the other hand two apocarotenoids with 7 carbons (**23, 24**) have been found recently in cultures from another Mucoral, *Phycomyces blakesleeanus*.^{6a}

We have studied the apocarotenoids in cultures of our standard wild types of *B. trispora*. The structure of the identified products and their relative amounts indicate that the apocarotenoids of *B. trispora* derive from an asymmetrical double cleavage of β -carotene.

Results and discussion

Results

We analyzed the agar medium where the strains F986, sexually (+), and F921, sexually (−) of *B. trispora* had been cultured together for three days. A clean medium, obtained by freezing and squeezing the agar and centrifuging the resulting liquid, was brought to pH 8 with NaOH and extracted with ethyl acetate. This "neutral extract" was fractionated by semi-preparative normal-phase HPLC. The remaining water solution was brought to pH 2 with HCl and extracted with ethyl acetate. This "acid extract" was fractionated in the same way after methylation with (trimethylsilyl)diazomethane (TMSCHN₂).

We isolated eleven apocarotenoids: three C₁₅ (**18** and **19**, as methyl esters, and **17**), two C₁₈ (the 9*E* and 9*Z* isomers of **2**, both as methyl esters), five C₇ (**20–24**), and one C₁₃ apocarotenoid (**25**, as methyl ester) (Fig. 2). The structures of five of them (**17, 23, 24**, and the 9*E* and 9*Z* isomers of **2**) were determined by comparing their spectroscopic data with those reported in the literature.^{6c,6} Apocarotenoid **25** is a new natural product, but its methyl ester (**25a**) has been described as an intermediate in the synthesis of trisporic acid **B**.⁷ The five remaining apocarotenoids (**18–22**) are new to science.

Apocarotenoid **22** is the most abundant C₇ apocarotenoid in our cultures. Its molecular formula C₇H₁₂O₂ was deduced from HRFABMS. Its IR spectrum showed the absorption bands of a hydroxyl group at 3447 cm^{−1} and of a conjugated diene at 1600 and 1650 cm^{−1}. The ¹³C NMR spectrum showed seven signals: two primary alcohol signals at δ 63.6 and 68.3, a methyl signal at δ 14.1, and four signals for disubstituted and trisubstituted double bonds at δ 137.9 (C), 131.8 (CH), 127.1 (CH) and 123.8 (CH). The 2-methyl-2,4-hexadiene skeleton was established by the direct

^aDepartment of Organic Chemistry, Institute of Biotechnology, University of Granada, Avda. Fuente Nueva, s/n, 18071, Granada, Spain. E-mail: afbarre@ugr.es; Fax: +34 958243318; Tel: +34 958243318

^bDepartment of Genetic, Faculty of Biology, University of Sevilla, Reina Mercedes, s/n, 41071, Sevilla, Spain. E-mail: eco@us.es; Tel: +34 954624107

† Electronic supplementary information (ESI) available: NMR spectra of all compounds. See DOI: 10.1039/c1ob05712j

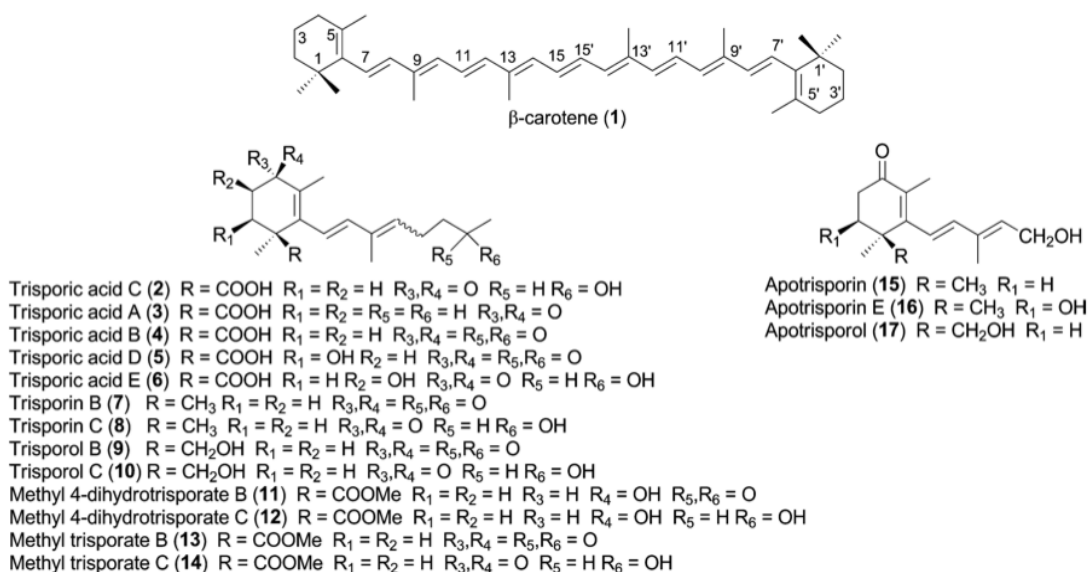


Fig. 1 Apocarotenoids isolated from cultures of different strains of *Blakeslea trispora*.

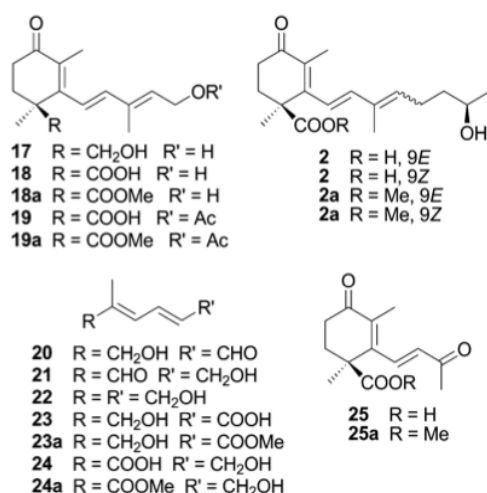


Fig. 2 Apocarotenoids isolated from mated cultures of the *B. trispora* wild-type strains F986 and F921.

coupling of the three olefinic protons in the ¹H NMR spectrum at δ 6.43 (dd, $J_1 = 11.0$ Hz, $J_2 = 15.1$ Hz), 6.02 (d, $J = 11.0$ Hz), and 5.78 (dt, $J_1 = 5.5$ Hz, $J_2 = 15.1$ Hz). The *E* stereochemistry of the disubstituted double bond was deduced from its coupling constant (15.1 Hz) and that of the trisubstituted one, from the chemical shifts at C-1 (δ 68.3) and C-7 (δ 14.1) in the ¹³C NMR spectrum.⁸ We conclude that compound **22** is (2*E*,4*E*)-2-methyl-2,4-hexadiene-1,6-diol.

Compound **20** and **21** shared most of their ¹H NMR signals with compound **22** (Table 1). The ¹H NMR spectrum of compound **20** lacked one of the CH₂OH signals (δ 4.15, d, $J = 5.5$ Hz) of compound **22**, but showed a CHO signal (δ 9.62, d, $J = 8.0$ Hz). The ¹H

Table 1 ¹H and ¹³C NMR data of **20–22**^a

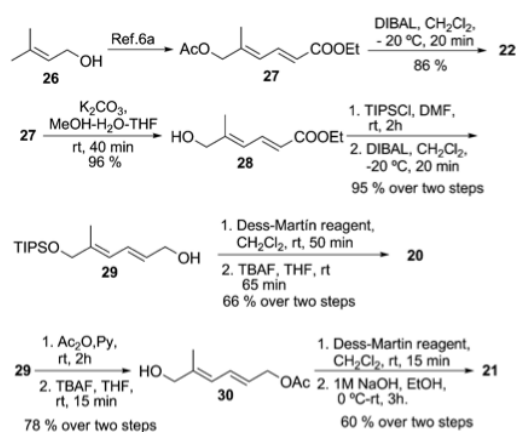
20		21		22	
C	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{H}	δ_{C}
1	9.62 d (8.0)	194.1	9.48 s	4.02 s	68.3
2	6.09 dd (8.0; 15.1)	121.7	—	—	137.9
3	7.65 dd (11.6; 15.1)	148.7	7.03 d (11.2)	6.02 d (11.0)	123.8
4	6.48 d (11.6)	131.7	6.85 dd (11.2, 15.1)	6.43 dd (11.0; 15.1)	131.8
5	—	152.6	6.44 dt (4.6; 15.1)	5.78 dt (5.5; 15.1)	127.1
6	4.18 br s	67.0	4.31 d (4.6)	4.15 d (5.5)	63.6
7	1.92 s	14.6	1.82	1.73	14.1

^a δ in ppm. *J* in Hz in parentheses.

NMR spectrum of compound **21** lacked the other CH₂OH signal (δ 4.02, s) of compound **22**, but showed a CHO signal (δ 9.48, s).

The proposed structures for **20–22** were confirmed by chemical synthesis (Scheme 1).

An efficient synthesis of acetoxyester **27** from the commercial prenol **26** (3-methylbut-2-en-1-ol) has been reported.^{6a} Reduction of **27** with excess diisobutylaluminium hydride (DIBAL) produced **22** with a yield of 86%, whereas the chemoselective saponification of the acetoxy group with K₂CO₃ produced the hydroxyester **28** with a yield of 96%. Protection of **28** with triisopropylsilyl chloride (TIPSCl) and reduction with DIBAL produced to **29** with a yield of 95%. Oxidation of **29** with the Dess–Martin reagent and removal of the silyl protection with tetrabutylammonium fluoride (TBAF) produced **20** with a yield of 66%. Acetylation of **29** with Ac₂O/pyridine and removal of the silyl protection with TBAF produced **30** with a yield of 78%. Oxidation of **30** with the Dess–Martin reagent and saponification with 1 M NaOH produced **21** with a yield of 60%. The spectroscopic data of the synthetic products coincided with those of the natural products.



Scheme 1 Synthesis of the apocarotenoids 20–22.

Table 2 ^1H and ^{13}C NMR data of 17, 18a, 19a^a

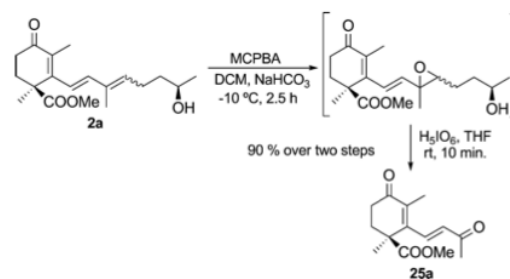
C	17		18a		19a	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1	—	41.2	—	—	46.9	—
2a	1.69–1.73 m	33.9	1.92–1.97 m	—	34.5	1.91–1.96 m
2b	2.23–2.29 m	—	2.37–2.43 m	—	—	2.36–2.41 m
3a	2.53–2.60 m	31.8	2.50–2.54 m	—	33.5	2.45–2.53 m
3b	2.53–2.60 m	—	2.50–2.54 m	—	—	2.45–2.53 m
4	—	199.0	—	—	197.4	—
5	—	135.5	—	—	132.5	—
6	—	157.4	—	—	152.3	—
7	6.22 d (16.3)	124.6	6.34 s	—	124.6	6.30 d (16.5)
8	6.26 d (16.3)	140.3	6.34 s	—	139.8	6.35 d (16.5)
9	—	135.5	—	—	135.9	—
10	5.76 t (6.8)	132.8	5.77 dd (1.1; 6.6)	—	134.1	5.67 br t (6.9)
11	4.34 d (6.8)	59.4	4.33 d (6.6)	—	59.6	4.72 d (6.9)
12	1.86	13.8	1.83 s	—	12.5	1.85 s
13a	3.44 d (11.0)	69.5	—	—	176.3	—
13b	3.73 d (11.0)	—	—	—	—	—
14	1.14	21.7	1.54 s	—	23.0	1.49 s
15	1.87	12.5	1.94 s	—	12.3	1.92 s
OH	1.53 br s	—	—	—	—	—
OMe	—	—	3.69 s	—	52.5	3.67 s
Ac	—	—	—	—	—	170.9
Ac	—	—	—	—	—	2.06 s

^a δ in ppm. *J* in Hz in parentheses.

The molecular formula of methyl ester of apocarotenoid **18** (**18a**) was $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_4$ according to its HRFABMS. Its structure was established from its NMR data (Table 2), which indicated a COOMe group attached to C1, instead of the CH_2OH group of the well known apotrisporol (**17**).

The spectroscopic data of methyl ester of **19** (**19a**) led us to the conclusion that **19a** was the acetyl derivative of **18a** (Table 2).

Compound **25** is the first C_{13} apocarotenoid isolated in the Mucorales. It is found in very small amounts in the cultures and could have been formed from a C_{15} or C_{18} apocarotenoid by spontaneous oxidative breakage or a retroaldol reaction. It was identified by comparison of spectral data of its methyl ester **25a** with those published for a synthetic compound.⁷ The structure was confirmed by semisynthesis (Scheme 2).

Scheme 2 Synthesis of apocarotenoid **25a**.

The reaction of the methyl ester of the trisporic acid **C** (**2a**) with *m*-chloroperoxybenzoic acid (MCPBA) produced the regioselective epoxidation of the 9,10 double bond. Treatment of the crude product with periodic acid produced **25a** with an overall yield of 90%. Its spectroscopic data coincided with those of the natural product.

A semiquantitative analysis based on the ^1H NMR signals from spectra of the “neutral extract” and “acid extract” indicated that the three groups of apocarotenoids (trisporoids with 18 carbons, cyclofarnesoids with 15 carbons, and methylhexadienes with 7 carbons) were found in approximately equimolar amounts. For this summation the small amount of the only C_{13} apocarotenoid can be disregarded.

Small amounts of compounds **23** and **24** and of three other compounds were detected by their UV absorption in the chromatograms of the wild type F921, but not in those of strain SB64, a mutant derived from it and completely devoid of β -carotene. This confirms that **23** and **24** are apocarotenoids, as shown already for *Phycomyces*.^{6a}

Discussion

There are four reasons to think that the compounds described here derive from β -carotene: the structural similarity between them and three segments of the β -carotene molecule (Fig. 3); the approximate equimolar amounts of trisporoids, cyclofarnesoids, and methylhexadienes; the early label experiments by Austin *et al.*,^{2b} and the comparisons^{6a} of wild-type strains with mutants devoid of β -carotene.

These arguments indicate that the three families of apocarotenoids of *Blakeslea* result from the double oxidative cleavage of β -carotene at its 13,14 and 11',12' double bonds. This mechanism was already shown for *Phycomyces*^{6a} and is likely to be common to all Mucorales.

Our results with *Blakeslea* and the previous ones with *Phycomyces* argue strongly against the hypothesis^{2b} that trisporic acids derive from β -carotene *via* retinal. This hypothesis was already suspicious because of the failure of the efforts to identify retinal in *Phycomyces* cultures. Our results also reject the alternative hypothesis that β -carotene is cut twice at its 13,14 and 13',14' double bonds to produce the first trisporoid and that C_{15} apocarotenoids result from the secondary loss of three carbon atoms of the side chain.

The two C_7 compounds with an aldehyde group and a hydroxy group **20** and **21** were the least abundant and probably represent metabolic intermediates. The likely biosynthetic pathway would

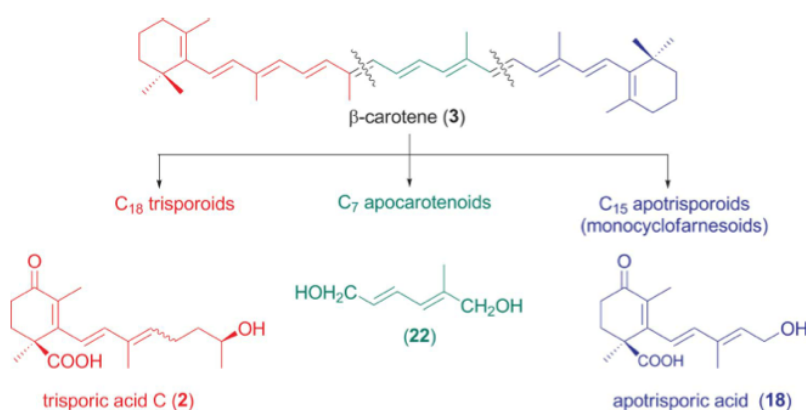


Fig. 3 The three families of apocarotenoids in *Blakeslea trispora*. According to our results, β-carotene, **1**, must be split at the points indicated by the wavy lines to produce compounds with 18 carbons (left), 7 carbons (center), and 15 carbons (right). The example given for each group is one of the compounds reported here.

start with the reduction of one end of the initial dialdehyde, not detected. *Phycomyces* oxidizes the other end to a carboxylic group, while *Blakeslea* has the additional capability to form a diol.

The metabolism of the apocarotenoids is not well fixed or conserved in the Mucorales, not even in strains assigned to the same species. Thus, we have not found fourteen apocarotenoids previously identified in other strains of *B. trispora*, but have added eight new ones to the list.

Conclusions

The Mucorales produce a large diversity of apocarotenoids, depending not only on the taxonomic species, but on the particular strains. Of the eleven apocarotenoids found in mated cultures of *B. trispora* strains F986 and F921, six are new natural products and two are new for *Blakeslea*, while fourteen other apocarotenoids reported from other strains of *Blakeslea* have not been found now. The eleven apocarotenoids include two C₁₈ compounds, three C₁₅ compounds, five C₇ compounds, and a small amount of one C₁₃ compound. The initial step in the biosynthesis of the apocarotenoids is a double cleavage of β-carotene at its 13,14 and 11',12' double bonds, which gives rise to the heads of the C₁₈, C₁₅, and C₇ families of apocarotenoids. This mechanism, already seen in *Phycomyces*, is likely to be general to the Mucorales.

Experimental

General details

For general details see Polaino *et al.*^{6a}

Strains and culture conditions

Strains F986 and F921 are wild-type (+) and (–) strains of *Blakeslea (Choanephora) trispora*, respectively, and were obtained from VKM (All-Russian Collection of Microorganisms, Moscow, Russia). Plates containing 25 ml minimal agar medium⁹ were inoculated with 5×10^3 spores of each sex and incubated in the dark at 30 °C for three days.

Extraction and fractionation of apocarotenoids

For the extraction and fractionation of apocarotenoids see Polaino *et al.*^{6a}

An initial extract of 500 mL (from 1 L of medium of mated cultures F921 × F986) yielded neutral and acid dry extracts of 114 and 246 mg, respectively.

The neutral extract (70 mg) was fractionated by semi-preparative HPLC. The fraction (10.2 < RT < 15.4 min, 5 mg) contained **20**. The fraction (15.4 < RT < 17.8 min, 20 mg) contained a 2 : 1 : 12 mixture of **20**:**21**:**22**. The fraction (17.8 < RT < 21.5 min, 5.2 mg) contained a mixture 3 : 1 mixture of **22**:**17**. The fraction (21.5 < RT < 25.4 min, 11 mg) contained **17**.

The acid fraction was methylated with TMSCHN₂ and then it was also fractionated by semi-preparative HPLC.

(2E,4E)-6-Hydroxy-5-methyl-2,4-hexadienal (20). Yellow syrup. ¹H NMR (500 MHz, CO(CD₃)₂): see Table 1; ¹³C NMR (125 MHz, CO(CD₃)₂): see Table 1; *m/z* (HRMS(FAB)) 149.0580 (M + Na. C₇H₁₀O₂Na requires 149.0579).

(2E,4E)-6-Hydroxy-2-methyl-2,4-hexadienal (21). Yellow syrup. ¹H NMR (500 MHz, CO(CD₃)₂): see Table 1; *m/z* (HRMS(FAB)) 149.0580 (M + Na. C₇H₁₀O₂Na requires 149.0579).

(2E,4E)-2-Methyl-2,4-hexadiene-1,6-diol (22). Colourless syrup. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): see Table 1; ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): see Table 1; *m/z* (HRMS(FAB)) 151.0734 (M + Na. C₇H₁₂O₂Na requires 151.0735).

Apotrisporol (17). Colourless syrup. It has been identified by spectroscopic data (see Table 2). These data were consistent with those previously reported.^{4c}

Methylation of the acid fraction

TMSCHN₂ 2 M in Et₂O (232 μL) was added under stirring to a solution of the acid fraction (70 mg) in C₆H₆:MeOH (4 : 1 v/v) (2.2 mL) at 0 °C. The solution was left for 5 min at room temperature and the solvent was evaporated at low pressure to obtain a methyl

ester mixture (80 mg) that was fractionated by semi-preparative HPLC. The fraction (10.5 < RT < 13.1 min, 3.4 mg) contained **19a**. The fraction (13.4 < RT < 15.9 min, 9 mg) contained a 2 : 1 mixture of **23a** and **24a**. The fraction (16.1 < RT < 16.5 min, 9.5 mg) contained **2a(9E)**. The fraction (16.5 < RT < 17.0 min, 3.9 mg) contained a 2 : 2 : 1 mixture of **2a(9E)**, **2a(9Z)** and **25a**. The fraction (17.0 < RT < 18.4 min, 11.9 mg) contained a 5 : 1 mixture of **2a(9Z)** and **25a**. The fraction (18.4 < RT < 20.7 min, 10 mg) contained **2a(9Z)**. The fraction (20.7 < RT < 23.1 min, 4 mg) contained a 2 : 1 mixture of **2a(9Z)** and **18a**. The fraction (23.1 < RT < 25.6 min, 6 mg) contained **18a**.

(2E,4E)-6-hydroxy-5-methylhexa-2,4-dienoic acid (23, as methyl ester) and (2E,4E)-6-hydroxy-2-methylhexa-2,4-dienoic acid (24, as methyl ester). Their spectroscopic data coincided with those previously reported.^{6a}

Apotrisporic acid (18, as methyl ester). Colourless syrup. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): see Table 2; ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): see Table 2; *m/z* (HRMS(FAB)) 301.1414 (M + Na. C₁₆H₂₂O₄Na requires 301.1416).

Apotrisporic acid 11-acetate (19, as methyl ester). Colourless syrup. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): see Table 2; ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): see Table 2; *m/z* (HRMS(FAB)) 343.1518 (M + Na. C₁₈H₂₄O₅Na requires 343.1521).

(7E,9E)-Trisporic acid C (2(9E)), as methyl ester. Colourless syrup. Its spectroscopic data coincided with those previously reported.^{6c}

(7E,9Z)-Trisporic acid C (2(9Z)), as methyl ester. Colourless syrup. Its spectroscopic data coincided with those previously reported.^{6b,c}

Methyl (E)-1,3-dimethyl-4-oxo-2-(3-oxo-1-butenyl)-2-cyclohexene-1-carboxylate (25a). Colourless syrup. Its spectroscopic data coincided with those previously reported.⁷

Preparation of 25a

m-CPBA (64 mg, 0.27 mmol) in DCM (0.8 mL) was added dropwise to a mixture of **7** (50 mg, 0.16 mmol) in dichloromethane (DCM) (2.6 mL) and 0.5 M NaHCO₃ (0.5 mL) under stirring and argon at 0 °C. After 2.5 h, the mixture was diluted with *t*-butyl methyl ether and washed with 0.5 M NaHCO₃, a saturated solution of sodium thiosulfate and brine, successively. The organic phase was dried over anhydrous Na₂SO₄ and filtered. The residue obtained (50 mg) after removing the solvent under low pressure was dissolved in THF (2.6 mL) and H₂IO₆ (35.7 mg, 0.16 mmol) was added at room temperature. After 10 min, water (10 mL) was added to the mixture and tetrahydrofuran (THF) was removed under low pressure. The aqueous phase was extracted with *t*-butyl methyl ether and the organic phase was dried over anhydrous Na₂SO₄ and filtered. The residue obtained after removing the solvent under low pressure was chromatographed in a silica gel column (hexane : *t*-butyl methyl ether, 1/1, v/v) to obtain **25** (36 mg, 90%).

Preparation of (2E,4E)-6-hydroxy-5-methyl-2,4-hexadienal (20)

Saponification of 27. Preparation of ethyl (2E,4E)-6-hydroxy-5-methyl-2,4-hexadienoate (28). K₂CO₃ (20 g) and K₂CO₃ 2 M

(43 mL) were added to a solution of **27** (1.4 g, 6.65 mmol) in THF (84 mL) and MeOH (25 mL). The mixture was stirred for 40 min at room temperature. Then the solvent was evaporated under low pressure to obtain a residue that was extracted with Et₂O. The organic phase was washed with brine, dried over anhydrous Na₂SO₄ and filtered. The residue obtained after removing the solvent under low pressure was chromatographed in a silica gel column (petroleum ether (bp 30–40 °C)/Et₂O, 50/50, v/v) to obtain **28** (1.08 g, 96%).

Ethyl (2E,4E)-6-hydroxy-5-methyl-2,4-hexadienoate (28). Yellow oil. IR *v*_{max}(film)/cm⁻¹ 3435, 1641, 1308, 1276, 1160, 1035 and 983; δ_{H} (300 MHz; CDCl₃; Me,Si) 7.62 (1H, dd, *J* 11.7 and 15.2, H-3), 6.29 (1H, d, *J* 11.7, H-4), 5.91 (1H, d, *J* 15.2, H-2), 4.24 (2H, q, *J* 7.1, OCH₂CH₃), 4.19 (2H, s, H-6), 1.92 (3H, s, H-7), 1.72 (1H, br s, OH) and 1.33 (3H, t, *J* 7.1, OCH₂CH₃); δ_{C} (75 MHz; CDCl₃; Me,Si) 167.5 (C, C-1), 147.2 (C, C-5), 140.0 (CH, C-3), 121.8 (CH, C-4), 121.0 (CH, C-2), 67.6 (CH₂, C-6), 60.4 (CH₂, OCH₂CH₃), 14.7 (CH₃, OCH₂CH₃)^a and 14.4 (CH₃, C-7)^a (^aSignals with the same letter are exchangeable); *m/z* (HRMS(FAB)) 193.0844 (M + Na. C₉H₁₄O₃Na requires 193.0841).

Preparation of hydroxy-ether 29. Imidazole (1.07 g, 15.73 mmol) and TIPSCl (1.45 g, 7.42 mmol) were added to a solution of **28** (1.07 g, 6.29 mmol) in dry DMF (1.1 mL) under argon and stirring at room temperature. After 2 h, the mixture was fractionated in *t*-BuOMe:H₂O (2 : 1). The organic phase was washed successively with HCl 2 N and brine and dried over anhydrous Na₂SO₄. Once the solvent was evaporated under low pressure we obtained a crude product (2.14 g), which was dissolved in dry DCM (121 mL) under argon and chilled at –20 °C. After adding DIBAL (1 M in hexane, 16 mL) the solution was stirred for 20 min and then, H₂O (49 mL) was added. The mixture was stirred at room temperature for 20 min and filtered through a layer of silica gel/anhydrous Na₂SO₄ (2/1, w/w). The layer was washed with Et₂O and the organic phase was evaporated under low pressure to afford a crude product, which was chromatographed over silica gel column (petroleum ether (bp 30–40 °C)/Et₂O, 85/15, v/v) to obtain **29** (1.7 g, 95%).

(2E,4E)-6-Triisopropylsilyloxy-5-methyl-2,4-hexadien-1-ol (29). Colourless syrup. IR *v*_{max}(film)/cm⁻¹ 3327, 2942, 2865, 1641, 1462, 1385, 1113, 1085, 1065, 995 and 882; δ_{H} (500 MHz; CDCl₃; Me,Si) 6.50 (1H, dd, *J* 11.2 and 15.1, H-3), 6.15 (1H, d, *J* 11.2, H-4), 5.80 (1H, dt, *J* 6.0 and 15.1, H-2), 4.20 (2H, d, *J* 6.0, H-1), 4.14 (2H, s, H-6), 1.72 (3H, s, H-7) and 1.04–1.18 (21H, m, TIPS); δ_{C} (125 MHz; CDCl₃; Me,Si) 138.3 (C, C-5), 130.8 (CH, C-3), 127.7 (CH, C-2), 122.2 (CH, C-4), 67.9 (CH₂, C-6), 63.8 (CH₂, C-1), 18.1 (6CH₃, TIPS), 13.9 (CH₃, C-7) and 12.1 (3CH, TIPS); *m/z* (HRMS(FAB)) 307.2071 (M + Na. C₁₆H₃₂O₂Na requires 307.2070).

Preparation of hydroxy-aldehyde 20. The Dess–Martin reagent (1.01 g) was added to a solution of **29** (800 mg, 2.82 mmol) in dry DCM (31 mL) at room temperature under argon. The mixture was left for 50 min under stirring. A saturated solution of Na₂S₂O₃ and NaHCO₃ was then added dropwise to the mixture and extracted with Et₂O. The organic phase was washed with brine, dried over anhydrous Na₂SO₄ and filtered. The residue obtained after evaporating the solvent under low pressure was dissolved in petroleum ether (bp 30–40 °C)/Et₂O (3/1, v/v) and

filtered through silica gel. The residue (713 mg) obtained after evaporating the solvent under low pressure was dissolved in dry THF (37 mL) and mixed with TBAF (1 M in THF, 16 mL), stirred at room temperature for 65 min, diluted with Et₂O (15 mL), and washed with brine. The organic phase was dried over anhydrous Na₂SO₄ and filtered. The residue obtained after removing the solvent under low pressure was chromatographed in a silica gel column (petroleum ether (bp 30–40 °C)/Et₂O, 35/65, v/v) to obtain **20** (234 mg, 66%).

Preparation of (2E,4E)-6-hydroxy-2-methyl-2,4-hexadienal (**21**)

Preparation of hydroxy-acetate 30. A mixture of **29** (730 mg, 2.57 mmol), dry pyridine (11 mL) and acetic anhydride (0.5 mL) was left at room temperature for 2 h and then was worked up as usual to give a crude product (835 mg), which was dissolved in dry THF (33 mL), mixed with TBAF (1 M in THF, 2.2 mL), stirred at room temperature under argon for 15 min, diluted with Et₂O (15 mL), and washed with brine. The organic phase was dried over anhydrous Na₂SO₄ and filtered. The residue obtained after removing the solvent under low pressure was chromatographed in a silica gel column (petroleum ether (bp 30–40 °C)/Et₂O, 1/1, v/v) to obtain **30** (340 mg, 78%).

(2E,4E)-6-Hydroxy-5-methyl-2,4-hexadienyl acetate (30). Colourless syrup. IR ν_{max} (film)/cm⁻¹ 3420, 2917, 2861, 1737, 1662, 1445, 1380, 1365, 1235, 1113, 1071, 1023 and 971; δ_{H} (400 MHz; CDCl₃; Me₄Si) 6.51 (1H, dd, *J* 11.0 and 15.2, H-3), 6.05 (1H, d, *J* 11.0, H-4), 5.71 (1H, dt, *J* 6.3, 15.2, H-2), 4.58 (2H, d, *J* 6.3, H-1), 4.03 (2H, s, H-6), 2.06 (1H, br s, OH), 2.03 (3H, s, COCH₃) and 1.75 (3H, s, H-7); δ_{C} (100 MHz; CDCl₃; Me₄Si) 171.9 (C, COCH₃), 140.0 (C, C-5), 131.0 (CH, C-3), 126.8 (CH, C-2), 123.9 (CH, C-4), 68.3 (CH₂, C-6), 65.4 (CH₂, C-1), 21.1 (CH₃, COCH₃) and 14.2 (CH₃, C-7); *m/z* (HRMS(FAB)) 193.0838 (M + Na. C₉H₁₄O₃Na requires 193.0841).

Preparation of hydroxy-aldehyde 21. The Dess–Martin reagent (1.05 g) was added to a solution of **30** (340 mg, 2.00 mmol) in dry DCM (11 mL) at room temperature under argon. The mixture was left for 15 min under stirring. A saturated solution of Na₂S₂O₃ and NaHCO₃ was then added dropwise to the mixture and extracted with Et₂O. The organic phase was washed with brine, dried over anhydrous Na₂SO₄, and filtered. The residue obtained after evaporating the solvent under low pressure was dissolved in petroleum ether (bp 30–40 °C)/Et₂O (3/1, v/v) and filtered through silica gel. The residue (245 mg) obtained after evaporating the solvent under low pressure was dissolved in EtOH (7.60 mL) and NaOH 1 M (3.80 mL) was added dropwise at 0 °C. The mixture was then left at room temperature for 3 h. The solution was neutralized with HCl 1 N (3.80 mL) and the solvent was evaporated under low pressure. The residue was extracted with EtOAc and the solvent was evaporated under low pressure to obtain **21** (151 mg, 60%).

Preparation of (2E,4E)-2-methyl-2,4-hexadiene-1,6-diol (**22**)

DIBAL (1 M in hexane, 2 mL) was added to a cold (–20 °C) solution of **30** (100 mg, 0.78 mmol) in dry CH₂Cl₂ (9 mL) under argon with stirring. After 20 min, water (3 mL) was added to the mixture, and it was stirred at room temperature for 20 min. The mixture was filtered through a layer of silica gel/anhydrous Na₂SO₄ (2/1, w/w). The layer was washed with Et₂O and the organic phase was evaporated under low pressure to afford a crude product, which was chromatographed over silica gel column (petroleum ether (bp 30–40 °C)/Et₂O, 35/65, v/v) to obtain **22** (65 mg, 86%).

Acknowledgements

This research was financed by Junta de Andalucía (Grants FQM 340, CVI 910, and P08-CVI-03901), and the Spanish Government (Grants BIO2009-12486 and BIO2009-11131), with support from the European Union Feder program.

Notes and references

- (a) A. Ciegler, *Adv. Appl. Microbiol.*, 1965, **7**, 1–34; (b) J. Avalos and E. Cerdá-Olmedo, Fungal carotenoid production in *Handbook of Fungal Biotechnology*, ed. D. K. Arora, Marcel Dekker Inc, New York, 2004, pp. 367–378; (c) P. Bhosale, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2004, **63**, 351–361; (d) K. K. Namitha and P. S. Negi, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2010, **50**, 728–760.
- (a) L. Caglioti, G. Cainelli, B. Camerino, R. Mondelli, A. Prieto, A. Quilico, T. Salvatori and A. Selva, *Tetrahedron*, 1966, **7**, 175–187; (b) D. J. Austin, J. D. Bu'Lock and D. Drake, *Experientia*, 1970, **26**, 348–349; (c) G. W. Gooday, *Annu. Rev. Biochem.*, 1974, **43**, 35–49; (d) M. Nieuwenhuis and H. van den Ende, *Arch. Microbiol.*, 1975, **102**, 167–169; (e) D. Schachtschabel, A. David, K.-D. Menzel, C. Schimek, J. Wöstemeyer and W. Boland, *ChemBioChem*, 2008, **9**, 3004–3012; (f) M. H. Walter and D. Strack, *Nat. Prod. Rep.*, 2011, **28**, 663–692.
- (a) D. J. Austin, J. D. Bu'Lock and G. W. Gooday, *Nature*, 1969, **223**, 1178–1179; (b) G. Cainelli, P. Grasselli and A. Selva, *Chim. Ind.*, 1967, **49**, 628–629; (c) R. P. Sutter, J. Dadok, A. A. Bothner-By, R. R. Smith and P. K. Mishra, *Biochemistry*, 1989, **28**, 4060–4066; (d) J. D. Bu'Lock, B. E. Jones and N. Winskill, *Pure Appl. Chem.*, 1976, **47**, 191–202; (e) R. P. Sutter and J. P. Whitaker, *J. Biol. Chem.*, 1981, **256**, 2334–2341.
- (a) R. P. Sutter and P. D. Zawodny, *Exp. Mycol.*, 1984, **8**, 89–92; (b) R. P. Sutter, *Exp. Mycol.*, 1986, **10**, 256–258; (c) G. Cainelli, B. Camerino, P. Grasselli, R. Mondelli, S. Morrocchi, A. Prieto, A. Quilico and A. Selva, *Chim. Ind.*, 1967, **49**, 748–751.
- (a) R. P. Sutter and J. P. Whitaker, *Naturwissenschaften*, 1981, **68**, 147–148; (b) R. P. Sutter and P. D. Zawodny, *Exp. Mycol.*, 1984, **8**, 89–92.
- (a) S. Polaino, M. M. Herrador, E. Cerdá-Olmedo and A. F. Barrero, *Org. Biomol. Chem.*, 2010, **8**, 4229–4231; (b) D. Schachtschabel and W. Boland, *J. Org. Chem.*, 2007, **72**, 1366–1372; (c) J. D. Bu'Lock, D. Drake and D. J. Winstanley, *Phytochemistry*, 1972, **11**, 2011–2018.
- S. Takahashi, T. Oritani and K. Yamashita, *Tetrahedron*, 1988, **44**, 7081–7088.
- F. W. Wehrli and T. Nishida, *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, ed. W. Herz, H. Grisebach and G. W. Kirby, Springer-Verlag, Wien, 1979, vol. 36, pp. 1–229.
- E. Cerdá-Olmedo, in *Phycomycetes*, ed. E. Cerdá-Olmedo and E. D. Lipson, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1987, pp. 337–339.

ARTÍCULO 2



THOMSON REUTERS

	Title20	Year	IMPACT_FACTOR	EIGENFACTOR	CATEGORY_RANKING	QUARTILE_RANK	Categories
1	ORG BIOMOL CHEM	2012	3.568	0.05509	12/57	Q1	EE

Copyright 2013 Thomson Reuters®. Source : Journal Citation Reports
Para cualquier uso derivado de los indicadores u otras preguntas del JCR por favor contactar con infowok@fecyt.es

Organic & Biomolecular Chemistry

Cite this: *Org. Biomol. Chem.*, 2012, **10**, 3002

www.rsc.org/obc

PAPER

Apocarotenoids in the sexual interaction of *Phycomyces blakesleeanus*†

Silvia Polaino,^a Jose A. Gonzalez-Delgado,^b Pilar Arteaga,^b M. Mar Herrador,^b Alejandro F. Barrero*^b and Enrique Cerdá-Olmedo*^c

Received 20th December 2011, Accepted 20th February 2012

DOI: 10.1039/c2ob07147a

A simple genetic test allowed us to carry out the first systematic study of the apocarotenoids in the Mucorales. We have identified 13 apocarotenoids in the culture media of the fungus *Phycomyces blakesleeanus* (Mucoromycota, Mucorales). Three of these compounds were novel apocarotenoids: (2*S*,8*R*,*E*)-8,14-epoxycyclofarnesyl-4,6,9-triene-2,11-diol (**6**), (2*S*,6*E*,8*E*)-cyclofarnesyl-4,6,8-triene-2,10,11-triol (**7**), and its 6*Z* isomer (**8**). Four of the remaining compounds have been reported previously from this fungus and six from other Mucorales. All of them belong to three families, the 18-carbon trisporoids, the 15-carbon cyclofarnesoids, and the 7-carbon methylhexanoids, derived from the three fragments that result when β -carotene is cleaved at its 11',12' and 12,13 double bonds. The apocarotenoids were more varied and more abundant in mated cultures of strains of opposite sex than in single cultures. The presence of acetate in the medium blocked the production of many apocarotenoids while having little effect on the concentrations of the remaining ones.

Introduction

Natural isolates of *Phycomyces blakesleeanus* and other fungi of the order Mucorales belong to either the (+) or the (–) sex,¹ undistinguishable by their morphology, but defined by their interaction. When mycelia of opposite sex grow near each other, their hyphal tips thicken and develop into zygothores, the first structures of the sexual cycle that eventually produces recombinant progeny. Zygothores are induced by an exchange of sex-specific diffusible signals, the first pheromones reported for any organism.² The mycelia of *Phycomyces* and other Mucorales contain yellow β -carotene (**1**), whose concentration increases during sexual interaction. β -Carotene is not essential for vegetative life, as shown by the isolation of mutants that cannot synthesize it, such as the white *carB* mutants.³ These mutants fail to stimulate their mating partner,⁴ because the sexual pheromones are apocarotenoids, *i.e.*, they derive from fragments of β -carotene.

Following the isolation⁵ of trisporic acid C from mixed cultures of *Blakeslea trispora* of different sex (“mated cultures”)

and the demonstration that it derives from β -carotene,⁶ various apocarotenoids have been reported from *B. trispora*, *Mucor mucedo*, and other Mucorales,⁷ some of which increase the carotene content or induce zygothore formation in test strains. These compounds fall into three families, the 18-carbon trisporoids, the 15-carbon cyclofarnesoids, and the 7-carbon methylhexanoids. The three families derived from the three fragments⁸ that result from cleavage of the 11',12' and 12,13 double bonds of β -carotene by two carotene oxygenases, the products of *Phycomyces* genes *carS* and *acaA*, respectively.⁹

Although *P. blakesleeanus* is the best known of the Mucorales,¹⁰ only four apocarotenoids (**2–5** in Fig. 1) have been reported from its culture media: trisporic acid E (**2**),¹¹ apotrisporine E (**3**),¹² and two isomeric hydroxymethylhexanedienoic acids (**4**, **5**).^{8a}

We have analyzed the culture media of cultures of *P. blakesleeanus* wild-type strains under various conditions and have compared them with those of *carB* mutants unable to produce β -carotene, and thus devoid of apocarotenoids.

Results

Extraction, isolation and identification of apocarotenoids

The three wild type strains used by us differ by sex and genetic background. NRRL1554 and A56 are (+) strains, while NRRL1555 is (–); the NRRL strains were isolated from nature, while A56 is the product of repeated backcrosses that made its genetic background similar to that of NRRL1555.¹³ The culture media of single and mated cultures differed in their ultraviolet

^aDivision of Cell Biology and Biophysics, School of Biological Sciences, University of Missouri-Kansas City, MO 64110, USA

^bDepartment of Organic Chemistry, Institute of Biotechnology, University of Granada, Avda. Fuente Nueva, s/n, 18071 Granada, Spain. E-mail: afbarre@ugr.es

^cDepartment of Genetics, Faculty of Biology, University of Sevilla, Reina Mercedes, s/n, 41071 Sevilla, Spain. E-mail: eco@us.es

†Electronic supplementary information (ESI) available: UV and ¹H NMR spectra of all compounds, ¹³C NMR spectra of compounds **4–8**, **10**, **4a**, **5a**, **9a**, and two-dimensional NMR of **6**, and HPLC chromatograms. See DOI: 10.1039/c2ob07147a

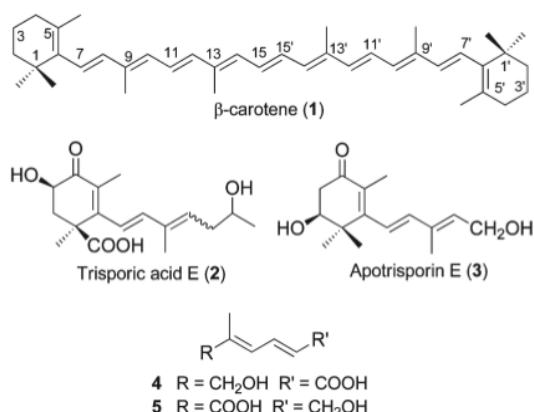


Fig. 1 β -Carotene and the four apocarotenoids reported from cultures of *Phycomyces blakesleeanus*.

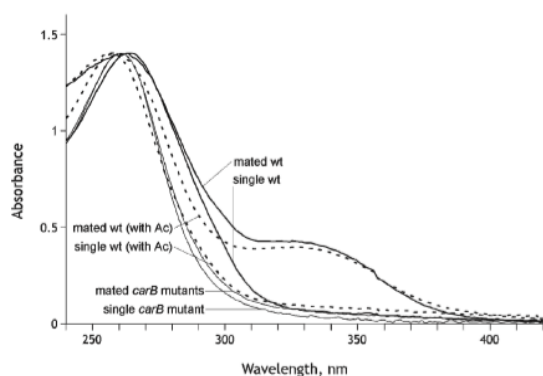


Fig. 2 Absorption spectra of culture media of mated and single cultures of wild type strains (A56 and NRRL1555) and *carB* mutants unable to produce β -carotene (C5 and S342), all grown on minimal agar for five days. Thick lines, wild types; thin lines, mutants; dotted lines, wild types with sodium acetate added (10 mmol L⁻¹).

absorption spectra (Fig. 2). The increased absorption of ultraviolet in mated cultures was due to apocarotenoids, since it did not occur in the *carB* mutants. The relative ultraviolet absorption at 328 and 260 nm provides a simple estimate of the apocarotenoid content. The numerical analysis (Fig. S1 in the ESI†) found no significant differences between minimal and enriched agar cultures and between the two pairs of wild type strains (NRRL1554 \times NRRL1555 and A56 \times NRRL1555).

The culture media were extracted giving a neutral extract and an acid extract. The compounds in these extracts were separated by HPLC and detected by diode-array (Table 1, and Fig. S2–S4 in the ESI†). All the compounds detected in the wild types were assumed to be apocarotenoids, as they were completely absent from cultures of the *carB* mutants, and in fact those that were chemically identified turned out to be apocarotenoids.

Mating increased the diversity of apocarotenoids (from 10 to 25 compounds). Eight apocarotenoids were seen in both single and mated cultures: six of them were abundant ones (the four

1,6-cyclofarnesoids and the two methylhexanoids) and two were minor ones (Tn154 (14) and an unidentified compound). Their concentrations were always larger in mated cultures than in single ones. Two minor compounds were not found in mated cultures; one of them, Tn153 (13), was barely detected in single cultures of strain NRRL1555 only. The four trisporic acids, the methylated trisporic acid Tn144 (10), and 12 unidentified compounds were found only in mated cultures; the most abundant one was Tn116 (2, trisporic acid E).

A small amount of yeast extract (1 g L⁻¹) in the culture media did not affect the chromatograms. A small amount of acetate in the medium (10 mmol L⁻¹) diminished the chemical diversity, leading to the disappearance of four compounds from single cultures and ten from mated cultures, with little or no changes in the concentration of the remaining compounds; an apparent exception was Ta102 (9, trisporic acid C), down by about two thirds.

Thirteen of the apocarotenoids detected in the chromatograms have been identified (2–5 in Fig. 1 and 6–14 in Fig. 3) from five-day old mated cultures of strains A56 and NRRL1555. The structure of eleven of them (2–12) was determined following their isolation whereas that of two of them 13–14 was established by standards. Neutral and acid extracts obtained after acid–base partition of the culture media were fractionated by semi-preparative, normal-phase HPLC; the acid extracts were methylated with TMSCHN₂ before fractionation. The apocarotenoids 2, 4, 5, 9, 11, 12, (as methyl esters), 3, and 10 were determined by comparing their spectroscopic data with those reported in the literature.^{8a,12,14} The standards for compounds 12 and 13 were obtained by chemical synthesis.¹⁵

The apocarotenoids 6–8 were unknown. These compounds are unstable and decomposed partially during NMR registration and chromatographic fractionation. Their structures were established as follows.

A heterocyclic apocarotenoid

The structure of apocarotenoid 6 was elucidated after exhaustive analysis of results from MS and 1D NMR and 2D NMR (COSY, HSQC and HMBC) (Fig. 4 and ESI†). The molecular formula of this compound was established as C₁₅H₂₂O₃ (five degrees of unsaturation) on the basis of its HRFABMS peak at *m/z* 273.1461 [M + Na]⁺ (calcd 273.1461). The ¹³C and DEPT NMR spectra revealed 15 carbon signals: three methyl groups, three methylene groups (two oxygenated), five methine groups (three olefinic and two oxygenated) and four quaternary carbons (three olefinic). Thus three unsaturations correspond to three double bonds and then the molecule contains two rings. The ¹H NMR spectrum indicated the presence of: (a) three methyl singlets, one of them attached to double bond (δ_{H} : 1.00 (H-13), 1.05 (H-12) and 1.60 (H-15)); (b) three olefinic protons at δ_{H} : 5.31 (br s, H-4), 5.50 (s, H-7) and 5.62 (t, *J* = 6.6 Hz, H-10); (c) two oxygenated methylene groups, one at δ_{H} : 4.16 (d, *J* = 6.6 Hz, H-11) and δ_{H} : 4.19 (d, *J* = 12.8 Hz, H-14b) and the second at 4.09 (br d, *J* = 12.8 Hz, H-14a); (d) two oxygenated methine groups (δ_{H} : 4.55 (s, H-8) and 3.46 (t, *J* = 4.5 Hz, H-2)). The COSY spectrum showed correlations between H-10 and H11; H-7 and H-8; H2 and H3, H3 and H-4 (Fig. 4). Taking into

Table 1 Apocarotenoids in single and mated cultures, with and without added acetate^a

Compound	λ_{\max}	Mass in extract %		Absorption in chromatogram AUs			
		Single	Mated	Single	Mated	Single Ac	Mated Ac
Xn85	337	—	—	—	0.05	—	0.08
Xn92	336	—	—	—	0.39	—	0.57
Xn100	308	—	—	—	0.71	—	0.60
Xn109	311	—	—	—	0.16	—	0.25
Cn113	6 248	26.4	17	1.29	8.81	2.75	10.42
Cn115	3 307	—	7.2	0.06	3.15	0.03	3.46
Xn118	299	—	—	—	0.19	—	0.20
Cn122	7 282	10.6	3.6	2914	9570	—	—
Cn123	8 286	5.0	2.0	1797	4892	—	—
Xn129	329	—	—	—	0.06	—	—
Xn130	329	—	—	—	0.15	—	0.20
Xn135	329	—	—	—	0.20	—	0.13
Xn142	329	—	—	—	0.17	—	—
Tn144	10 330	—	3.6	—	0.41	—	—
Xn145	293	—	—	0.01	—	—	—
Xn147	332	—	—	—	0.04	—	—
Xn150	345	—	—	0.04	0.16	—	—
Tn153	13 312	<0.1	—	0.03	—	—	—
Tn154	14 328	—	<0.1	0.03	0.09	—	—
Ma26	4 265	30.0	21.7	1.64	18.3	1.90	18.97
Ma26	5 nd	14.8	11.2	*	*	*	*
Xa81	325	—	—	—	0.11	—	0.15
Xa91	333	—	—	—	0.62	—	0.60
Ta96	12 332	—	1.4	—	0.56	—	0.36
Ta102	9 338	—	8.6	—	2.79	—	0.80
Ta109	11 331	—	2.7	—	1.08	—	0.87
Ta116	2 333	—	14.9	—	4.66	—	2.50

^a Apocarotenoids are named according to their carbon skeleton (T, trisporane; C, cyclofarnesane; M, methylhexane; X, unknown), followed by “n” for neutral compounds and “a” for acid compounds, and the peak chromatographic retention time in tens of seconds. The mass percentage (estimated by ¹H NMR in separate neutral and acid dry extracts) was determined in NRRL1555 single cultures and A56 × NRRL1555 mated cultures. The absorption (the integral of the product of the absorbance units and the retention time in seconds) was the mean for samples of 20 μL obtained from 4 to 34 independent experiments of single cultures (A56, NRRL1554 and NRRL1555) and mated cultures (A56 × NRRL1555 and NRRL1554 × NRRL1555). Cn113 (**6**) was measured at 254 nm, Ma26 (**4**) and Ma27 (**5**) at 280 nm, and the others at 328 nm. The asterisk indicates a result pooled with that of the compound in the preceding line. The result for Tn153 (**13**) refers to single cultures of strain NRRL1555, as it was not found elsewhere.

account in addition the HMBC correlations of C-8 (δ_C : 80.2) with H-7/H-10/H-14, of C-1 (δ_C : 38.7) with H-3/H-12/H-13, and of C-10 (δ_C : 127.5) with H-8/H-11/H-15, compound **6** must contain the frameworks A and B (Fig. 4).

Both frameworks were connected thanks to the HMBC correlations of C-6 (δ_C : 140.0) with H-8/H-12/H-13/H-14, of C-4 (δ_C : 117.0) with H-14, and of C-5 (δ_C : 129.9) with H-4/H-14. Thus, the structure of **6** is 8,14-epoxy-1,6-cyclofarnesane-4,6,9-triene-2,11-diol. The *E* stereochemistry for the double bond on the side chain was deduced from the chemical shifts at C-11 (δ_C : 59.2) and C-15 (δ_C : 12.9) in the ¹³C NMR spectrum.¹⁶ The relative *syn* stereochemistry between the OH and the side chain of **6** was established from the pattern of multiplicity and *J* values of H-8 (s) and H-2 (t, *J* = 4.5 Hz). These values are only possible if H-2 adopted a pseudo-equatorial orientation, and H-8 a pseudo-axial orientation in the minimal energy conformation (Fig. 5). This is the first apocarotenoid of the Mucoromycotina that contains a heterocyclic framework.

Trihydroxy apocarotenoids

Apocarotenoid **7** was assigned the molecular formula C₁₅H₂₄O₃ (four degrees of unsaturation) on the basis of its HRFABMS

peak at *m/z* 275.1626 [M + Na]⁺ (calcd 275.1623). Its ¹H and ¹³C NMR spectra (Table 2) were similar to those of **6** with signals corresponding to the same 1,6-cyclofarnesane framework but without those corresponding to the heterocyclic ring. Thus the NMR analysis of **7** (Table 2) revealed the following differences: the presence of a conjugated triene system (C-4/C-5, C-6/C-7 and C-8/C-9); the existence of a methyl group at the double bond C-4/C-5, instead of the oxygenated allylic methylene, and the presence of three hydroxyls at C-2, C-10 and C-11. The structure of **7** is established as cyclofarnesane-4,6,8-triene-2,10,11-triol. The pseudoaxial disposition of the hydroxyl group at C-2 was inferred from the observed values of *J*_{H2-H3a} = *J*_{H2-H3b} = 4.5 Hz and the *E* stereochemistry of the 6,7 and 8,9 double bonds were deduced from the observed NOE effects between H-7 and H-12/H-14, and H-8 and H-13 (Fig. 6).

The structure of compound **8** have been elucidated through spectroscopic data from a mixture with **7** (see Experimental and Table 2), revealing that the minor component (**8**) was a geometric stereoisomer of **7**. The observed NOE effects (Fig. 6) between H-7 and H-14/H-15, and H-8 and H-12/H-13 determined a *Z* stereochemistry for the C-6/C-7 double bond and an *E* stereochemistry for the C-8/C-9 double bond.

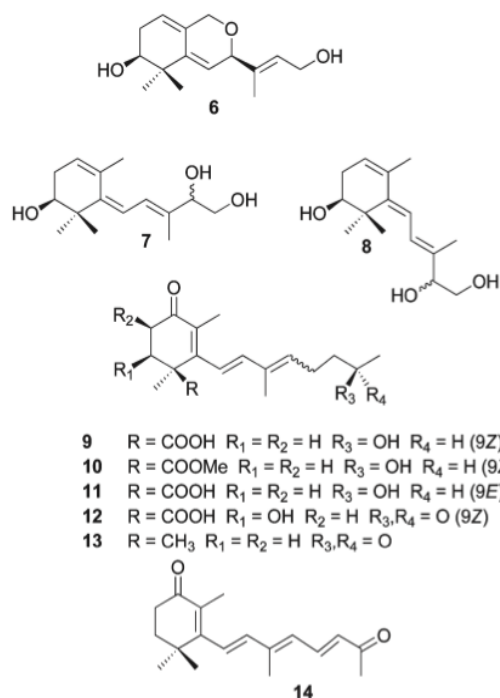


Fig. 3 New apocarotenoids from *P. blakesleeana* identified in this work (6–14).

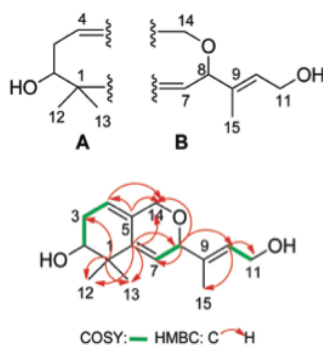


Fig. 4 Key COSY and HMBC correlations for 6.

Discussion

Diversity of the apocarotenoids

The apocarotenoids of *P. blakesleeana* are much more diverse than could be anticipated from the previous identification of just four compounds. Mated cultures contain more than two dozen apocarotenoids, 13 of which, the most abundant as suggested by their absorbance in UV-visible detection in HPLC, have been identified (Table 1). There are seven C18 trisporoids (2, 9–12), four C15 cyclofarnesoids (3, 6–8), and two C7 methylhexanoids 4 and 5. All of them can be viewed as modifications of the three fragments that result when β -carotene is cleaved at its 11',12' and 12,13 double bonds by the *CarS* and *AcaA* gene products.^{8a,9}

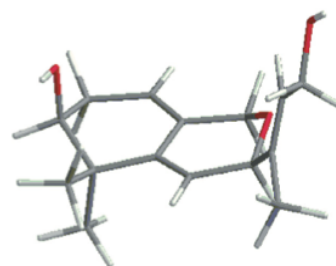


Fig. 5 Conformation of apocarotenoid 6.

The different genetic backgrounds of the strains NRRL1554 and A56, both (+), had little influence on apocarotenoid production. There were some quantitative differences between cultures of different sex. Mated cultures NRRL1554 \times NRRL1555 and A56 \times NRRL1555 had very similar apocarotenoid profiles. Compound Tn153 (13) was found as traces only in single cultures of NRRL1555, our (–) strain.

The genetic test considers apocarotenoids all compounds present in the wild types and missing in the *carB* mutants that are wholly devoid of β -carotene. The possibility that the absence of β -carotene might block the appearance of a compound not derived from it cannot be excluded, but this has not been observed. The test would detect compounds that might be derived from lycopene and other precursors of β -carotene, but not those that might be derived from phytoene, because this is plentiful in the *carB* mutants.

The variety of apocarotenoids is not exclusive to *Phycomyces*. Eight of the 13 apocarotenoids identified in *Phycomyces* have been reported from other Mucorales, but we have not identified ten apocarotenoids known from other Mucorales.⁷ Even strains of the same species, *Blakeslea trispora*, differ widely in their panoply of apocarotenoids.^{8b}

Many new apocarotenoids are likely to be found in the Mucoromycotina when this ancient and diverse taxon receives the attention that it deserves. The systematic chemical names are complex, to give each new compound a trivial name would be impractical, and some of the trivial names already given are misleading. In the face of the same problem, the gibberellins are named by the letters GA followed by an ordinal number. In Table 1 we have used a somewhat more informative designation for the apocarotenoids of the Mucoromycotina, using a letter to indicate their carbon skeleton, another for their prevalence in neutral or acid extracts, and a number for the chromatographic retention time. The alphanumeric order within each group corresponds roughly to their polarity.

It is worth pointing out that apocarotenoids are much more abundant than β -carotene in our five-days-old cultures. Thus, the medium of a mated culture (see Experimental) yielded 711 mg of dry apocarotenoids, neutral and acidic; the mycelium in that medium contained about 5 mg of β -carotene.

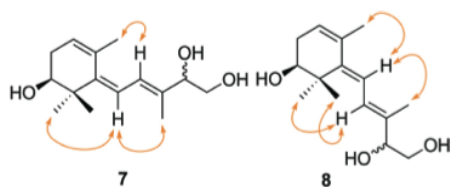
New apocarotenoids and their biosynthesis

Five apocarotenoids have been found so far in *Phycomyces* only; two of them (Cn115 (3) and Ta116 (2)) were known already and

Table 2 ^1H and ^{13}C NMR data of 6–8

C/H	6^a		7^a		7^b		8^b	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1		38.7	42.1			42.6		41.0
2	3.46 t (4.5)	74.3	3.42 t (4.5)	74.8	3.44 t (4.5)	74.0	3.42–3.45 m	75.6
3a	2.19 dd (4.5, 17.9)	31.0	2.09 dd (4.5, 17.8)	31.1	Overlapped by acetone signal	33.9	2.15 br d (17.8)	32.2
3b	2.42 dd (3.9, 17.9)		2.43 dd (4.0, 17.8)		2.43 br d (17.9)		2.34 br d (17.8)	
4	5.31 br s	117.0	5.44 br s	125.7	5.48 br s	126.7	5.55 t (4.5)	124.3
5		129.9		132.1		^c		^c
6		140.0		136.9		133.0		144.7
7	5.50 s	123.2	6.18 d (11.4)	120.9	6.26 d (11.4)	120.7	6.31 d (11.7)	122.0
8	4.55 s	80.2	6.62 d (11.4)	124.1	6.67 d (11.4)	124.2	6.83 d (11.7)	123.7
9		138.1		138.3		138.6		135.0
10	5.62 t (6.6)	127.5	4.16 t (6.3)	80.3	4.08–4.12 m	78.3	4.12–4.17 m	78.3
11a	4.16 d (6.6)	59.2	3.52 br d (10.0)	65.5	3.49 dt (2.0, 5.2)	66.2	3.42–3.45 m	66.3
11b			3.63 dd (4.9, 10.0)		3.55–3.59 m		3.52–3.55 m	
12	1.05 s	22.6	1.04 s	22.7	1.13	21.9	1.35 s	21.8
13	1.00 s	25.2	1.02 s	25.5	1.03	25.3	1.21 s	26.8
14a	4.09 d (12.8)	67.2	2.01 s	25.3	2.03	25.3	1.85 s	21.8
14b	4.19 d (12.8)							
15	1.60 s	12.8	1.76 s	12.9	1.76	12.9	1.76 s	13.0
OH	1.56 br s		1.50 br s		3.85 t (3.4)		3.94 t (3.4)	

^a Spectra carried out in Cl_3CD . ^b Spectra carried out in $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$. ^c C-5 signal not observed. δ in ppm. J in Hz in parentheses.

**Fig. 6** NOE effects of 7 and 8.

the other three are new natural compounds. Compound Cn113 (6) is the first heterocyclic apocarotenoid of the *Mucoromycotina*. This compound and the isomers Cn122 (7) and Cn123 (8) have no oxygen atom bound to the C4 atom, a trait that has not been found previously in the *Mucoromycotina*. The three new compounds are likely to be biosynthesized from a hypothetical intermediate trihydroxy cyclofarnesoid that has not been identified (A in Scheme 1). The existence of this intermediate A is supported by the results of Sutter and Whitaker,¹⁷ which describe the isolation of anhydro derivatives of methyl 4-dihydrotrispurate C, and methyl 4-dihydrotrispurate B from single cultures of *Phycomyces blakesleeianus*. These derivatives are formed by the corresponding 4-dihydro derivatives in slightly acidic solutions. This hypothetical intermediate would be formed from the original C15 fragment of β -carotene, following hydroxylation at C4 and C2 and the reduction of the aldehyde group to alcohol. Compound Cn113 (6) would result from hydroxylation of methyl 14 and after heterocyclization with concomitant hydroxyl elimination at ring level following a $\text{S}_{\text{N}}2'$ mechanism. An enzyme-mediated attack of water at C10 of A would give rise to the triol Cn122 (7) and its isomer Cn123 (8) with hydroxyl elimination at ring level following also a $\text{S}_{\text{N}}2'$ mechanism (Scheme 1).

Environmental dependence of the apocarotenoids

We have reported on the apocarotenoid content under two conditions that modify sexual behavior: mated cultures and presence of acetate in the culture medium (Table 1). We investigated five-day-old cultures because they are close to the onset age for sexual morphogenesis. The apocarotenoids observed at that time probably differ in quality and in amount from those that were synthesized because of differences in the metabolism and the stability of the different compounds.

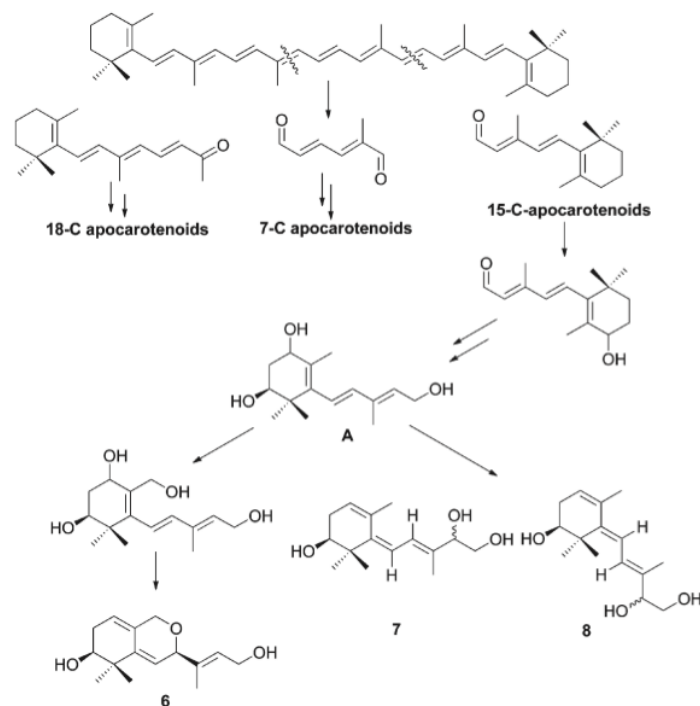
The main qualitative change induced by mating was the formation of trispurate acids. The quantitative changes are due to increased biosynthesis of β -carotene (“sexual carotenogenesis”) and to increased transcription levels of genes for its further metabolism, as shown for the β -carotene-cleaving oxygenases.⁹

The presence of acetate in the medium diminished the chemical diversity, leading to the disappearance of several compounds. The most notable effect was the disappearance of two of the most abundant compounds, the triols Cn122 (7) and Cn123 (8), from both single and mated cultures. This suggests that acetate blocks the attack of water on C10 of precursor A (Scheme 1).

Functions of the apocarotenoids

Three different functions are mediated by apocarotenoids in *Phycomyces*: feed-back inhibition of carotenogenesis, active in single cultures; induction of sexual morphogenesis by sex-specific pheromones; and induction of sexual carotenogenesis in mated cultures.

The feedback inhibitor is an early apocarotenoid, probably one of the products of the first cleavage of β -carotene.⁹ It must be present in the cells of single cultures, and it is unlikely to be secreted to the medium, because the deep yellow color of the *carS* mutant mycelia that lack the inhibition does not decrease in the vicinity of wild-type cultures.



Scheme 1 A proposal on the biosynthesis of the new apocarotenoids (6–8).

The sexual pheromones are sex specific and must be present in the medium of single mycelia.^{2,8a,10a} Sexual carotenogenesis occurs in mated cultures only. Acetate, at the concentration used, blocks sexual carotenogenesis and increases sexual interaction enormously with a copious production of zygospores.¹⁸ Acetate and other small carboxylic acids with the same effects could act on the receptors, but their drastic effects on apocarotenoid composition suggest an action on the signals.

The active signals are not necessarily among the compounds that we have detected because they may be too unstable, or be present and active at concentrations under our detection thresholds, or not present at the time of our analyses. The multiplicity of apocarotenoids makes it possible for each function to be carried out by several compounds with different affinity for the presumed receptors. Finally, different *Mucoromycotina* should not be assumed to use the same signals; the contrary may have been favored by speciation.

Experimental section

Materials

Two strains of *Phycomyces blakesleeanus* Bgff. used in this work were originally isolated in nature: NRRL1555, the standard (–) wild type and NRRL1554, a (+) wild type, both from the Northern Regional Research Laboratory (now National Center for Agricultural Utilization Research, Peoria, IL). Strain A56 is a (+) wild type isogenic to NRRL1555.¹³ Strain C5, genotype

carB10 (–), is a mutant derived from a spore of NRRL1555 exposed to *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine.¹⁹ Strain S342, genotype *carB10 nicA101* (+), was derived from C5 after several crosses.²⁰

Phycomyces was grown in minimal medium with glucose, L-asparagine, thiamine and mineral salts,⁴ enriched with yeast extract (1 g L⁻¹) when indicated. Solid media contained agar (15 g L⁻¹). For the *nic* mutants nicotinic acid was added (1 mg L⁻¹). Spores were harvested from 5-day-old cultures and kept in water at 4 °C for up to about one week. Spores were suspended in water or molten water agar (8 g L⁻¹) at 48 °C for 15 min before plating (10⁴ spores in 2.5 mL water agar per plate with 25 mL agar medium or 10⁴ spores in 2.5 mL water per Erlenmeyer flask with 25 mL of liquid medium) and incubated for 5 days at 22 °C in the dark. Mated cultures were inoculated with a 1 : 1 mixture of spores of two strains of opposite sex.

Instrumental analysis

NMR spectra (¹H and ¹³C) were recorded with a 500 (¹H 500 MHz/¹³C 125 MHz) spectrometers. For high-resolution MS we used an Autospec-Q VG-Analytical mass spectrometer. For semi-preparative normal-phase HPLC, aliquots (0.5 mL) of the neutral and methylated acid extracts dissolved in *t*-BuOMe (20 g dry extract per L) were injected into a column (10 by 250 mm, 5 μm silica particles); with a 15 mm refillable guard pre-column filled with the same material in a Series 1100 liquid

chromatograph (Agilent). The column was eluted at room temperature at a flow rate of 2 mL min⁻¹ for 25 min with *t*-BuOMe and monitored with a refractometer. For the methylated acid extracts the eluent was *n*-hexane-*t*-BuOMe (1:4, v/v). For reverse-phase HPLC aliquots (20 µL) of the neutral and acid extracts dissolved in methanol (1 mL for the extract from each 25 mL culture) were loaded with a G1313A autosampler (Hewlett-Packard) into a C18 column (4.6 by 250 mm; 5 µm octyldecylsilane particles; Spherisorb-ODS2, Waters) with a 12.5 mm refillable guard pre-column filled with the same material (Agilent) in a liquid chromatograph (Series 1100, Hewlett-Packard). The column was eluted at room temperature at a flow rate of 1 mL min⁻¹ with methanol-water (1:4) during the first 6 min and successively with a lineal gradient up to pure methanol at 25 min, with pure methanol until 40 min and with a lineal gradient down to the initial mixture at 45 min. The outflow was monitored with a diode array detector at 328, 280, 254, 230 and 210 nm.

Extraction and fractionation of apocarotenoids

The initial extracts for apocarotenoid isolation and analysis were obtained by freezing (-20 °C for at least 2 h) and thawing (22 °C for 1 h) the agar media and centrifuging the liquid (4000 × *g*, 15 min) or by filtration of the liquid cultures. Neutral extracts were obtained by adjusting the initial extracts to pH 8.0 with 2 N NaOH and extracting thrice with EtOAc. Acid extracts were obtained by adjusting the remaining aqueous phase to pH 2.0 with 2 N HCl and extracting with EtOAc. Water was removed by mixing with anhydrous Na₂SO₄ and filtering; the organic solvent was removed by evaporation under low pressure. For the sake of chemical stability, all procedures were carried out under dim light.

An initial extract (1 L) of mated cultures A56 × NRRL1555 (80 minimal agar plates) yielded 387 mg dry neutral and 324 mg dry acid extract. The neutral extract was fractionated by semi-preparative HPLC. Compound **10** was the major component of the fraction 15.4 < *t*_R < 19.6 min (11.8 mg); compound **3** that of the fraction 21.9 < *t*_R < 23.5 min (8.2 mg); compound **6** that of the fraction 23.5 < *t*_R < 29.0 min (21.6 mg); a 3:1 mixture of **6** and **7** was present in the fraction 29.0 < *t*_R < 31.8 min (3.4 mg); a 1:1 mixture of **7** and **8** was present in the fraction 31.8 < *t*_R < 32.5 min (1.9 mg).

(2S,8R,E)-8,14-Epoxy-1,6-cyclofarnesa-4,6,9-triene-2,11-diol (6). Colourless syrup. [α]_D +22.5 (CHCl₃, c1); UV (MeOH) λ_{max}: see Table 1; δ_H (500 MHz; CDCl₃; Me₄Si): see Table 2; δ_C (125 MHz; CDCl₃; Me₄Si): see Table 2; HRMS [M + Na⁺] calculated for C₁₅H₂₂O₃Na requires 273.1461, found 273.1461.

(2S,7E,9E)-2,11-Dihydroxy-1,6-cyclofarnesa-5,7,9-trien-4-one (previously¹² apotrisporin E) (3). Colourless syrup. It has been identified by spectroscopic data (see ESI[†]). These data were consistent with those previously reported.¹²

The acid extract (324 mg) of the mated cultures was dissolved in C₆H₆-MeOH (4:1 v/v) (10.1 mL) at 0 °C and methylated by adding TMSCHN₂ 2 M in Et₂O (1.1 mL) under stirring. The solution was left for 5 min at room temperature and the solvent was evaporated at low pressure to obtain a mixture of methyl ester

(350 mg) that was fractionated by semi-preparative HPLC. A 2:1 mixture of **4** and **5** (as methyl esters) was present in the fraction 13.4 < *t*_R < 15.9 min (63.3 mg); a 2:1 mixture of **11** and **9** (as methyl esters) was present in the fraction 17.5 < *t*_R < 18.5 min (12 mg); compound **9** (as methyl ester) was in the fraction 18.5 < *t*_R < 20.6 min (25.5 mg); a 3:2 mixture of **9** and **2** (as methyl esters) was present in the fraction 20.6 < *t*_R < 22.2 min (14.2 mg); a 1:9 mixture of **12** and **2** was present in the fraction 22.2 < *t*_R < 25.1 min (52.2 mg).

Hexa-2,4-dienoic acids 4 and 5, and trisporic acids E (2), C (9, Z), C (11, E), D (12) (as methyl esters) have been identified by spectroscopic data (see ESI[†]). These data were consistent with those previously reported.^{8a,14}

The filtered minimal medium (2.4 L) of a NRRL1555 single culture yielded 40 mg dry neutral extract and 60 mg dry acid extract. The neutral extract was fractionated by semi-preparative HPLC. Compound **6** was present in the fraction 21.5 < *t*_R < 24.3 min (8 mg); a 1:1 mixture of **6**:**7** was present in the fraction 24.3 < *t*_R < 25.7 min (4 mg). Compound **7** was present in the fraction 25.7 < *t*_R < 27.2 min (2 mg); a 1:1 mixture of **7** and **8** was present in the fraction 27.2 < *t*_R < 29.1 min (2.5 mg).

(2S,6E,8E)-1,6-Cyclofarnesa-4,6,8-triene-2,10,11-triol (7). Colourless syrup. UV (MeOH) λ_{max}: see Table 1; δ_H (500 MHz, CO (CD₃)₂): see Table 2; δ_C (125 MHz, CO(CD₃)₂): see Table 2; δ_H (500 MHz, CDCl₃): see Table 2; δ_C (125 MHz, CDCl₃): see Table 2; HRMS [M + Na⁺] calculated for C₁₅H₂₄O₃Na 275.1623, found 275.1626.

(2S,6E,8E)-1,6-Cyclofarnesa-4,6,8-triene-2,10,11-triol (7) + (2S,6Z,8E)-cyclofarnesa-4,6,8-triene-2,10,11-triol (8). Colourless syrup. HRMS [M + Na⁺] calculated for C₁₅H₂₄O₃Na requires 275.1623, found 275.1624.

Compound 8. UV (MeOH) λ_{max}: Table 1; δ_H (500 MHz, CO (CD₃)₂): see Table 2; δ_C (125 MHz, CO(CD₃)₂): Table 2; δ_H (500 MHz, CDCl₃): (distinctive signals only) 6.72 (1H, d, *J* = 11.7 Hz, H-8), 6.32 (1H, d, *J* = 11.7 Hz, H-7), 5.51 (1H, br s, H-4), 3.36 (1H, t, *J* = 4.5 Hz, H-2), 1.86 (3H, s, H-14), 1.32 (3H, s, H-13), 1.20 (3H, s, H-12).

The acid extract of the single cultures was methylated with TMSCHN₂ and fractionated by semi-preparative HPLC. A 2:1 mixture of **4** and **5** (as methyl esters) was present in the fraction 13.4 < *t*_R < 15.9 min (5 mg).

A similar culture of strain A56 yielded 62 mg of neutral extract and 132 mg of acid extract. These extracts were processed in the same way as those of strain NRRL1555.

Conclusions

This article presents the first systematic analysis of the apocarotenoids in a species of the Mucoromycotina. In this analysis we have used an effective operational definition of apocarotenoids as compounds that are produced by the wild-type strain and not by the mutants devoid of carotene. The apocarotenoids in mated cultures were much more diverse and abundant than in single cultures. The presence of small amounts of acetate, relative to the total carbon supply in the medium, led to the disappearance of some apocarotenoids with little or no change in the amounts of the others.

Acknowledgements

This research was partially supported by Junta de Andalucía (P08-CVI-03901), and the Spanish Government (Bio2009-12486, BIO2009-11131), which in turn received contributions from the FEDER program of the European Union. We thank Dr Ignacio Rodríguez García and co-workers at Universidad de Almería, Spain for the gift of the apocarotenoids **13** and **14**.

References

- 1 A. F. Blakeslee, *Proc. Am. Acad. Arts Sci.*, 1904, **40**, 205–319.
- 2 H. Burgeff, *Bot. Abh.*, 1924, **4**, 1–135.
- 3 E. Cerdá-Olmedo, *Methods Enzymol.*, 1985, **110**, 220–243.
- 4 R. P. Sutter, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1975, **72**, 127–130.
- 5 L. C. G. Caglioti, B. Camerino, R. Mondelli, A. Prieto, A. Quilico, T. Salvatori and A. Selva, *Tetrahedron*, 1966, **22**, 175–187.
- 6 D. J. Austin, J. D. Bu'Lock and D. Drake, *Experientia*, 1970, **26**, 348–349.
- 7 S. Polaino and A. Idnurm, Sexual Pheromones in the Fungi, in *Biocommunication in Fungi*, ed., W. Guenther, Springer, Berlin, submitted.
- 8 (a) S. Polaino, M. M. Herrador, E. Cerdá-Olmedo and A. F. Barrero, *Org. Biomol. Chem.*, 2010, **8**, 4229–4231; (b) A. F. Barrero, M. M. Herrador, P. Arteaga, J. Gil, J. A. González, E. Alcalde and E. Cerdá-Olmedo, *Org. Biomol. Chem.*, 2011, **9**, 7190–7195.
- 9 (a) H. Medina, E. Cerdá-Olmedo and S. Al-Babili, *Mol. Microbiol.*, 2011, **8**, 199–208; (b) V. G. Tagua, H. R. Medina, R. Martín-Domínguez, A. P. Eslava, L. M. Corrochano, E. Cerdá-Olmedo and A. Idnurm, 2011, unpublished work.
- 10 (a) R. P. Sutter, in *Phycomyces*, ed. E. Cerdá-Olmedo and E. D. Lipson, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, USA, 1987, pp. 317–336; (b) E. Cerdá-Olmedo, *FEMS Microbiol. Rev.*, 2001, **25**, 503–512.
- 11 M. L. Miller and R. P. Sutter, *J. Biol. Chem.*, 1984, **259**, 6420–6422.
- 12 R. P. Sutter, *Exp. Mycol.*, 1986, **10**, 256–258.
- 13 M. I. Álvarez and A. P. Eslava, *Genetics*, 1983, **105**, 873–879.
- 14 (a) J. D. Bu'Lock, D. Drake and D. J. Winstanley, *Phytochemistry*, 1972, **11**, 2011–2018; (b) R. P. Sutter, J. Dadok, A. A. Bothner-by, R. R. Smith and P. K. Mishra, *Biochemistry*, 1989, **28**, 4060–4066; (c) D. Schachtschabel and W. Boland, *J. Org. Chem.*, 2007, **72**, 1366–1372.
- 15 C. López-Sánchez, C. Hernández-Cervantes, A. Rosales, M. Alvarez-Corral, M. Muñoz-Dorado and I. Rodríguez-García, *Tetrahedron*, 2009, **65**, 9542–9549.
- 16 F. W. Wehrli and T. Nishida, *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, Springer-Verlag, Wien, 1979, vol. 36, pp. 1–229.
- 17 R. P. Sutter and J. P. Whitaker, *J. Biol. Chem.*, 1981, **256**, 2334–2341.
- 18 V. Kuzina and E. Cerdá-Olmedo, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006, **72**, 4917–4922.
- 19 G. Meissner and M. Delbrück, *Plant Physiol.*, 1968, **43**, 1279–1283.
- 20 E. Cerdá-Olmedo and P. Reau, *Mutat. Res.*, 1970, **9**, 369–384.

ARTÍCULO 3



	Title20	Year	IMPACT_FACTOR	EIGENFACTOR	CATEGORY_RANKING	QUARTILE_RANK	Categories
1	MOLECULES	2012	2.428	0.02263	24/57	Q2	EE

Copyright 2013 Thomson Reuters®. Source : Journal Citation Reports
Para cualquier uso derivado de los indicadores u otras preguntas del JCR por favor contactar con infowok@fecyt.es

Molecules **2012**, *17*, 12553–12559; doi:10.3390/molecules171112553

OPEN ACCESS

molecules

ISSN 1420-3049

www.mdpi.com/journal/molecules

Communication

A Minor Dihydropyran Apocarotenoid from Mated Cultures of *Blakeslea trispora*

Alejandro F. Barrero ^{1,*}, M. Mar Herrador ¹, Pilar Artega ¹, José-Antonio González ¹ and Jesús F. Arteaga ²

¹ Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Avda. Fuente Nueva, s/n, 18071 Granada, Spain

² Departamento de Ingeniería Química, Química Física y Química Orgánica, Facultad de Ciencias Experimentales, Universidad de Huelva, Campus el Carmen, s/n, 21071 Huelva, Spain

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: afbarre@ugr.es; Tel./Fax: +34-958-243-318.

Received: 8 October 2012; in revised form: 15 October 2012 / Accepted: 22 October 2012 /

Published: 24 October 2012

Abstract: The heterocyclic C15 apocarotenoid **1** was isolated from mated cultures of the strains F986 (+) and F921 (–) of *Blakeslea trispora*. This new compound formed during sexual interaction is a minor constituent of the culture media and its structure was elucidated by spectroscopic data, including 2D-NMR. A plausible biosynthetic pathway involving a double degradation of β -carotene, followed by several oxidations of the resulting monocyclofarnesane C15 fragment is proposed.

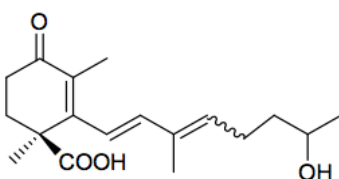
Keywords: *Blakeslea trispora*; apocarotenoid; dihydropyrane; isolation; structural elucidation

1. Introduction

Blakeslea trispora (syn. *Choanephora trispora*, Mucoromycotina, Mucorales, Choanephoraceae) is used for the industrial preparation of β -carotene, a natural pigment antioxidant and pro-vitamin A with many applications in the food, pharmaceutical, and cosmetic industries [1–4]. The wild-type strains of this fungus belong to either the (+) or the (–) sex, and many pairs of opposite sex strains, cultured together (“mated” cultures”) increase their β -carotene content and spark the morphological program of the sexual cycle. These physiological effects were attributed to the action of apocarotenoids such as

trisporic acid C (**1**, Figure 1) and similar compounds present in mated cultures of *Blakeslea* [5–10]. The culture media of *Blakeslea* contains apocarotenoids belonging to the following three families: “trispoids” with 18 carbons [5,11–16], “cyclofarnesoids” with 15 carbons [16–20] and those featuring seven carbons [16]. As a follow-up to our study about production and identification of bioactive apocarotenoids from *Blakeslea trispora*, in this paper we report the isolation and structural elucidation of the minor cyclofarnesane apocarotenoid **2** from mated cultures of *B. trispora*. Additionally a plausible biosynthetic pathway justifying its formation during sexual interaction is presented.

Figure 1. Trisporic C acid (**1**).



2. Results and Discussion

Sexually (+) and sexually (–) *B. trispora* strains F921 and F986 were cultured together for three days on agar medium. Following semi-preparative normal phase HPLC separation, a careful search for the neutral metabolites in the agar extracts has permitted the isolation of a few mg of compound **2** (relative concentration: 4 mg in 1 L of medium). It is important to point out that compound **2** is not present in single cultures meaning that the product was produced during sexual interaction. This compound was isolated as a colourless syrup and high-resolution mass spectrum (FAB⁺) showed a molecular ion [M+Na]⁺ at *m/z* 273.1464, corresponding to a molecular formula C₁₅H₂₂O₃ (five degrees of unsaturation) and its IR spectrum exhibited an absorption band corresponding to a hydroxyl group (3417 cm⁻¹). The ¹³C-NMR and HSQC spectra revealed 15 carbon signals, including three methyl groups, three methylene groups (two oxygenated), five methyne groups (two oxygenated and three sp²) and four quaternary carbons (three sp²). These data establish the presence of three double bonds, two rings (one oxygenated) and two hydroxyl groups in the structure of **2**. Some of the COSY and HMBC correlations depicted in Figure 2 established the presence of frameworks A–C in its structure. Connectivity among these frameworks was deduced from the HMBC correlations (Figure 2, Table 1).

Figure 2. Key COSY and HMBC correlations for apocarotenoid **2**.

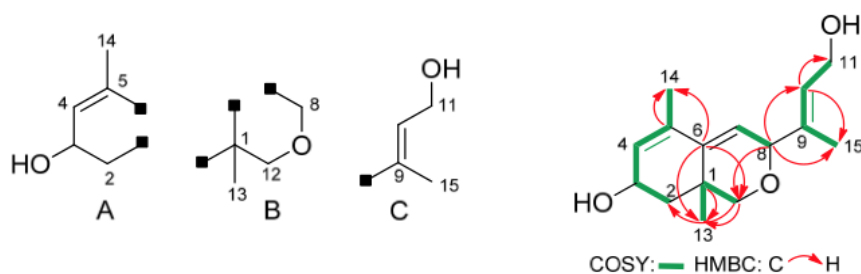
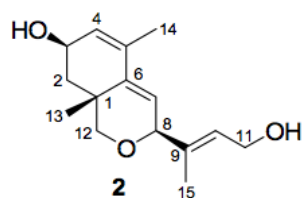


Table 1. Mono- and bi-dimensional NMR data for compound **2**.

C/H	δ_H	δ_C	COSY	HSQC	HMBC
1		32.1			
2a	1.65–1.42 m	38.4	H3, H2b	C2	C12a, C13
2b	1.65–1.42 m		H3, H2a		
	4.34 br s	64.4	H4, H2a, H2b	C3	
4	5.72 d (4.6)	125.8	H3, H14	C4	
5		133.0			
6		140.9			
7	5.65 d (3.3)	120.5	H8	C7	
8	4.64 br s	76.5	H7	C8	
9		138.0			
10	5.54 t (6.4)	127.3	H11, H15	C10	C8, C15
11	4.24 d (6.4)	59.5	H10	C11	C9, C10
12a	3.32 d (10.7)		H12b, H13		
12b	3.36 d (10.7)	70.5	H12a, H13	C12	C8, C6, C13
13	1.35 s	24.6	H12a, H12b	C13	C12, C6, C2a, C1
14	1.86 s	19.4	H4	C14	C6, C5, C4
15	1.77 s	14.9	H10	C15	C8, C9, C10

J in Hz in parentheses.

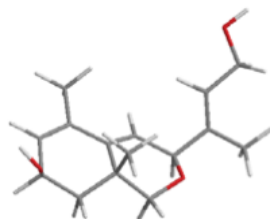
These and all other data allowed us to establish the structure of **2** as 8,12-epoxy-1,6-cyclofarnes-4,6,9-triene-3,11-diol (Figure 3), a new C15 apocarotenoid.

Figure 3. Apocarotenoid **2**.

The side chain double bond compound possesses the *E* stereochemistry as indicated by the ^{13}C -NMR chemical shifts of C11 (δ_C 59.5) and C15 (δ_C 14.9). Also, relative *syn* stereochemistry between the secondary hydroxyl, the methyl group at C13 and the side chain is proposed based on the following considerations: first, one of the two fused rings, cyclohexene and oxacyclohexene, adopt the most favorable semi-chair conformation depicted in Figure 4 due to the presence of the C13 angular methyl. Secondly, the multiplicity of the H8 (br s) and H3 (br s) in the ^1H -NMR spectrum involves pseudoaxial and pseudoequatorial dispositions, respectively.

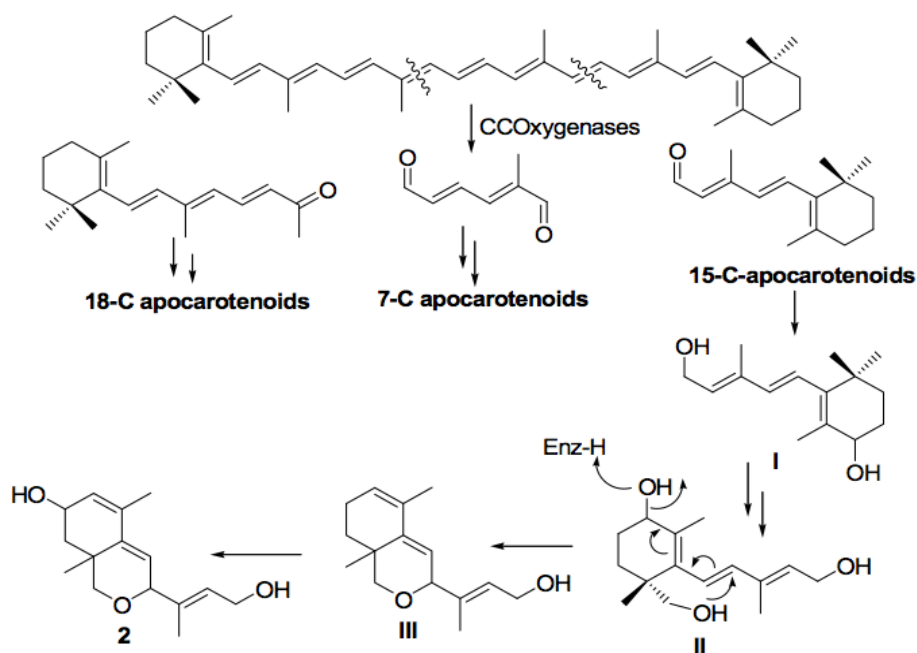
Apocarotenoid **2** is the first compound in *Blakeslea trispora* and the second of all the *Mucoromycotina* fungi that contains a dihydropyran framework. This framework is reminiscent of the azaphylones, fungal metabolites with a polyketide origin [21].

Figure 4. Conformation of apocarotenoid 2.



Considering its origin (*i.e.*, sexual interaction of *B. trispora*) and its structural framework related to that of C15 apocarotenoids the following biosynthetic pathway is proposed for the formation of 2 (Scheme 1).

Scheme 1. Biosynthetic pathway of apocarotenoid 2.



The pathway begins with the double asymmetric β -carotene degradation catalyzed by carotene cleavage oxygenases giving rise to the three fragment precursors of the three families of apocarotenoids (18-C apocarotenoids, 7-C apocarotenoids and 15-C apocarotenoids) [16]. This type of carotene degradation is stimulated by the sexual interaction of opposite sex strains [9,22]. The apocarotenoid 2 comes from the 15 carbons fragment I, which undergoes reduction of the aldehyde group to a primary alcohol and then undergoes two hydroxylation processes (mediated probably by cytochrome-P450 dependent enzymes) at C4 and C13 giving rise to the intermediate II. At this point a heterocyclization process starting from primary hydroxyl at C13 with a shift of a secondary hydroxyl at C4 by means of a S_N2' like reaction leads to III. Then a new hydroxylation at position C3 on III gives rise to metabolite 2. This biosynthetic pathway suggests the existence of specific hydroxylating

enzymes in each *Mucoromicotina* sp. acting at specific positions on each apocarotenoid, and may support the hypothesis of the existence of different sexual signals for each species.

3. Experimental

3.1. General

NMR spectra (^1H - and ^{13}C -) were recorded with a Varian Direct-Drive 500 (^1H 500 MHz/ ^{13}C 125 MHz) spectrometer. For high-resolution MS we used an Autospec-Q VG-Analytical (Fisons) mass spectrometer. For semi-preparative normal-phase HPLC the neutral extracts was dissolved in *t*-BuOMe (at 20 g dry extract/L). Aliquots (0.5 mL) were injected onto a column (10 × 250 mm; 5 μm silica particles; Agilent) with a 15 mm refillable guard pre-column filled with the same material placed in a Series 1100 liquid chromatograph (Agilent). The column was eluted at room temperature at a flow rate of 2 mL/min for 25 min with *t*-BuOMe and monitored with a refractometer.

3.2. Strains and Culture Conditions

Strains F986 and F921 are wild-type (+) and (−) strains of *Blakeslea (Choanephora) trispora*, respectively, and were obtained from VKM (All-Russian Collection of Microorganisms, Moscow, Russia). Plates containing 25 mL minimal agar medium [23] were inoculated with 5×10^3 spores of each sex and incubated in the dark at 30 °C for three days.

3.3. Extraction and Fractionation of Apocarotenoids.

The initial extracts for apocarotenoid analyses were obtained by freezing (−20 °C for at least 2 h) and thawing (22 °C for 1 h) the media and centrifuging the liquid (4,000 × g, 15 min). Neutral extracts were obtained by adjusting the initial extracts to pH 8.0 with KOH and extracting three times with EtOAc. Acid extracts were obtained by adjusting the remaining aqueous phase to pH 2.0 with HCl and extracting with EtOAc. Water was removed by mixing with anhydrous Na_2SO_4 and filtering; the organic solvent was removed by evaporation under low pressure. For the sake of chemical stability, all procedures were carried out under dim light. An initial extract of 500 mL (from 1 L of medium of mated cultures F921 × F986) yielded 114 mg of neutral extract. This neutral extract was fractionated by semi-preparative HPLC. The fraction (16.7 < RT < 17.1 min) contained **2** (4 mg).

(1*R*,3*R*,8*S*,*E*)-8,12-Epoxy-1,6-cyclofarnesa-4,6,9-triene-3,11-diol (**2**): Colourless syrup. $[\alpha]_{\text{D}} +20.1$ ($c = 1$, CHCl_3). HRMS (FAB), m/z : 273.1464 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$; calcd. for $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_3\text{Na}$, 273.1467). IR (film) ν_{max} : 3417, 2964, 2923, 2857, 1654, 1458, 1407, 1110, 1032 cm^{-1} . ^1H -NMR (CDCl_3 , Me_4Si): see Table 1. ^{13}C -NMR (CDCl_3 , Me_4Si): see Table 1.

4. Conclusions

The sexual interaction of strains F986 (+) and F921 (−) of *B. trispora* produces known apocarotenoids, in addition to small amounts of a heterocyclic cyclofarnesane whose novel structure corresponds to (3*S*,7*R*,8*aR*)-3-((*E*)-4-hydroxybut-2-en-2-yl)-5,8a-dimethyl-3,7,8,8a-tetrahydro-1*H*-isochromen-7-ol. Biogenetically this apocarotenoid derives from after successive transformations

(reduction, regiospecific hydroxylations and heterocyclization) of a 15 carbons fragment produced in a double asymmetric β -carotene degradation. The presence of specific apocarotenoids in each *Mucoromycotina* species reinforces the hypothesis of the existence of different sexual signals.

Supplementary Materials

Supplementary materials can be accessed at: <http://www.mdpi.com/1420-3049/17/11/12553/s1>.

Acknowledgments

This research was financed by Junta de Andalucía (Grants FQM 340, CVI 910, and P08-CVI-03901) and the Spanish Government (Grant CTQ 2010-16818, subprogram BQ).

References

1. Ciegler, A. Microbial carotenogenesis. *Adv. Appl. Microbiol.* **1965**, *7*, 1–34.
2. Avalos, J.; Cerdá-Olmedo, E. *Fungal carotenoid production*. In *Handbook of Fungal Biotechnology*; Arora, D.K., Ed.; Marcel Dekker, Inc.: New York, NY, USA, 2004; pp. 367–378.
3. Bhosale, P. Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2004**, *63*, 351–361.
4. Namitha, K.K.; Negi, P.S. Chemistry and biotechnology of carotenoids. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2010**, *50*, 728–760.
5. Caglioti, L.; Cainelli, G.; Camerino, B.; Mondelli, R.; Prieto, A.; Quilico, A.; Salvatori, T.; Selva, A. The structure of trisporic C acid. *Tetrahedron Suppl.* **1966**, *7*, 175–187.
6. Austin, D.J.; Bu'Lock, J.D.; Drake, D. The Biosynthesis of trisporic acids from β -carotene via retinal and trisporol. *Experientia* **1970**, *26*, 348–349.
7. Gooday, G.W. Fungal sex hormones. *Ann. Rev. Biochem.* **1974**, *43*, 35–49.
8. Nieuwenhuis, M.; van den Ende, H. Sex specificity of hormone synthesis in *Mucor. mucedo*. *Arch. Microbiol.* **1975**, *102*, 167–169.
9. Schachtschabel, D.; David, A.; Menzel, K.-D.; Schimek, C.; Wöstemeyer, J.; Boland, W. Cooperative biosynthesis of trisporoids by the (+) and (–) mating types of the Zygomycete *Blakeslea trispora*. *ChemBioChem* **2008**, *9*, 3004–3012.
10. Walter, M.H.; Strack, D. Carotenoids and their cleavage products: Biosynthesis and functions. *Nat. Prod. Rep.* **2011**, *28*, 663–692.
11. Austin, D.J.; Bu'Lock, J.D.; Gooday, G.W. Trisporic acids: Sexual hormones from *Mucor. mucedo* and *Blakeslea trispora*. *Nature* **1969**, *223*, 1178–1179.
12. Cainelli, G.; Grasselli, P.; Selva, A. Structure of trisporic acid B. *Chim. Ind.* **1967**, *49*, 628–629.
13. Sutter, R.P.; Dadok, J.; Bothner-By, A.A.; Smith, R.R.; Mishra, P.K. Cultures of separate mating types of *Blakeslea trispora* make D and E forms of trisporic acids. *Biochemistry* **1989**, *28*, 4060–4066.
14. Bu'Lock, J.D.; Jones, B.E.; Winskill, N. The apocarotenoid system of sex hormones and prohormones in Mucorales. *Pure Appl. Chem.* **1976**, *47*, 191–202.

15. Sutter, R.P.; Whitaker, J.P. Zygothore-stimulating precursors (pheromones) of trisporic acids active in (–)-*Phycomyces. blakesleeanus*. Acid-catalyzed anhydro derivatives of methyl 4-dihydrotrisporate-C and 4-dihydrotrisporate-C. *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 2334–2341.
16. Barrero, A.F.; Herrador, M.M.; Arteaga, P.; Gil, J.; González, J.-A.; Alcalde, E.; Cerdá-Olmedo, E. New apocarotenoids and β -carotene cleavage in *Blakeslea. trispora*. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 7190–7195.
17. Sutter, R.P.; Zawodny, P.D. Apotrisporin: A major metabolite of *Blakeslea. trispora*. *Exp. Mycol.* **1984**, *8*, 89–92.
18. Sutter, R.P. Apotrisporin E: A new sesquiterpenoid isolated from *Phycomyces. blakesleeanus* and *Blakeslea. trispora*. *Exp. Mycol.* **1986**, *10*, 256–258.
19. Cainelli, G.; Camerino, B.; Grasselli, P.; Mondelli, R.; Morrocchi, S.; Prieto, A.; Quilico, A.; Selva, A. Structure del trisporone e dell’anidrotrisporone. *Chim. Ind.* **1967**, *49*, 748–751.
20. Polaino, S.; González-Delgado, J.; Arteaga, P.; Herrador, M.M.; Barrero, A.F.; Cerdá-Olmedo, E. Apocarotenoids in the sexual interaction of *Phycomyces. blakesleeanus*. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 3002–3009.
21. Somoza, A.D.; Lee, K.-H.; Chiang, Y.-M.; Oakley, B.R.; Wang, C.C.C. Reengineering an azaphilone biosynthesis pathway in *Aspergillus. nidulans* to create lipoxigenase inhibitors. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 972–975.
22. Polaino, S.; Herrador, M.M.; Cerdá-Olmedo, E.; Barrero, A.F. Splitting of β -carotene in the sexual interaction of *Phycomyces*. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 4229–4231.
23. Cerdá-Olmedo, E. *Standard growth conditions and variations*. In *Phycomyces*; Cerdá-Olmedo, E., Lipson, E.D., Eds.; Cold Spring Harbor: New York, NY, USA, 1987; pp. 337–339.

Sample Availability: Samples of the compounds are available from the authors.

© 2012 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

ARTÍCULO 4

First total synthesis of (+)-apotriscporin E and (+)-apotrietriols A–B: a cyclization approach to apocarotenoid†

Cite this: *Org. Biomol. Chem.*, 2013, **11**, 5404

Received 13th June 2013,
Accepted 3rd July 2013

DOI: 10.1039/c3ob41226a

www.rsc.org/obc

José A. González-Delgado,^{a,b} Jesús F. Arteaga,^{*b} M. Mar Herrador^a and Alejandro F. Barrero^{*a}

The first total synthesis of the natural apocarotenoids (+)-apotrisporin E (1) and (+)-apotrietriols A and B (2–3) has been accomplished. The structure, relative stereochemistry and the assignment of the absolute configuration have been confirmed. This is a fast and easy access to this family of natural products whose key steps are a diastereoselective cyclization and a HWE olefination to attach the dienic side chain. This work also opens the door to the synthesis of other apocarotenoids such as trisporols and trisporic acids.

Carotenoids are natural pigments that occur in plants and other photosynthetic organisms such as algae, some types of fungi and bacteria.¹ β -Carotene is the most abundant carotenoid in nature and the most important to the human diet, so it gives its name to an entire group of biochemical compounds. It stands out to act as a natural pigment, an antioxidant and provitamin A with many applications in the alimentary, pharmaceutical, and cosmetic industries.² It is obtained industrially by either chemical synthesis or biotechnology, particularly from the fungi *Blakeslea trispora* (syn. *Choanephora trispora*) and *Phycomyces blakesleeanus* (*Mucoromycotina*, Mucorales).³

The apocarotenoids are a group of natural products possessing predominantly the cyclohexene structure, occurring widely in living organisms, and arise biosynthetically through the oxidative cleavage of carotenoids. This key transformation is caused by the action of oxygenase enzymes of carotenoids.⁴ In fungi of the family Mucorales the degradation occurs during sexual interaction in mixed cultures. Thus, the carotene

cleavage enzymes CarS and AcaA, identified in *Phycomyces blakesleeanus*, are responsible for cleaving β -carotene into three fragments of 18, 15 and 7 carbon atoms.⁵ At present it is expected that for *Blakeslea trispora*, there should be similar enzymes that carry out the same function because it has been shown that it also produces apocarotenoids of 18, 15 and 7 carbon atom structures.^{5c}

Among the apocarotenoids which are present in Mucorales species, compounds C18, so-called trisporic acids and derivatives, are assumed to play a key role as signals that trigger the process of sexual reproduction.⁶ In the case of compounds C15, the (+)-apotrisporin E (1, Fig. 1) was identified in mixed cultures of *Blakeslea trispora* and *Phycomyces blakesleeanus*,^{5a,b,7} while apo-4,6,8-trien-1,11,12-triols (2 and 3, Fig. 1) are only found in individual or mixed cultures of *Phycomyces blakesleeanus*.^{5b}

Recently, the first apocarotenoids of the C7 family and others of the C15 family, including 2 and 3, have been discovered. This fact together with the relatively low levels of sexual activity attributed to some trisporic acids⁶ has prompted us to develop the chemical synthesis of compounds 1–3. The main objectives are (a) the confirmation of both their structure and stereochemistry and (b) the testing of their biological activity (induction of sexuality and carotenogenesis). The discovery of new members of this family of compounds that regulate sexual interaction and/or the carotenogenesis induction in this type of fungi will be a major advance in the control of the biotechnological synthesis of β -carotene. It is noteworthy that for

^aDepartment of Organic Chemistry, and Institute of Biotechnology, University of Granada, Avda Fuentenueva, 18071 Granada, Spain. E-mail: afbarre@ugr.es; Fax: +34 958 243318; Tel: +34 958 243318

^bDepartment of Chemical Engineering, Physical Chemistry and Organic Chemistry, and CIQSO – Center for Research in Sustainable Chemistry, University of Huelva, Avda 3 Marzo s/n, 21071 Huelva, Spain. E-mail: jesus.fernandez@diq.uhu.es; Fax: +34 959219983; Tel: +34 959219999

† Electronic supplementary information (ESI) available: Experimental procedures, spectral and analytical data of compounds 1–6, 6b, 7, 9, and 11–20. See DOI: 10.1039/c3ob41226a

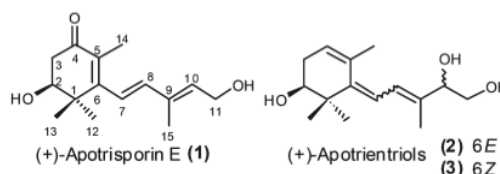


Fig. 1 Structure of (+)-apotrisporin E (1) and apotrietriols A and B (2–3).

Organic & Biomolecular Chemistry

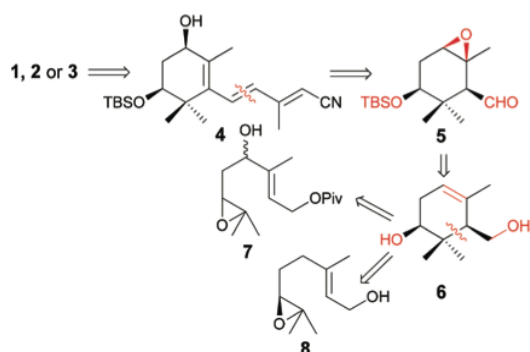
Communication

compound **1**, up to now its structure is only supported by means of its ^1H NMR spectrum.

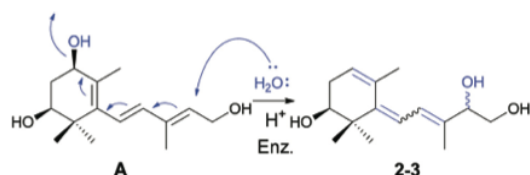
To the best of our knowledge, no synthesis of **1–3** has been described in the literature, although various strategies directed mainly to synthesis of C18 apocarotenoids have been reported, most of which employ an intramolecular aldol condensation to achieve ring closure leading to the cyclohexene skeleton.⁸ The access to this skeleton through a bicyclic intermediate degradation starting from the Wieland–Mieschler ketone has also been described.⁹ Additionally β -ionone has been recently used as the starting material to achieve the preparation of various apocarotenoids and derivatives.¹⁰ As regards C15 apocarotenoids, the synthesis of deoxytrisporin *via* acidic cyclization of geranyl sulfone has been also described.¹¹

The characteristic structure and functionalization of compounds **1–3**, all of them presenting hydroxyl functional groups on the C-2 position and either a carbonyl (compound **1**) or a double bond (compounds **2** and **3**) on the C-4 position, make it possible to design a common retrosynthetic pathway *via* the intermediate derivative **4** (Scheme 1).

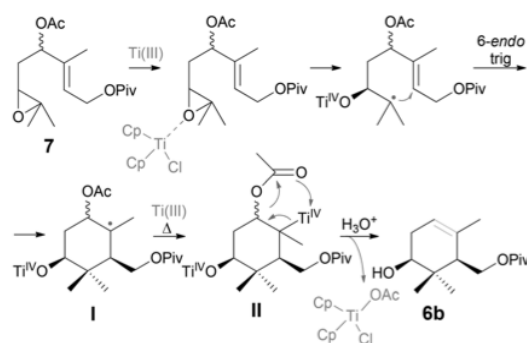
Having in mind the proposed biosynthetic pathway to compounds **2** and **3**, based on a $\text{S}_{\text{N}}2'$ displacement of the C-4 hydroxyl group by nucleophilic attack of H_2O on C-10 *via* an intermediate of type **A** (Scheme 2),^{5a} we believe that a similar reaction catalyzed by Brønsted acids could emulate the enzymatic procedure. In the case of **1** only simple functional group modifications and C-4 oxidation of **4** are needed. A disconnection *via* the Δ^{7-8} double bond of compound **4** leads to the epoxide **5**, which is obtained from the key intermediate **6**.



Scheme 1 Proposed retrosynthetic approach to **1–3**.



Scheme 2 Proposed biosynthetic pathway to compounds **2–3**, based on a $\text{S}_{\text{N}}2'$ displacement.



Scheme 3 Titanocene-mediated synthesis of intermediate **6b**.

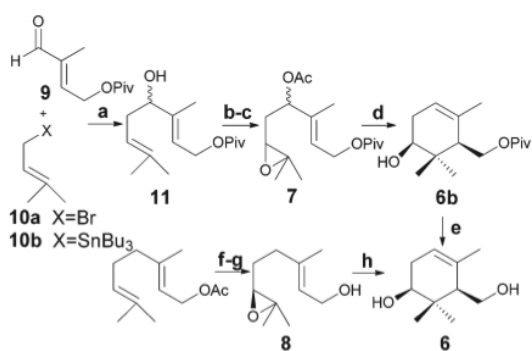
Two different cyclization reactions were designed as suitable strategies to prepare compound **6**. The first option is a radical-based methodology using titanocene chloride which provokes the homolytic opening of epoxide **7** (Scheme 3).¹² It was thought that the presence of an acetoxy group adjacent to the C-5 position where the carbonated radical is located in intermediate (**I**) could allow controlling the regioselectivity of the final $\text{Ti}(\text{IV})$ -elimination step in these processes, thus leading the reaction towards the trisubstituted double bond *via* the alkyl- $\text{Ti}(\text{IV})$ species (**II**). The success of this kind of cyclizations may enable the generalization of this synthetic approach to other apocarotenoids such as trisporols and trisporic acids. This may occur when using an epoxide derivative of **7** possessing an oxygenated function at a methyl adjacent to the oxirane ring.¹³ The second strategy employs a methodology of opening-cyclization of 6,7-epoxygeranyl acetate (**8**)¹⁴ mediated by Brønsted acids.

To achieve the preparation of the acyclic material **7**, we tried a Cp_2TiCl_2 -mediated prenylation of aldehyde **9**, reacting it with prenyl bromide (**10a**).¹⁵ However, this reaction proved ineffective, causing unsatisfactory results (36% yield). Better results were obtained employing prenyl stannane (**10b**)¹⁶ which led to a 24% yield of 4-hydroxygeranyl pivalate (**11**) (Scheme 4).

This compound led *via* a sequence of acetylation (95% yield) and selective epoxidation (59% yield) to oxirane **7** (a mixture of diastereoisomers). The radical cyclization of **7** was then conducted by means of $\text{Cp}_2\text{TiCl}_2/\text{Mn}$ excess in THF at 40°C ,¹³ resulting in efficient removal of the acetate group and the formation of tri-substituted olefin (**6b**, 67% yield) according to the retrosynthetic proposal. This compound was obtained with very high diastereoselectivity ($2S,6R$) or ($2R,6S$) and its relative stereochemistry was established by NOE experiments (Fig. 2). Finally the olefin **6b** was saponified to afford the desired diol (**6**).

That pathway through radical cyclization was then compared with a second possibility employing the treatment of (6*S*)-6,7-epoxygeraniol (**8**) as the starting material with an excess of ZrCl_4 (Scheme 4).¹⁷ Following this route, the diol **6** was prepared in a moderate to good yield of 59%. This

Communication



Scheme 4 Cyclization approaches to compound **6** mediated by Cp_2TlCl or ZrCl_4 . a. **10a**, Cp_2TlCl_2 , Mn, THF, rt, 36% or **10b**, BCl_3 , DCM, -78°C , 24%; b. Ac_2O , DMAP, Py, rt, 95%; c. *m*-CPBA, DCM, 0°C , 59%; d. Cp_2TlCl_2 , Mn, THF, 40°C , 67%; e. NaOH aq. MeOH, rt; f. (i) ADMix-, *t*-BuOH– H_2O ; (ii) MsCl, Py, -10°C ; g. K_2CO_3 , MeOH, rt; h. ZrCl_4 , DCM, rt, 59%.

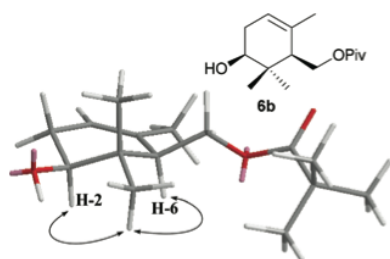


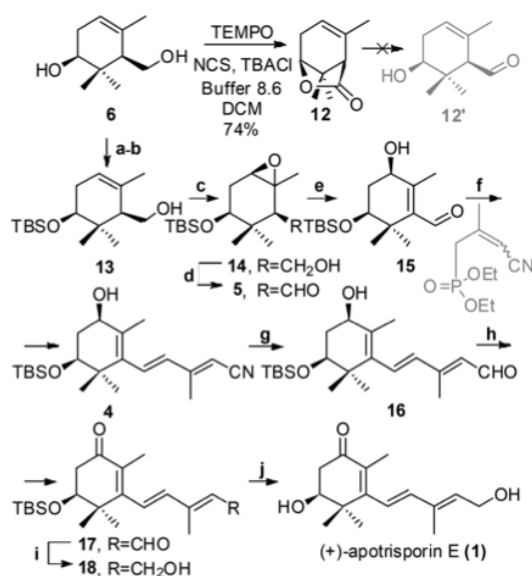
Fig. 2 NOE experiments to establish the stereochemistry of **6b**.

cyclization option was chosen to achieve sufficient amounts of intermediate **6** as it is shorter and presented a better overall yield.

Having enantioenriched diol **6** in our hands, the selective oxidation of the primary alcohol was attempted. Various oxidation methods using PDC, PCC or Dess–Martin periodinane (DMP) were tested but caused either the oxidation of both $-\text{OH}$ groups or very poor yields in selectivity towards the primary one. However, TEMPO oxidation led to the carboxylic acid derivative, which spontaneously lactonized to the bicyclic lactone **12** (74% yield, Scheme 5).¹⁸ Noting that the hydroxy-aldehyde derivative (**12'**) appropriate for extending the synthesis was not easily accessible, we proceeded to obtain aldehyde **5**. Its preparation was accomplished by means of a three-step sequence including the selective benzylation of the primary $-\text{OH}$ group, the subsequent silylation of the secondary one and the ester saponification to obtain derivative **13** (74%, three steps overall yield, Scheme 5).¹⁴ The hydroxyl-guided stereoselective epoxidation of compound **13** led to the oxirane **14** (68% yield), which was then oxidized with DMP to aldehyde **5** (85% yield).

In the following step, regio-controlled opening of the epoxide in basic medium by treatment with pyrrolidine at room temperature was attempted. The hydroxy-aldehyde **15**

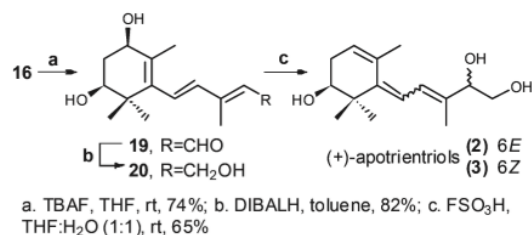
Organic & Biomolecular Chemistry



Scheme 5 Synthesis of (+)-apotrissporin **E** (**1**) from intermediate **6**. a. (i) BzCl, Et_3N , DCM, -40°C ; (ii) TBSOTf, 2,6-lutidine, DCM, rt, 76% 2 steps; b. aq NaOH, MeOH, rt; c. *m*-CPBA, DCM, rt, 68%, 2 steps; d. DMP, DCM, rt, 85%; e. Pyrrolidine, Et_2O , rt, 90%; f. Phosphonate, *n*-BuLi, THF, rt, 58%; g. DIBALH, toluene, -20°C to rt, 71%; h. DMP, DCM, rt, 84%; i. $\text{Zn}(\text{BH}_4)_2$, THF, -40°C , 81%; j. TBAF, THF, rt, 70%.

was obtained in an excellent yield of 90%.¹⁹ The side carbon chain was subsequently attached to **15** via Horner–Wadsworth–Emmons (HWE) olefination²⁰ by treatment with the corresponding phosphonate and *n*-BuLi excess, leading to a 58% yield of the common synthon **4**.²¹ Starting from **4** the synthetic pathway toward (+)-apotrissporin **E** (**1**) involves three functional group exchange reactions. Thus the nitrile group is reduced to aldehyde **16** with DIBALH in toluene, and then the hydroxyl at the C-4 position is chemoselectively oxidized to keto-aldehyde **17** (85% yield) by using DMP. Finally compound **17** was chemoselectively reduced with $\text{Zn}(\text{BH}_4)_2$ in THF at low temperature giving the keto-alcohol **18** (81% yield).²² The subsequent deprotection of the silyl ether with TBAF led to (+)-apotrissporin **E** (**1**), whose ^1H NMR spectrum was identical to that of the natural substance.^{5b} Likewise both the ^{13}C NMR spectrum and other spectroscopic characteristics unequivocally confirmed the proposed structure. On the other hand, the specific rotation found for the synthetic product was $[\alpha]_D^{20} = +7.1$ (*c* 0.80, CH_2Cl_2) whereas natural (+)-apotrissporin **E** isolated from a mixed culture of (+) and (–) of *Phycomyces blakesleeianus* strains had $[\alpha]_D^{20} = +7.8$ (*c* 0.1, CH_2Cl_2). That allowed us to establish the absolute configuration of the natural (+)-apotrissporin **E** as **2S**.

The synthesis of the (+)-apo-4,6,8-trien-2,10,11-triols **2** and **3** was completed from intermediate **16** (Scheme 6). Firstly the $-\text{OTBS}$ group was removed and the resulting aldehyde-diol (**19**) was reduced by means of DIBALH in toluene to yield the



Scheme 6 Synthesis of (+)-apotrietriols (2–3) from the common intermediate 16.

postulated biosynthetic precursor apo-5,7,9-trien-3,5,11-triol (20). The treatment of 20 with catalytic FSO₃H in THF–H₂O (1 : 1)²³ of compounds 2 and 3 in 40% total yield over the last three steps. The synthetic mixture of 2–3 showed a specific rotation of $[\alpha]_D^{20} = +4.3$ (c 0.42, CH₂Cl₂), whereas isolated compound 2 showed a specific rotation of $[\alpha]_D^{20} = +5.1$ (c 0.09, CH₂Cl₂). The spectroscopic properties of the synthetic compounds 2 and 3 were consistent with those described for the corresponding natural products isolated from *Phycomyces blakeleanus*.^{5b} Concordance of these values with those found for natural compounds allowed us, in the same manner as for (+)-apotrissporin E, to establish the absolute configuration of the natural (+)-apotrietriols as 2*S*, 6*E*, 8*E*, 10(*S* + *R*) and 2*S*, 6*Z*, 8*E*, 10(*S* + *R*) respectively.²⁴

Conclusions

We have developed an efficient and simple methodology to obtain for the first time (+)-apotrissporin E (1) and the new natural products (+)-apotrietriols A and B (2–3). The synthesis has allowed us to confirm both their structure and relative stereochemistry unambiguously. Furthermore, the absolute configuration at the C-2 carbon was assigned as *S* for 1–3. The first key synthetic step is a Ti(III)-mediated radical cyclization of a conveniently functionalized monoepoxypolyene or alternatively a ZrCl₄-mediated cationic cyclization of (*S*)-epoxygeraniol in moderate to good yields. Second, the trienic conjugated side chain has been joined *via* HWE olefination. In future studies, these compounds will be evaluated based on their biological activity with emphasis on their role as inducers of sexuality and carotenogenesis.

Acknowledgements

We thank Prof. E. Cerdá-Olmedo and E. Alcalde (Department of Genetics, University of Seville, Spain) for their help in obtaining natural (+)-apotrissporin E. This project was supported by the Spanish Government, Ministry of Economy and Competitiveness (project CTQ-16818-BQ).

Notes and references

- M. H. Walter and D. Strack, *Nat. Prod. Rep.*, 2011, **28**, 663–692.
- (a) A. Ciegler, *Adv. Appl. Microbiol.*, 1965, **7**, 1–34; (b) J. Avalos and E. Cerdá-Olmedo, Fungal carotenoid production, in *Handbook of Fungal Biotechnology*, ed. D. K. Arora, Marcel Dekker Inc, New York, 2004, pp. 367–378; (c) P. Bhosale, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2004, **63**, 351–361; (d) K. K. Namitha and P. S. Negi, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2010, **50**, 728–760.
- E. Cerdá-Olmedo, in *Production of Carotenoids with Fungi in Biotechnology of Vitamin, Growth Factor and Pigment Production*, ed. E. J. Vandamme, Elsevier Applied Science, London, 1989.
- M. H. Walter, D. S. Floss and D. Strack, *Planta*, 2010, **232**, 1–17.
- (a) S. Polaino, M. M. Herrador, E. Cerdá-Olmedo and A. F. Barrero, *Org. Biomol. Chem.*, 2010, **8**, 4229–4231; (b) S. Polaino, J. A. González-Delgado, P. Arteaga, M. M. Herrador, A. F. Barrero and E. Cerdá-Olmedo, *Org. Biomol. Chem.*, 2012, **10**, 3002–3009; (c) V. G. Tagua, H. R. Medina, R. Martín-Domínguez, A. P. Eslava, L. M. Corrochano, E. Cerdá-Olmedo and A. Idnurm, *Fungal Genet. Biol.*, 2012, **49**, 398–404.
- (a) L. Caglioti, G. Cainelli, B. Camerino, R. Mondelli, A. Prieto, A. Quilico, T. Salvatori and A. Selva, *Tetrahedron Suppl.*, 1966, **22**, 175–187; (b) H. J. Van den Ende, *J. Bacteriol.*, 1968, **96**, 1298–1303; (c) D. Schachtschabel, C. Schimek, J. Wostemeyer and W. Boland, *Phytochemistry*, 2005, **66**, 1358–1365; (d) C. Schimek and J. Wostemeyer, *Phytochemistry*, 2009, **70**, 1867–1875.
- (a) R. P. Sutter, *Exp. Mycol.*, 1986, **10**, 256–258; (b) A. F. Barrero, M. M. Herrador, P. Arteaga, J. Gil, J. A. González-Delgado, E. Alcalde and E. Cerdá-Olmedo, *Org. Biomol. Chem.*, 2011, **9**, 7190–7195.
- (a) J. A. Secrist III, C. J. Hickey and R. E. Norris, *J. Org. Chem.*, 1976, **42**, 525–527; (b) H. Takeshita, S. Hatta and T. Hatsui, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1984, **57**, 619–620; (c) S. Takahashi, T. Oritani and K. Yamashita, *Agric. Biol. Chem.*, 1987, **51**, 1143–1147; (d) J. A. Edwards, V. Schwarz, J. Fajkos, M. L. Maddox and J. H. Fried, *Chem. Commun.*, 1971, 292–293; (e) B. M. Trost and P. L. Ornstein, *Tetrahedron Lett.*, 1983, **24**, 2833–2836; (f) H. Takeshita, S. Hatta and T. Hatsui, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1984, **57**, 619–620.
- (a) S. Takahashi, T. Oritani and K. Yamashita, *Agric. Biol. Chem.*, 1987, **51**, 2291–2293; (b) S. Takahashi, T. Oritani and K. Yamashita, *Tetrahedron*, 1988, **44**, 7081–7088.
- (a) D. Schachtschabel and W. Boland, *J. Org. Chem.*, 2007, **72**, 1366–1372; (b) C. López-Sánchez, C. Hernández-Cervantes, A. Rosales, M. Álvarez-Corral, M. Muñoz-Dorado and I. Rodríguez-García, *Tetrahedron*, 2009, **65**, 9542–9549.
- K. Uneyama and S. Torif, *Tetrahedron Lett.*, 1976, **6**, 443–444.
- (a) A. F. Barrero, J. F. Quílez del Moral, E. M. Sánchez and J. F. Arteaga, *Eur. J. Org. Chem.*, 2006, 1627–1641;

Communication

Organic & Biomolecular Chemistry

- (b) A. F. Barrero, J. M. Cuerva, M. M. Herrador and M. V. Valdivia, *J. Org. Chem.*, 2001, **66**, 4074–4078;
- (c) J. Justicia, L. Álvarez de Cienfuegos, A. G. Campaña, D. Miguel, V. Jakoby, A. Gansauer and J. M. Cuerva, *Chem. Soc. Rev.*, 2011, **40**, 3525–3537; (d) J. Justicia, A. Rosales, E. Buñuel, J. L. Oller-López, M. V. Valdivia, A. Haidour, J. E. Oltra, A. F. Barrero, D. J. Cárdenas and J. M. Cuerva, *Chem.–Eur. J.*, 2004, **10**, 1778–1788.
- 13 (a) T. Jiménez, S. P. Morcillo, A. Martín-Lasanta, D. Collado-Sanz, D. J. Cárdenas, A. Gansauer, J. Justicia and J. M. Cuerva, *Chem.–Eur. J.*, 2012, **18**, 12825–12833; (b) J. F. Arteaga, H. R. Diéguez, J. A. González-Delgado, J. F. Quílez del Moral and A. F. Barrero, *Eur. J. Org. Chem.*, 2011, 5002–5011.
- 14 M. Bovolenta, F. Castronovo, A. Vadalá, G. Zanon and G. Vidari, *J. Org. Chem.*, 2004, **69**, 8959–8962.
- 15 R. E. Estévez, J. Justicia, B. Bazdi, N. Fuentes, M. Paradas, D. Choquesillo-Duarte, J. M. García-Ruiz, R. Robles, A. Gansauer, J. M. Cuerva and J. E. Oltra, *Chem.–Eur. J.*, 2009, **15**, 2774–2791.
- 16 (a) K. M. Depew, S. J. Danishefsky, N. Rosen and L. Sepp-Lorenzino, *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, **118**, 12463–12464; (b) E. Schottner, K. Simon, M. Friedel, P. G. Jones and T. Lindel, *Tetrahedron Lett.*, 2008, **49**, 5580–5582.
- 17 G. Vidari, S. Beszant, J. El Merabet, M. Bovolenta and G. Zanon, *Tetrahedron Lett.*, 2002, **43**, 2687–2690.
- 18 J. Einhorn, C. Einhorn, F. Ratajczak and J. L. Pierre, *J. Org. Chem.*, 1996, **61**, 7452–7454.
- 19 (a) G. Aranda, M. Bertranne, R. Azerad and M. Maurs, *Tetrahedron: Asymmetry*, 1995, **6**, 675–678; (b) C. Della Monica, G. Della Sala, D. D'Urso, I. Izzo and A. Spinella, *Tetrahedron Lett.*, 2005, **46**, 4061–4063.
- 20 (a) W. S. Wadsworth, *J. Org. React.*, 1977, **25**, 73–253; (b) J. Boutagy and R. Thomas, *Chem. Rev.*, 1974, **74**, 87–99; (c) S. E. Kelly, *Comprehen. Org. Syn.*, 1991, **1**, 729–817; (d) B. E. Maryanoff and A. B. Reitz, *Chem. Rev.*, 1989, **89**, 863–927.
- 21 A. A. C. Van Wijk, M. B. Van de Weerd and J. Lugtenburg, *Eur. J. Org. Chem.*, 2003, 863–868.
- 22 P. Crabbe, G. A. García and C. Rius, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1973, 810.
- 23 Conformational freedom of the side chain of **20** in the H₂O addition–elimination process justifies the formation of this mixture of isomers. The H₂O attack on the allylic cation under these conditions occurs without stereoselectivity due to the location of C-10 in the structure of the molecule, thus leading to a mixture of four diastereoisomers (see Scheme 2, ref. 5b).
- 24 Unpublished studies indicate that natural (+)-apoptrientriols and their biosynthetic precursors are an unresolvable mixture of epimers at C-10. This fact is relatively common in side chains of this type, in different families of natural products.

VII. DISCUSIÓN DE **RESULTADOS**

1. Química de la Interacción sexual en *Blakeslea trispora*. **Nuevos apocarotenoides.**

a. Aislamiento y purificación de metabolitos:

El estudio de la Química de la interacción sexual en los Mucorales *Blakeslea trispora* y *Phycomyces blakesleeanus* se inicia en esta Memoria con el análisis de los metabolitos producidos en cultivos mixtos del primer organismo. Así esporas de las estirpes F986 (+) y F921 (-) de *Blakeslea trispora* se cultivaron durante 3 días, con agitación, en oscuridad y a 30 °C. Los medios de cultivo se extraen con acetato de etilo en dos pasos, a pH 8 y a pH 2 para separar los metabolitos neutros y ácidos respectivamente. Se evaporan ambas fracciones y se analizan tanto por RMN como por HPLC-UV analítico en fase reversa (Spherisorb 5 µm ODS2, 4.6 x 250mm), eluyendo en gradiente con mezclas de H₂O-MeOH y flujo de 1 mL/min y usando un detector de UV a $\lambda = 328, 300, 280, 260$ y 230 nm. De esta forma se obtienen perfiles de metabolitos con posible estructura de trisporoide. Una vez efectuado el análisis de los extractos, se procedió al aislamiento de los apocarotenoides presentes en en los mismos. Dado que el aislamiento se realiza mediante HPLC semipreparativa en fase normal, usando columnas de sílica, se efectuó previamente la metilación del extracto ácido con trimetilsilildiazometano (TMSCHN₂), para evitar la retención de los metabolitos ácidos en la columna.

Mediante esta técnica se aislaron 12 apocarotenoides (Figura 15): cuatro ciclofarnesoides C15 (**58** y **59** como ésteres metílicos, **57** y **60**), dos trisporoides C18 (**3a** y **3b**, como metil ésteres), cinco metilhexanoides C7 (**61–63** y **64–65**

denominados ácidos blakesleicos A y B como metil ésteres), un apocarotenoide C13 (**6a**) y un compuesto heterocíclico C15 (**60**). Las estructuras de cinco de ellos se determinaron por comparación de sus datos espectroscópicos con bibliografía (**3a**, **3b**, **57**, **64** y **65**).^{32,57,130} El apocarotenoide **6a** es un nuevo producto natural aunque su metil éster (**6**) está descrito como intermedio en la preparación de ácido trispórico B.⁵⁶ Los apocarotenoides **58–65** son nuevos productos naturales, de ellos **60** constituye un nuevo esqueleto heterocíclico de apotrisporoide, y **61–65** constituyen una nueva familia de apocarotenos en Mucorales.

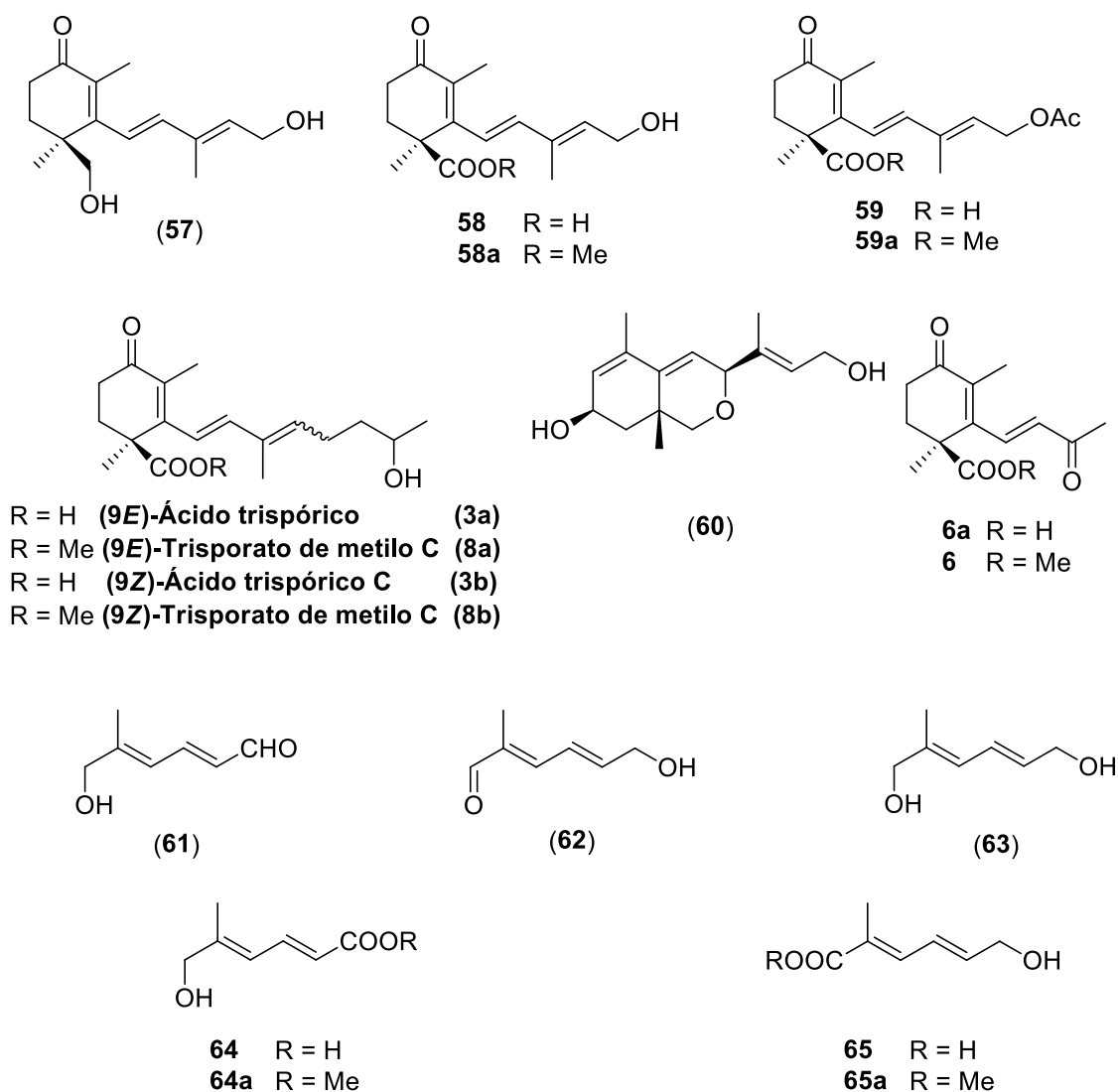


Figura 15. Metabolitos encontrados en cultivos mixtos de *Blakeslea trispora*.

¹³⁰ (a) Cainelli, G.; Camerino, B.; Graselli, P.; Mondelli, R.; Morrocchi, S.; Prieto, A.; Quilico, A.; Selva, A. *Chim. Ind.* **1967**, *49*, 748-751. (b) Polaino, S.; Herrador, M. M.; Cerdá-Olmedo, E.; Barrero, A. F. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 4229-4231.

b. Estructura de los apocarotenoides C7 (metilhexanoides) 61–65:

El apocarotenoide C7 diol (**63**) es el metabolito más abundante en los cultivos. Su fórmula molecular es $C_7H_{12}O_2$ obtenida desde HRFABMS y su espectro de IR muestra bandas de absorción a 3447 cm^{-1} debida a un grupo hidroxilo y a 1600 y 1650 cm^{-1} de dienos conjugados. El espectro de ^{13}C muestra siete señales (Tabla 3): dos señales de carbonos oxigenados a δ 63.6 y 68.3 ppm, una señal de metilo a δ 14.1 ppm, y cuatro señales de dobles enlaces di- y trisustituidos a δ 137.9 (C), 131.8 (CH), 127.1 (CH) y 123.8 (CH) ppm. El esqueleto de 2-metil-2,4-hexadieno se estableció por el acoplamiento directo de los tres protones olefínicos en el espectro de 1H RMN en δ 6.43 (dd, $J_1 = 11.0\text{ Hz}$, $J_2 = 15.1\text{ Hz}$), 6.02 (d, $J = 11.0\text{ Hz}$) y 5.78 (dt, $J_1 = 5.5\text{ Hz}$, $J_2 = 15.1\text{ Hz}$) ppm. La estereoquímica *E* del doble enlace disustituido se dedujo del valor de su constante de acoplamiento de 15.1 Hz y la del trisustituido en base a los desplazamientos químicos de los carbonos C-1 (δ 68.3 ppm) y C-7 (δ 14.1 ppm) en su espectro de ^{13}C RMN. Con todos estos datos se propuso para **63** la estructura de (2*E*,4*E*)-2-metil-2,4-hexadien-1,6-diol. La estructura de **63** fue confirmada por síntesis (Esquema 37).

Los compuestos **61** y **62** comparten la mayoría de las señales en el espectro de 1H RMN con el compuesto anterior (**63**), tal y como se muestra en la tabla 3. En el espectro de 1H RMN del compuesto **61** no se encuentra una de las señales del alcohol primario con respecto al de **63**, sin embargo, existe una señal doblete de grupo formilo a δ 9.62 ppm con una constante de acoplamiento de $J = 8.0\text{ Hz}$. En el espectro de RMN del compuesto **62** tampoco aparece una de las señales debidas a grupo hidroxilmetilo (δ 4.02 ppm, s) con respecto al compuesto **63**, pero vuelve a aparecer otra señal de grupo formilo como singlete a 9.48 ppm. En base a estos datos se propuso para **61** y **62** la estructura de (2*E*,4*E*)-6-hidroxi-5-metil-2,4-hexadienal y (2*E*,4*E*)-6-hidroxi-2-metil-2,4-hexadienal, respectivamente. Las estructuras propuestas para estos compuestos fueron confirmadas por síntesis química.

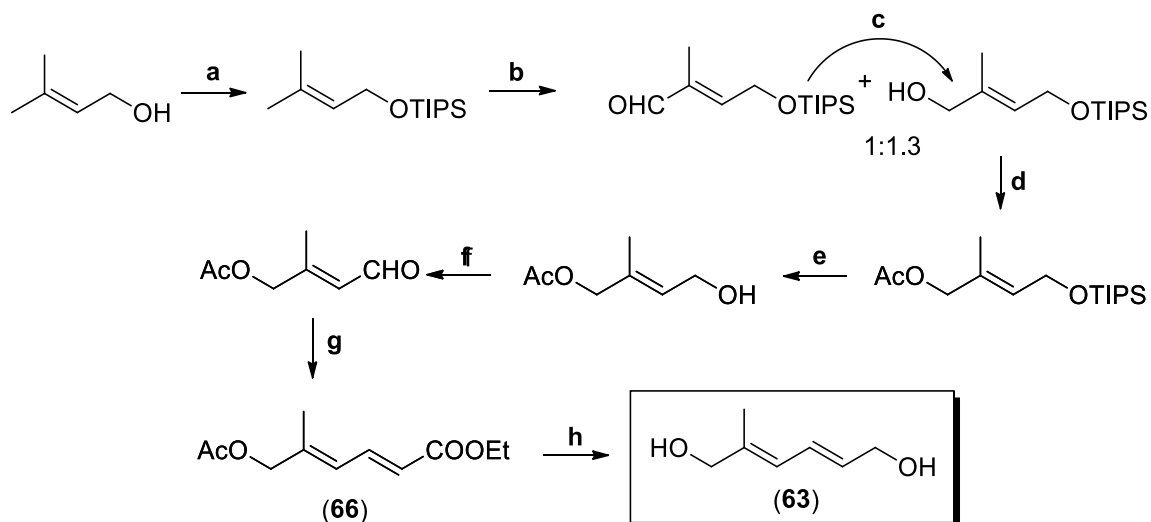
Tabla 3. Datos espectroscópicos de los nuevos compuestos naturales **61–63** (apocarotenoides C7).

C/H	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)
1	9.62 d (8.0)	194.1	9.48 s	4.02 s	68.3
2	6.09 dd (8.0; 15.1)	121.7	–	–	137.9
3	7.65 dd (11.6; 15.1)	148.7	7.03 d (11.2)	6.02 d (11.0)	123.8
4	6.48 d (11.6)	131.7	6.85 dd (11.2; 15.1)	6.43 dd (11.0; 15.1)	131.8
5	–	152.6	6.44 dt (4.6; 15.1)	5.78 dt (5.5; 15.1)	127.1
6	4.18 s a	67.0	4.31 d (4.6)	4.15 d (5.5)	63.6
7	1.92 s	14.6	1.82	1.73	14.1

J en Hz entre paréntesis

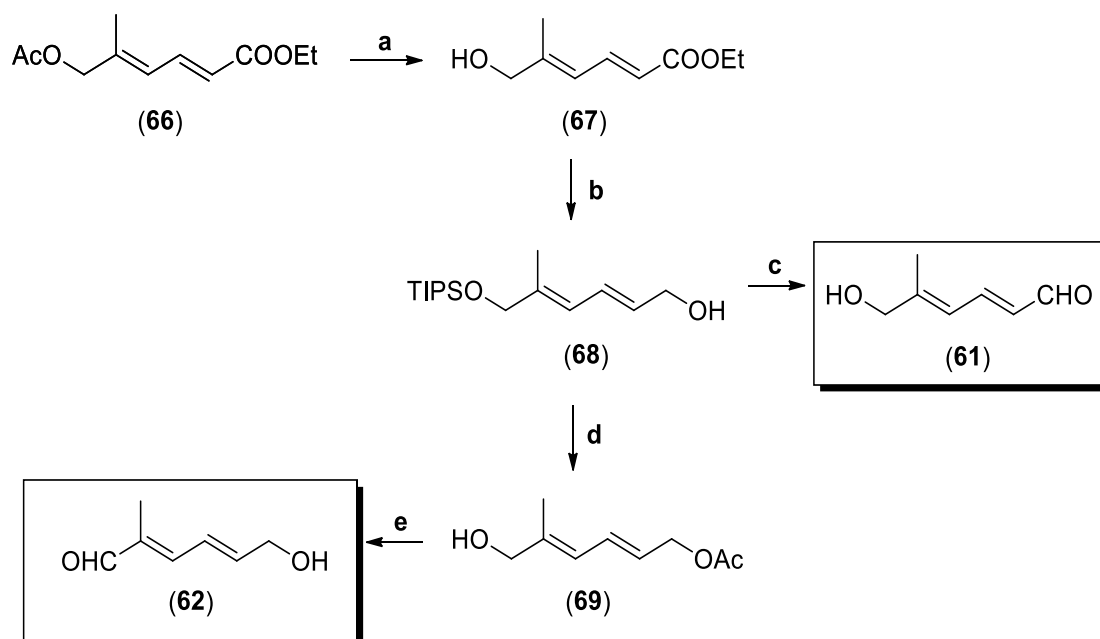
c. Síntesis de los apocarotenoides C7 (61–63) nuevos productos naturales:

Se ha realizado la síntesis del intermedio acetoxiéster **66** a partir de prenol comercial siguiendo protocolos convencionales (Esquema 37).^{130b} La reducción de **66** con exceso de DIBALH conduce al producto natural diol **63** con un rendimiento del 86% (Esquema 37), mientras que la saponificación quimioselectiva del grupo acetato con K₂CO₃ origina el hidroxíéster **67** con un rendimiento del 96%. La protección de **67** con cloruro de triisopropilsililo (TIPSCl) seguida de reducción con DIBALH, produce el hidroxiderivado **68** con un rendimiento del 95%. La posterior oxidación del hidroxilo primario de **68** con el reactivo de Dess–Martin y la desprotección del grupo silil con fluoruro de tetrabutilamonio (TBAF) produjo el hidroxialdehido natural **61** en un moderado rendimiento (66%) (Esquema 38). La acetilación de **68** con Ac₂O/piridina y la desprotección del silil derivado con TBAF dan lugar al compuesto **69** en un 78% de rendimiento. La oxidación de **69** con el reactivo de Dess–Martin y posterior saponificación con una disolución acuosa de NaOH 1M permite la síntesis del otro hidroxialdehido natural **62** con un rendimiento de 60%. Los datos espectroscópicos de los productos sintéticos coinciden con aquellos de los productos naturales aislados. Cabe destacar la fotosensibilidad, volatilidad e inestabilidad al oxígeno del aire de este tipo de compuestos, lo que puede explicar la pérdida de rendimiento de todos los intermedios y de los productos finales, especialmente de los que tienen grupos carbonilos conjugados.



a. TIPSCl, imidazol, DMF, ta, 50 min. b. SeO₂, *t*-BuOOH, CH₂Cl₂, ta, 45 min. c. NaBH₄, EtOH, 1h, ta. d. Ac₂O, Piridina, ta, 30 min. e. TBAF, THF, ta, 90 min. f. DMP, DCM, ta, 30 min. g. (EtO)₂OPCH₂COOEt, NaH, THF, 0 °C, 5 min. h. DIBALH, DCM, -20 °C, 20 min.

Esquema 37. Síntesis del diol **63**.



a. K₂CO₃, MeOH-H₂O-THF, ta, 40 min. b. i. TIPSCl, DMF, ta, 2h. ii. DIBALH, DCM, -20 °C, 20 min. c. i. DMP, DCM, ta, 50 min. ii. TBAF, THF, ta, 65 min. d. i. Ac₂O, Piridina, ta, 2h. ii. TBAF, THF, ta, 15 min. e. i. DMP, DCM, ta, 15 min. ii. NaOH 1M, EtOH, 0 °C, 3h.

Esquema 38. Síntesis de los apocarotenoides **61** y **62**.

d. Estructura de los ciclofarnesoides (apotrisporoides) C15 (57, 58a y 59a) y del apocarotenoide C13 (6a):

La fórmula molecular del metil éster del apocarotenoide **58a** fue establecida como C₁₆H₂₂O₄ según su HRFABMS. Su estructura se elucidó principalmente por comparación de sus datos de RMN (Tabla 4) con los del apotrisporol (**57**), cuya estructura es bien conocida. Esta comparación permite establecer la presencia de un grupo éster metoxicarbonil en C-1, en vez del grupo hidroximetil presente en **57**. Por otra parte los datos espectroscópicos del metil éster **59a** comparados con los de **58a** (Tabla 4) permiten establecer que **59a** era su derivado acetilado.

Tabla 4. Datos espectroscópicos de los compuestos **57**, **58a** y **59a**.

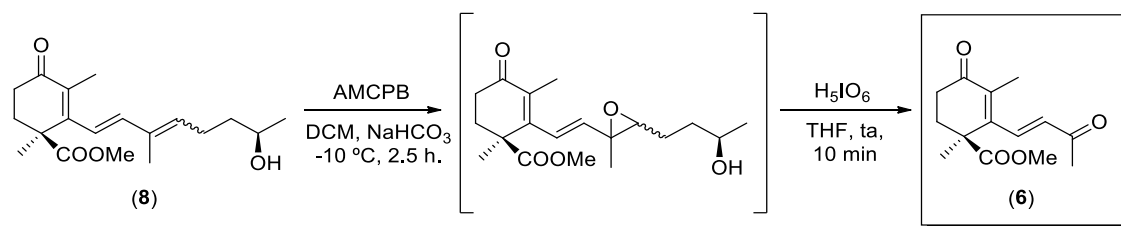
C	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)
1	–	41.2	–	46.9	–	47.0
2a	1.69–1.73 m	33.9	1.92–1.97 m	34.5	1.91–1.96 m	34.5
2b	2.23–2.29 m	–	2.37–2.43 m	–	2.36–2.41 m	–
3a	2.53–2.60 m	31.8	2.50–2.54 m	33.5	2.45–2.53 m	33.6
3b	2.53–2.60 m	–	2.50–2.54 m	–	2.45–2.53 m	–
4	–	199.0	–	197.4	–	197.8
5	–	135.5	–	132.5	–	133.0
6	–	157.4	–	152.3	–	152.2
7	6.22 d (16.3)	124.4	6.34 s	124.6	6.30 d (16.5)	125.2
8	6.26 d (16.3)	140.3	6.34 s	139.8	6.35 d (16.5)	139.1
9	–	135.5	–	135.9	–	137.9

10	5.76 t (6.8)	132.8	5.77 dd (1.1; 6.6)	134.1	5.67 t a (6.9)	128.7
11	4.34 d (6.8)	59.4	4.33 d (6.6)	59.6	4.72 d (6.9)	61.2
12	1.86	13.8	1.83 s	12.5	1.85 s	12.6
13a	3.44 d (11.0)	69.5	–	176.3	–	176.3
13b	3.73 d (11.0)	–	–	–	–	–
14	1.14	21.7	1.54 s	23.0	1.49 s	23.1
15	1.87	12.5	1.94 s	12.3	1.92 s	12.5
OH	1.53 s a	–	–	–	–	–
OMe	–	–	3.69 s	52.5	3.67 s	52.6
Ac	–	–	–	–	–	170.9
Ac	–	–	–	–	2.06 s	21.0

J en Hz entre paréntesis.

58 y **59** son los primeros ciclofarnesoides C15 de Mucorales con función ácido carboxílico sobre C-1. El ácido carboxílico **6a** es el primer apocarotenoide C13 aislado en esta familia de hongos. Su éster metílico **6 se** ha aislado en muy pequeñas cantidades y posiblemente **6a** se haya formado por una ruptura oxidativa de compuestos C15 ó C18, o incluso por una reacción retroaldólica. Este compuesto fue identificado por comparación de los datos espectroscópicos de **6** con los datos publicados del compuesto sintético.⁵⁶ Su estructura fue confirmada por semisíntesis como se describe a continuación (Esquema 39).

La reacción de trisporato de metilo C (**8**) (aislado por nuestro grupo de investigación de cultivos de *Phycomyces blakesleeanus*) con ácido meta-cloroperbenzoico (AMCPB) produce la epoxidación regioselectiva en el doble enlace $\Delta^{9,10}$ (Esquema 39). El tratamiento del epóxido sin purificar con ácido periódico, condujo a la degradación de la cadena lateral a través del epóxido formado rindiendo **6** con un rendimiento global del 90%. Sus datos espectroscópicos coinciden con los del metil éster del producto natural.



Esquema 39. Semisíntesis de **6** a partir de trisporato de metilo C (**8**).

Un análisis semicuantitativo basado en los pesos obtenidos y en la comparación de las señales de ¹H RMN del espectro de la fracción neutra y la fracción ácida, indican que los tres grupos de apocarotenoides (trisporoides con 18 carbonos, ciclofarnesoides con 15 carbonos y metilhexadienos con 7 carbonos) se encuentran aproximadamente en cantidades equimoleculares. Para simplificar, la pequeña cantidad del apocarotenoide C13 se ha omitido.

e. Identificación y caracterización de un nuevo apocarotenoide 60 con estructura dihidropiránica:

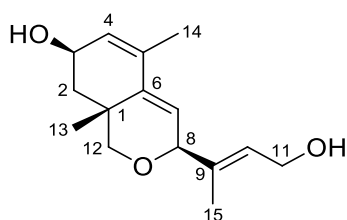


Figura 16. Estructura del nuevo apocarotenoide **60**.

Este compuesto minoritario **60** (Figura 16) sólo se ha identificado en cultivos mixtos (4 mg en un litro de medio de cultivo) de *Blakeslea trispora* y no en individuales, lo que hace pensar que se forma durante el proceso de la interacción sexual. El compuesto **60** fue aislado como un sirupo incoloro mostrando en su espectro de masas de alta resolución un ion molecular $[M + Na]^+$ a m/z 273.1464 (teórico: m/z 273.1467), correspondiente a una fórmula molecular $C_{15}H_{22}O_3$ (con cinco grados de insaturación) y exhibiendo en su espectro de IR bandas de absorción debidas a grupo hidroxilo (3417 cm^{-1}). Los espectros de ^{13}C RMN y HSQC revelan 15 señales de carbonos (Tabla 5), incluyendo tres grupos metilos, tres grupos metilenos (dos oxigenados), cinco grupos metinos (dos oxigenados y tres sp^2) y cuatro carbonos cuaternarios (tres sp^2). Con estos datos, se puede establecer la presencia de tres dobles enlaces, dos anillo (uno oxigenado) y dos grupos hidroxilos en la estructura de **60**. Algunas de las correlaciones COSY y HMBC se representan en la figura 17 estableciendo así la presencia de los fragmentos A–C en su estructura. A partir de las correlaciones de HMBC se dedujeron la conectividad entre los diferentes fragmentos (Figura 17).

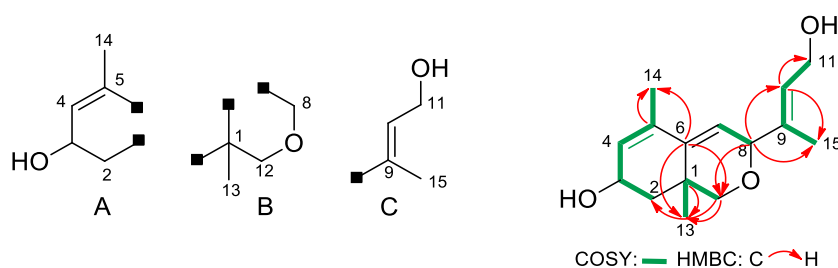


Figura 17. Fragmentos del esqueleto de **60** y sus correlaciones COSY y HMBC.

Tabla 5. Datos espectroscópicos del apocarotenoide **60**.

C/H	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	COSY	HSQC	HMBC
1	–	32.1	–	–	–
2a	1.65–1.42 m	38.4	H–3, H–2b	C–2	C–12a, C–13
2b	1.65–1.42 m		H–3, H–2a		
3	4.34 s a	64.4	H–4, H–2a, H–2b	C–3	–
4	5.72 d (4.6)	125.8	H–3, H–14	C–4	–
5	–	133.0	–	–	–
6	–	140.9	–	–	–
7	5.65 d (3.3)	120.5	H–8	C–7	–
8	4.64 s a	76.5	H–7	C–8	–
9	–	138.0	–	–	–
10	5.54 t (6.4)	127.3	H–11, H–15	C–10	C–8, C–15
11	4.24 d (6.4)	59.5	H–10	C–11	C–9, C–10
12a	3.32 d (10.7)	70.5	H–12b, H–13	C–12	C–8, C–6, C–13
12b	3.36 d (10.7)		H–12a, H–13		
13	1.35 s	24.6	H–12a, H–12b	C–13	C–12, C–6, C–2a, C–1
14	1.86 s	19.4	H–4	C–14	C–6, C–5, C–4
15	1.77 s	14.9	H–10	C–15	C–8, C–9, C–10

J en Hz entre paréntesis

Todos estos datos nos permitieron establecer la estructura de **60** como 8,12-epoxi-1,6-ciclofarnesa-4,6,9-trien-3,11-diol (Figura 16), un nuevo apocarotenoide C15. El doble enlace de la cadena lateral posee estereoquímica *E* tal y como indica los desplazamientos químicos en ^{13}C RMN de los C–11 (δ_C 59.5 ppm) y C–15 (δ_C 14.9 ppm) (Tabla 5). Además, la estereoquímica relativa *syn* entre el hidroxilo secundario, el grupo metilo en C–13 y la cadena lateral se basa en las siguientes consideraciones: primero, uno de los dos anillos fusionados, ciclohexeno

y oxaciclohexeno, adopta la conformación de semisilla más favorable representada en la figura 18 debido a la presencia del metilo angular C-13. En segundo lugar, la multiplicidad de H-8 (s a) y H-3 (s a) en el espectro de ^1H RMN implica disposiciones pseudoaxial y pseudoecuatorial, respectivamente (Figura 18).

El apocarotenoide **58** es el primer compuesto que contiene un esqueleto hidropiránico proveniente de *Blakeslea trispora*. Este esqueleto y funcionalidad recuerda a las azafilonas de los metabolitos de hongos con un origen policétido.¹³¹

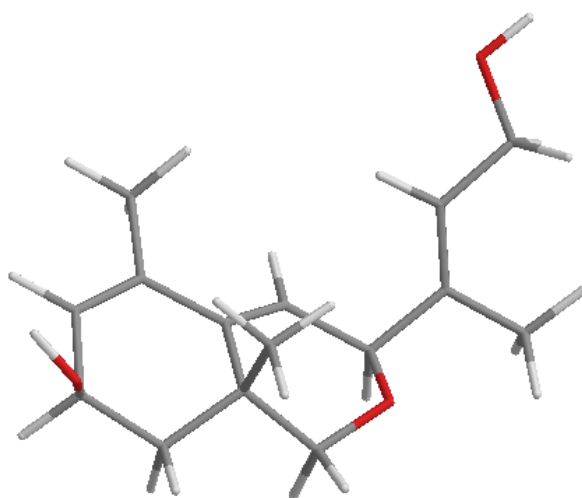
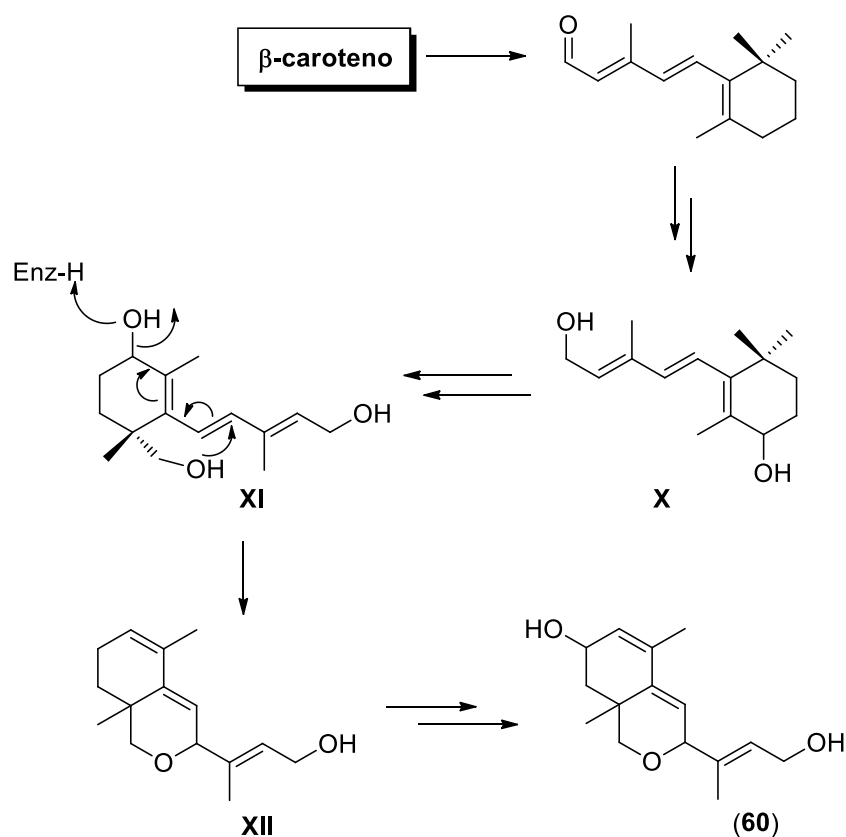


Figura 18. Conformación del apocarotenoide **60**.

Considerando que su origen tiene lugar durante el proceso de interacción sexual y su estrecha relación con otros ciclofarnesoides C15, se propone la siguiente hipótesis biosintética para la formación de **60** (Esquema 40).

¹³¹ Somoza, A. D.; Lee, K. H.; Chiang, Y. M.; Oakley, B. R.; Wang, C. C. C. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 972–975.



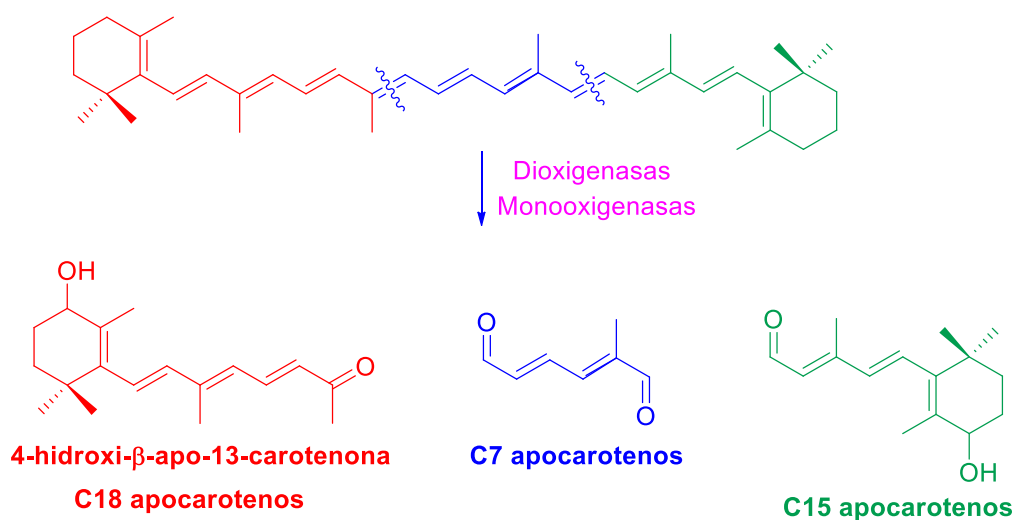
Esquema 40. Ruta biosintética propuesta para la formación de **60**.

La ruta comienza con la degradación de β -caroteno catalizada por oxigenasas de la ruptura de caroteno, dando lugar a tres fragmentos precursores de las tres familias de apocarotenoides (C18, C15 y C7). Este tipo de degradación de caroteno se estimula por la interacción sexual del sexo opuesto. El apocarotenoide **60** procede del intermedio **X** de 15 carbonos, que se origina a través de una reducción del grupo aldehído a alcohol del intermedio obtenido en la doble degradación oxidativa de β -caroteno e hidroxilación en C-4. La hidroxilación del intermedio **X** en C-13, seguido de heterociclación iniciada desde el hidroxilo primario en C-13 con migración del grupo hidroxilo en C-4 a través de una reacción tipo S_N2' origina el intermedio **XII**. Finalmente, una nueva hidroxilación en la posición C-3 sobre **XII** produce el metabolito **60**. Esta ruta biosintética sugiere la existencia de enzimas específicas de hidroxilación en cada *Mucoromicotina* sp. y podría apoyar la hipótesis de la existencia de diferentes señales sexuales para cada especie.

f. Discusión sobre los metabolitos identificados:

Existen cuatro razones para pensar que todos los compuestos descritos anteriormente derivan biosintéticamente del β -caroteno: (i) la similitud estructural entre ellos y los tres fragmentos procedentes de la doble degradación de β -caroteno; (ii) las aproximadas cantidades equimoleculares de trisporoides, ciclofarnesoides y metilhexanoides; (iii) experimentos previos marcados isotópicamente^{80b} y (iv) las comparaciones de cepas silvestres con mutantes no productoras de β -caroteno, estas últimas carentes de apocarotenoides.^{130b}

Estos argumentos indican que las tres familias de apocarotenoides de *Blakeslea* resultan de una doble ruptura oxidativa asimétrica del β -caroteno en los dobles enlaces $\Delta^{13,14}$ y $\Delta^{11,12'}$ (Esquema 41). Este mecanismo ya había sido descrito para *Phycomyces blakesleeanus*^{130b} y podría ser común en todos los Mucorales.



Esquema 41. Nueva propuesta biosintética de la ruptura de β -caroteno.

Nuestros resultados con *Blakeslea* y los trabajos anteriores con *Phycomyces* rebaten la hipótesis^{80b} de que los ácidos trispóricos derivan del β -caroteno vía retinal como se había mantenido durante muchos años. Esta hipótesis ya había sido cuestionada recientemente debido a los infructuosos esfuerzos por identificar

retinal en cultivos de *Phycomyces*. Nuestros resultados también rechazan la hipótesis alternativa de que el β -caroteno se corte dos veces en los dobles enlaces $\Delta^{13,14}$ y $\Delta^{13',14'}$ para producir el primer trisporoide y que los apocarotenoides C15 resulten de una pérdida secundaria de tres átomos de carbonos de la cadena lateral.

Los dos metabolitos hidroxialdehidos C7 (**61** y **62**) fueron poco abundantes dentro de los apocarotenoides C7 y probablemente representen intermedios metabólicos. La ruta de C7 metabólica empezaría con la reducción de uno de los grupos aldehído del dialdehído inicial, aún no detectado, a alcohol primario, y el otro grupo aldehído o no se modifica dando lugar a **61** y **62**, se oxida a grupo carboxilo originando **64** y **65**, o se reduce a grupo hidroxilo para dar el diol **63**.

Los resultados de este trabajo parecen indicar que el metabolismo de apocarotenoides no está bien definido en las diferentes especies de Mucorales, ni incluso en cepas diferentes asignadas a las mismas especies. Así por ejemplo, no hemos encontrado 14 apocarotenoides de los ya descritos en bibliografía para otras cepas de *Blakeslea trispora*, pero se han añadido ocho nuevos a la lista.

2. Apocarotenoides en la interacción sexual de *Phycomyces blakesleeanus*.

a. Extracción y aislamiento de metabolitos:

Para los trabajos con *Phycomyces blakesleeanus* se han usado tres cepas que difieren en su sexo y en su base genética. NRRL1554 y A56 son cepas del sexo (+), mientras que NRRL1555 es del sexo (-); las cepas NRRL se han aislado de la naturaleza mientras que A56 es el producto de múltiples replicados que hicieron su perfil genético similar a NRRL1555.¹³² Los cultivos se han llevado a cabo de forma análoga a los de *Blakeslea trispora* y se ha observado que los medios de cultivos individuales y mixtos difieren en su espectro de absorción en el UV-visible (Figura 20). El aumento de la absorción de ultravioleta se debe a la presencia de los apocarotenoides y su funcionalidad y proporción relativa, aunque no ocurre lo mismo en los mutantes *carB* no productoras de β -caroteno. La absorción ultravioleta relativa a 328 y 260 nm proporciona una simple estimación del contenido de apocarotenoides (Figura 18). El análisis numérico (Anexo 1) no encontró diferencias significativas entre los cultivos en agar mínimo y los cultivos de agar enriquecidos y entre los dos pares de estirpes silvestres (NRRL1554 \times NRRL1555 y A56 \times NRRL1555).

¹³² Álvarez, M. I.; Eslava, A. P. *Genetics* **1983**, *105*, 873-879.

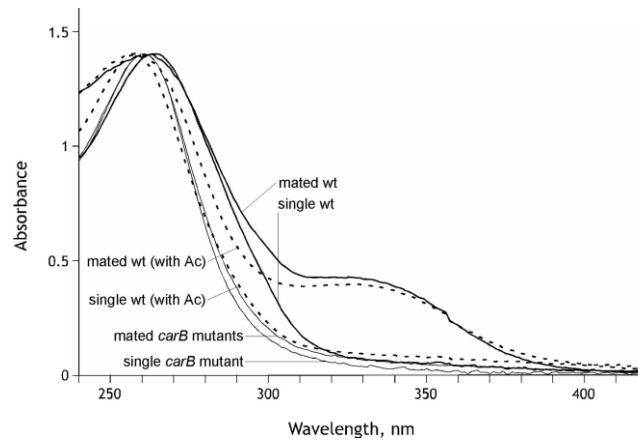


Figura 20. Espectros de absorción de los medios de cultivos individuales y mixtos de las cepas silvestres (A56 y NRRL1555) y mutantes *carB* incapaces de producir β -caroteno (C5 y S342), todos a cinco días.

Los medios de cultivo se extrajeron y fraccionaron separando un extracto neutro y otro ácido. Los compuestos contenidos en estos extractos se separaron y aislaron fundamentalmente mediante HPLC semipreparativo usando como detector, un refractómetro (Tabla 8 y Anexo 1). Se asumió que todos los compuestos detectados en las cepas silvestres eran apocarotenoides, ya que estaban ausentes en los cultivos de las mutantes de *carB*.

b. Identificación de apocarotenoides:

El estudio comparativo de los cromatogramas de HPLC-DAD, permite identificar ocho apocarotenoides comunes a los cultivos individuales y mixtos: seis de ellos fueron abundantes (cuatro ciclofarnesoides **2**, **70a**, **71a**, **71b** y dos metilhexanoides **64** y **65**). Sus concentraciones siempre fueron mayores en cultivos mixtos que en los individuales. Trisporina B (**46**), fue detectada en forma de trazas solamente en cultivos individuales de la estirpe NRRL1555. Los ácidos trispóricos C **3a** y **3b**, el trisporato de metilo C (**8b**), el ácido trispórico E (**1**), el ácido trispórico D (**72a**) apotrisporina E (**2**) y β -apo-13-carotenona (**73**) y doce compuestos no identificados se encuentran solo en los cultivos mixtos. El más abundante fue el ácido trispórico E (**1**).

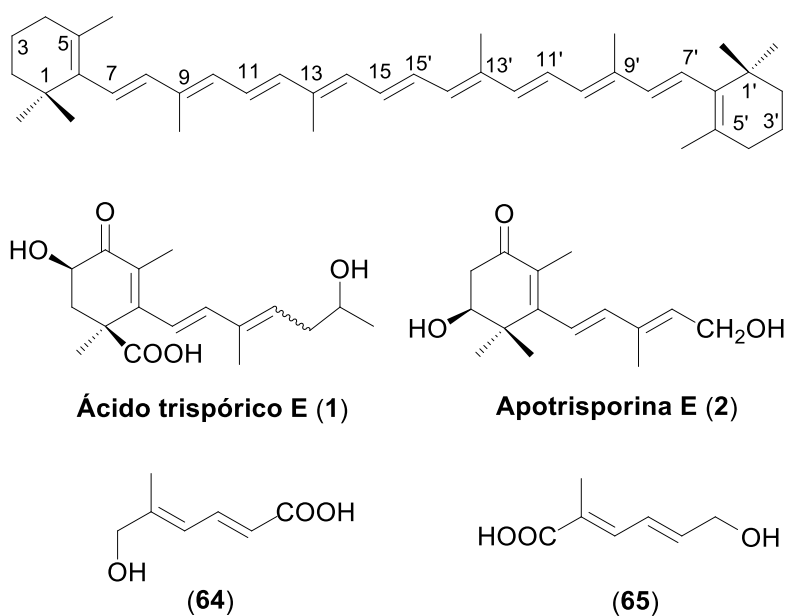


Figura 21. β -caroteno y los cuatro apocarotenoides identificados previamente en cultivos de *Phycomyces blakesleeanus*.

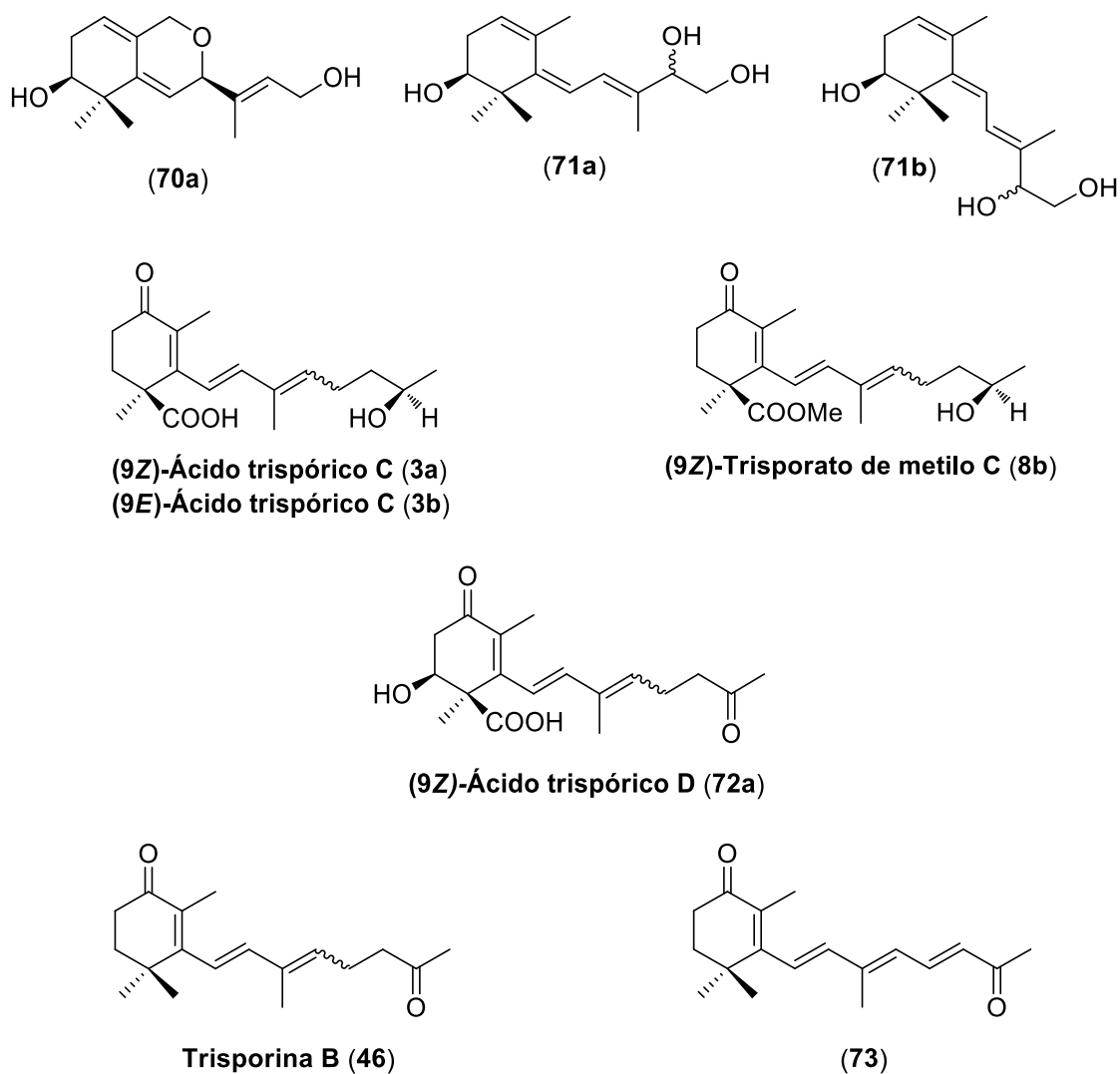


Figura 22. Nuevos metabolitos encontrados en cultivos mixtos de *Phycomyces blakesleeanus*.

En total han sido identificados trece de los apocarotenoides detectados en los cromatogramas pertenecientes a cultivos mixtos a 5 días de las estirpes A56 y NRRL1555 (Figuras 21 y 22). La estructura de once de ellos (**1**, **2**, **3a**, **3b**, **8b**, **64**, **65**, **70a**, **71a**, **71b**, **72a**) se determinó previo aislamiento, mientras que dos fueron identificados por comparación con estándares (**46** y **73**).

Los extractos neutros y ácidos obtenidos después de una partición ácido-base del medio de cultivo fueron fraccionados por HPLC semipreparativo en fase normal; los extractos ácidos se metilaron con TMSCHN₂ antes de su fraccionamiento. Los apocarotenoides **1**, **3a**, **3b**, **64**, **65**, **72a**, (como metil ésteres),

2 y **8b** se determinaron por comparación de sus datos espectroscópicos con los indicados en la literatura,^{32,34,35,57,130b} y aquellos mencionados anteriormente en esta Memoria. Los estándares para los compuestos **72a** y **46** se obtuvieron por síntesis química.⁶⁵

Los apocarotenoides **70a**, **71a** y **71b** eran desconocidos y los apocarotenoides **3a**, **3b**, **8b**, **46**, **64**, **65**, **72a** y **73** se describen por primera vez en *Phycomyces blakesleanus*. La mayoría de estos compuestos son inestables y se descomponen parcialmente durante el registro por RMN y fraccionamiento cromatográfico.

c. Estructura del nuevo apocarotenoide heterocíclico 70a: Trispoxano A.

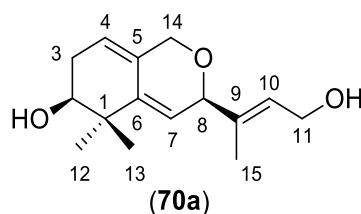
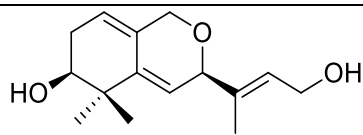


Figura 23. Estructura química del apocarotenoide **70a**.

La estructura del apocarotenoide **70a** se elucidó después de un análisis exhaustivo de los resultados de MS, 1D y 2D RMN (COSY, HSQC y HMBC) (Figura 23 y Anexo 1). La fórmula de este compuesto se estableció como $C_{15}H_{22}O_3$ (con 5 grados de insaturaciones) en base a su pico molecular en HRFABMS a m/z 273.1461 $[M + Na]^+$ (calculado 273.1461). El espectro de RMN de ^{13}C y DEPT revela 15 señales de carbono (Tabla 6): tres grupos metilos, tres metilenos (dos oxigenados), cinco grupos metinos (tres olefínicos y dos oxigenados) y cuatro carbonos cuaternarios (tres olefínicos). Así pues, tres insaturaciones corresponden a tres dobles enlaces, y por lo tanto, la molécula contiene dos anillos. El espectro de 1H RMN indica la presencia de: (a) tres metilos singletes, uno de ellos sobre un doble enlace [δ_H : 1.00 (H-13), 1.05 (H-12) y 1.60 (H-15)] ppm; (b) tres protones olefínicos a δ_H : 5.31 (s a, H-4), 5.50 (s, H-7) y 5.62 (t, $J = 6.6$ Hz, H-10) ppm; (c) dos grupos metilenos oxigenados, uno a δ_H : 4.16 (d, $J = 6.6$ Hz, H-11) y δ_H : 4.19 (d, $J = 12.8$ Hz, H-14b) ppm; y el segundo a 4.09 (d a, $J = 12.8$ Hz, H-14a) ppm; (d) dos grupos metinos oxigenados, δ_H : 4.55 (s, H-8) y 3.46 (t, $J = 4.5$ Hz, H-2) ppm. El espectro COSY muestra correlaciones entre H-10 y H-11; H-7 y H-8; H-2 y H-3, H-3 y H-4. Teniendo en cuenta las correlaciones HMBC de C-8 (δ_C : 80.2 ppm) con H-7/H-10/H-14, de C-1 (δ_C : 38.7 ppm) con H-3/H-12/H-13, y de C-10 (δ_C : 127.5 ppm) con H-8/H-11/H-15, el compuesto **70a** debe contener los esqueletos A y B (Figura 24).

Tabla 6. Datos espectroscópicos del apocarotenoide **70a**.



(70a)

C/H	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)
1	–	38.7
2	3.46 t (4.5)	74.3
3a	2.19 dd (4.5, 17.9)	31.0
3b	2.42 dd (3.9, 17.9)	–
4	5.31 s a	117.0
5	–	129.9
6	–	140.0
7	5.50 s	123.2
8	4.55 s	80.2
9	–	138.1
10	5.62 t (6.6)	127.5
11a	4.16 d (6.6)	59.2
11b	–	–
12	1.05 s	22.6
13	1.00 s	25.2
14a	4.09 d (12.8)	67.2
14b	4.19 d (12.8)	–
15	1.60 s	12.8
OH	1.56 s a	–

J en Hz entre paréntesis

Ambos fragmentos estructurales se conectaron debido a las correlaciones HMBC de C-6 (δ_c : 140.0 ppm) con H-8/H-12/H-13/H-14, de C-4 (δ_c : 117.0 ppm) con H-14, y de C-5 (δ_c : 129.9 ppm) con H-4/H-14 (Figura 24). Por lo tanto, la estructura de **70a** es 8,14-epoxi-1,6-ciclofarnesa-4,6,9-trien-2,11-diol (Figura 23).

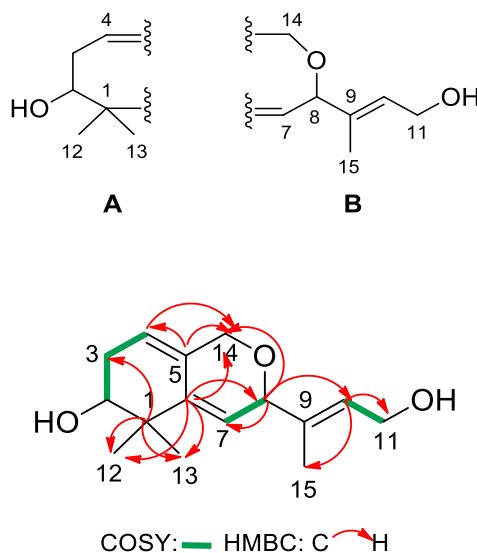


Figura 24. Fragmentos A y B del esqueleto de **70a** y sus correlaciones COSY y HMBC.

La estereoquímica *E* para el doble enlace de la cadena lateral se dedujo de sus desplazamientos químicos en C-11 (δ_c : 59.2 ppm) y C-15 (δ_c : 12.9 ppm) en el espectro de ^{13}C RMN.¹³³ La estereoquímica relativa *syn* entre el -OH y la cadena lateral de **70a** se estableció desde el patrón de multiplicidad y valores de *J* de H-8 (s) y H-2 (t, *J* = 4.5 Hz). Estos valores son solo posibles si H-2 adopta una orientación pseudoecuatorial, y H-8 una orientación pseudoaxial en la conformación de mínima energía (Figura 25). Este es el segundo apocarotenoide de *Mucoromycotina* que contiene un esqueleto heterocíclico y lo hemos denominado trispoxano A (**70a**).

¹³³ Wehrli, F. W.; Nishida, T.; *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, Springer-Verlag, Wien, **1979**, vol. 36, pp. 1-229.

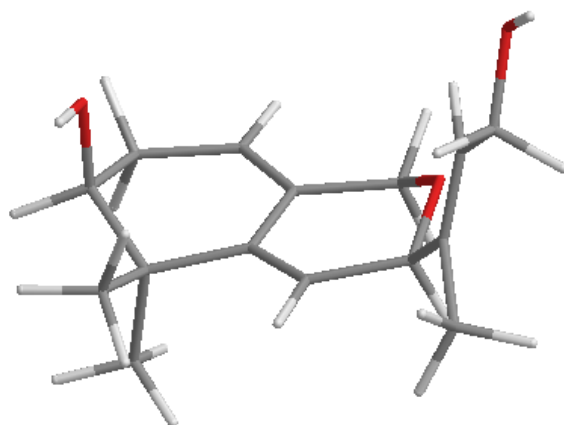


Figura 25. Conformación del apocarotenoide 70a.

d. Estructura de los nuevos apocarotenoides trihidroxi derivados 71a y 71b: Trispotrientrioles A-B.

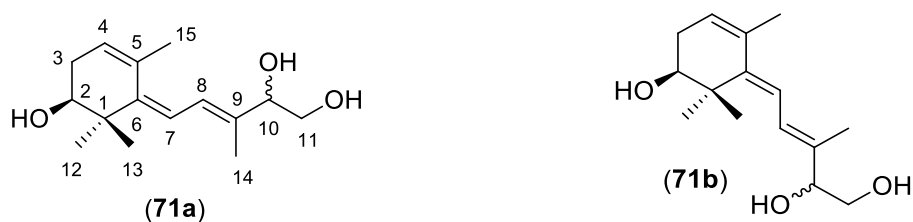


Figura 26. Estructuras químicas de los apocarotenoides **71a** y **71b**.

Al apocarotenoide **71a** se le asignó una fórmula $C_{15}H_{24}O_3$ (con cuatro grados de insaturación) en base a su pico molecular en HRFABMS a m/z 275.1626 $[M + Na]^+$ (calculado 275.1623). Su espectro de 1H y ^{13}C (Anexo 1) fueron similares a los de **70** y presenta señales correspondientes al mismo esqueleto de 1,6-ciclofarnesano pero sin aquellas correspondientes al anillo heterocíclico. Así pues, el análisis de RMN de **71a** revela las siguientes diferencias (Tabla 7): la presencia de un sistema triénico conjugado (C-4/C-5, C-6/C-7 y C-8/C-9); la existencia de un grupo metilo en el doble enlace C-4/C-5, en lugar de un metileno alílico oxigenado, y la presencia de tres grupos hidroxilos en C-2, C-10 y C-11. La estructura de **71a** se estableció como ciclofarnesa-4,6,8-trien-2,10,11-triol. La disposición pseudoaxial del grupo hidroxilo en C-2 se asignó debido a los valores observados de $J_{H2-H3a} = J_{H2-H3b} = 4.5$ Hz y la estereoquímica *E* de los dobles enlaces $\Delta^{6,7}$ y $\Delta^{8,9}$ se asignó de los efectos NOE observados entre H-7 y H-12/H-14, y H-8 y H-15 (Figura 27).

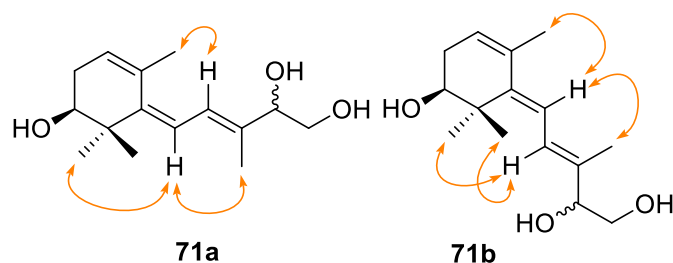


Figura 27. Efectos NOE de **71a** y **71b**.

Tabla 7. Datos espectroscópicos de **71a** y **71b**.

C/H	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)
1	–	42.1	–	42.6	–	41.0
2	3.42 t (4.5)	74.8	3.44 t (4.5)	74.0	3.42–3.4 m	75.6
3a	2.09 dd (4.5, 17.8)	31.1	Coincidente con la señal de acetona	33.9	2.15 d a (17.8)	32.2
3b	2.43 dd (4.0, 17.8)	–	2.43 d a (17.9)	–	2.34 d a (17.8)	–
4	5.44 s a	125.7	5.48 s a	126.7	5.55 t (4.5)	124.3
5	–	132.1	–	Señal no observada	–	Señal no observada
6	–	136.9	–	133.0	–	144.7
7	6.18 d (11.4)	120.9	6.26 d (11.4)	120.7	6.31 d (11.7)	122.0
8	6.62 d (11.4)	124.1	6.67 d (11.4)	124.2	6.83 d (11.7)	123.7
9	–	138.3	–	138.6	–	135.0
10	4.16 t (6.3)	80.3	4.08–4.12 m	78.3	4.12–4.17 m	78.3
11a	3.52 d a (10.0)	65.5	3.49 dt (2.0, 5.2)	66.2	3.42–3.45 m	66.3
11b	3.63 dd (4.9, 10.0)	–	3.55–3.59 m	–	3.52–3.55 m	–
12	1.04 s	22.7	1.13 s	21.9	1.35 s	21.8
13	1.02 s	25.5	1.03 s	25.3	1.21 s	26.8
14a	2.01 s	25.3	2.03 s	25.3	1.85 s	21.8
14b	–	–	–	–	–	–
15	1.76 s	12.9	1.76 s	12.9	1.76 s	13.0
OH	1.50 s a	–	3.85 t (3.4)	–	3.94 t (3.4)	–

^a Espectros realizados en CDCl₃. ^b Espectros realizados en CO(CD₃)₂. *J* en Hz entre paréntesis

La estructura del compuesto **71b** ha sido elucidado a través de datos espectroscópicos de una mezcla con **71a**, revelando que el componente minoritario **71b** es un estereoisómero geométrico de **71a**. Los efectos NOE observados entre H-7 y H-14/H-15, y H-8 y H-12/H-13 determinan una estereoquímica *Z* para el doble enlace C-6/C-7 y una estereoquímica *E* para el C-8/C-9 (Figura 27). Estos nuevos productos naturales se han denominado trispotrientrioles A y B (**71a** y **71b**).

e. Discusión sobre los metabolitos identificados en *Phycomyces blakesleeanus*.

i. Diversidad de los apocarotenoides:

Los apocarotenoides de *Phycomyces blakesleeanus* son mucho más diversos de lo que se podía anticipar a partir de identificaciones previas de solo cuatro compuestos. Los cultivos mixtos contienen más de dos docenas de apocarotenoides, 13 de los cuales, los más abundantes como se sugiere por sus absorbancias en la detección UV-Visible en HPLC, han sido identificados (Tabla 8). Hay cinco apocarotenoides C18 (**1**, **3a**, **3b**, **8b** y **72a**), cuatro ciclofarnesoides C15 (**2**, **70**, **71a** y **71b**), y dos metilhexanoides C7 (**64** y **65**). Se puede pensar que todos ellos son modificaciones de los tres fragmentos que resultan cuando se corta el β -caroteno a través de los dobles enlaces $\Delta^{11',12'}$ y $\Delta^{12,13}$ por las oxigenasas de caroteno productos de los genes *CarS* y *AcaA*.^{130b,134}

¹³⁴ (a) Medina, H.; Cerdá-Olmedo, E.; Al-Babili, S. *Mol. Microbiol.* **2011**, *8*, 199-208. (b) Tagua, V. G.; Medina, H. R.; Martín-Domínguez, R.; Eslava, A. P.; Corrochano, L. M.; Cerdá-Olmedo, E.; Idnurm, A. *Fungal Genet. Biol.* **2012**, *49*, 398-404.

Tabla 8. Identificación y cuantificación de apocarotenoides en cultivos individuales y mixtos de *Phycomyces blakesleeanus*.

Compuesto	λ_{\max} (nm)	Masa en los extractos (%)		Absorción en los cromatogramas (AUs)	
		Individuales	Mixtos	Individuales	Mixtos
1	333	—	14.9	—	4.66
2	307	—	7.2	0.06	3.15
3a	338	—	8.6	—	2.79
3b	331	—	2.7	—	1.08
8b	330	—	3.6	—	0.41
46	312	< 0.1	—	0.03	—
64	265	30.0	21.7	1.64	18.3
65	nd	14.8	11.2	*	*
70	248	26.4	17	1.29	8.81
71a	282	10.6	3.6	2914	9570
71b	286	5.0	2.0	1797	4892
72a	332	—	1.4	—	0.56
73	328	—	< 0.1	0.03	0.09

nd: no detectado

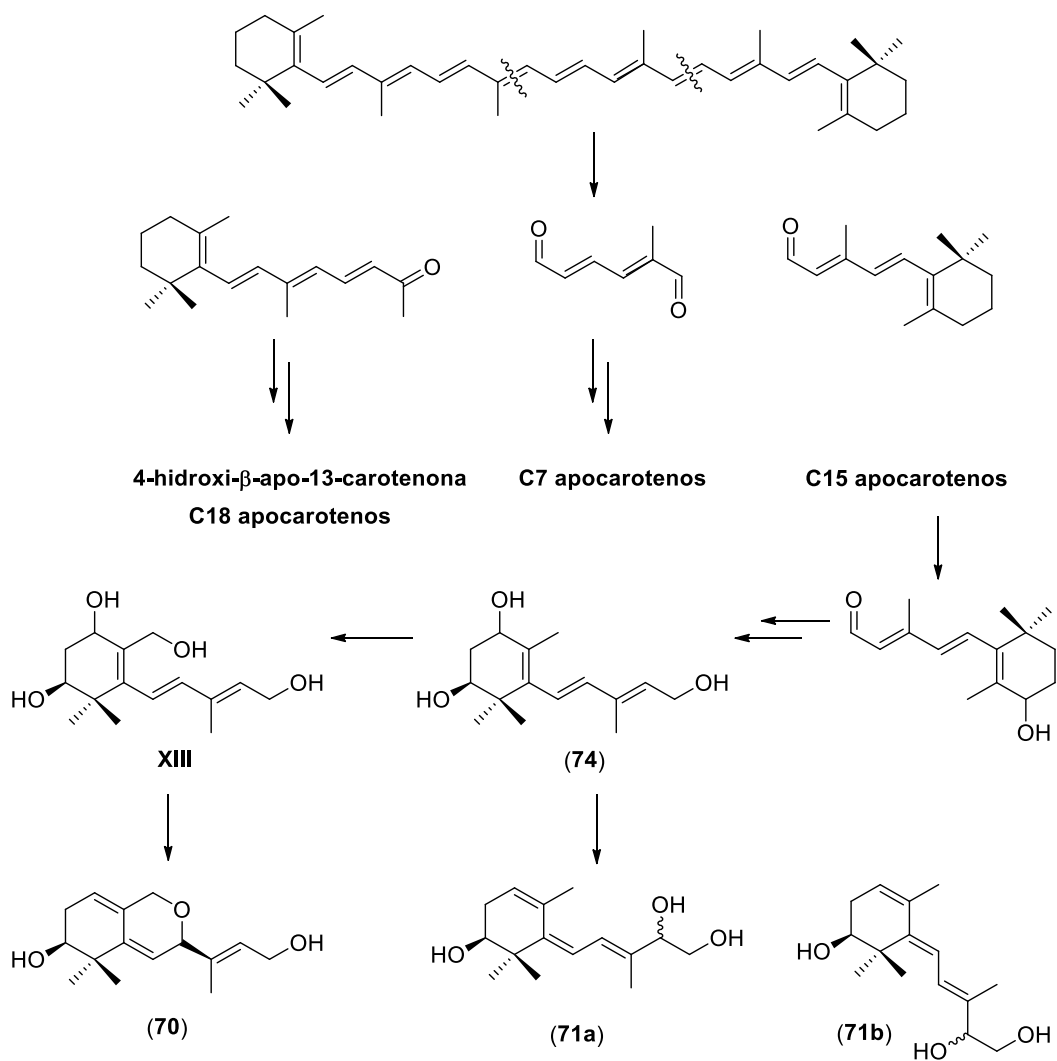
Los diferentes perfiles genéticos de las cepas NRRL1554 y A56, ambos (+), tuvieron poca influencia en la producción de apocarotenoides. Hubo algunas diferencias cuantitativas entre cultivos de diferentes sexos. Cultivos mixtos de NRRL1554 × NRRL1555 y A56 × NRRL1555 tuvieron perfiles de apocarotenoides muy similares. El compuesto trisporina B **46** se encontró en cantidades de trazas solo en cultivos individuales de NRRL1555, del sexo (-).

El test genético puesto a punto por nuestro equipo^{130b} considera que todos los compuestos en los tipos silvestres son apocarotenoides ya que están ausentes en los mutantes *carB* que carecen totalmente de β -caroteno. El test detectaría compuestos que puedan derivarse de licopeno y otros precursores de β -caroteno, pero no aquellos que se puedan derivar del fitoeno, porque éste es mucho más abundante en los mutantes *carB*.

La variedad de apocarotenoides encontrados no es exclusivo de *Phycomyces blakesleeanus*. Ocho de los trece apocarotenoides identificados en este hongo han sido publicados en otros Mucorales, pero nosotros no hemos identificado otros diez apocarotenoides conocidos en otros Mucorales. Incluso cepas de la misma especie *Blakeslea trispora*, difieren ampliamente en sus contenidos de apocarotenoides, tal y como se mostraba anteriormente para este organismo.

ii. Nuevos apocarotenoides y su biosíntesis en *Phycomyces blakesleeanus*:

Se han identificado trece apocarotenoides en *Phycomyces blakesleeanus*; de ellos tres son nuevos productos naturales (**70a**, **71a** y **71b**). El compuesto trispoxano A **70a** es el primer apocarotenoide heterocíclico de *P. blakesleeanus*. Este compuesto y los trispotrientrioles A-B **71a** y **71b** no tienen ninguna función oxigenada en C-4, una peculiaridad que no se había encontrado antes en Mucoromycotina. Los tres nuevos compuestos son probablemente sintetizados a partir de un hipotético intermedio ciclofarnesoide trihidroxilado **74** que no ha sido identificado en esta parte de la Memoria (Esquema 40). La existencia de este intermedio **74** también ha sido apoyada por los resultados de Sutter y Whitaker, los cuales describen el aislamiento de un derivado anhidro de 4-dihidrotrisorato de metilo C, y 4-dihidrotrisorato de metilo B desde cultivos individuales de *Phycomyces blakesleeanus*.^{95a} Estos derivados se forman por los correspondientes 4-dihidro derivados en disoluciones ligeramente ácidas. Este hipotético intermedio se biosintetizaría a partir del fragmento original C15 resultante de la degradación del β -caroteno, seguido de una hidroxilación en C-4 y C-2 y la consiguiente reducción de aldehído a alcohol (Esquema 42). El compuesto **70a** resultaría de la hidroxilación en el metilo 14 de **74**, seguida de un ataque enzimático de una molécula de agua en C-10 que podría dar lugar al triol **71a** y a su isómero **71b** con eliminación del grupo hidroxilo en el anillo a través de una S_N2'.



Esquema 42. Propuesta biosintética para la formación de los nuevos compuestos naturales trispoxano A y trispotrientrioles A–B **70–71**.

iii. Dependencia medioambiental de los apocarotenoides:

En este trabajo fundamentalmente hemos analizado cultivos de cinco días ya que están íntimamente relacionados con el comienzo de la morfogénesis sexual. Los apocarotenoides observados en cultivos a cinco días probablemente difieran en calidad y cantidad de aquellos que se forman a menos días, debido a las diferencias en el metabolismo y a la estabilidad de los mismos.

El cambio cualitativo principal inducido por el sexo estriba en la formación de ácidos trispóricos que no se encuentran en cultivos individuales. Los cambios cuantitativos se deben al incremento de la biosíntesis de β -caroteno (“carotenogénesis sexual”) y de los niveles de transcripción genético para su posterior metabolismo, tal y como se ha mostrado para las oxigenasas que producen la ruptura del β -caroteno.¹³⁴

La presencia de acetato en el medio, disminuyó la diversidad química, provocando la desaparición de varios compuestos. El efecto más notable fue la desaparición de dos de los compuestos más abundantes, los apotrientrioles A-B **71a** y **71b**, ambos de cultivos individuales y mixtos. Esto sugiere que el acetato bloquea el ataque de agua sobre C-10 en el precursor **74**.

iv. Funciones biológicas de los apocarotenoides:

Existen tres diferentes funciones mediadas por los apocarotenoides en *Phycomyces blakesleeanus*: la inhibición por retroalimentación de la carotenogénesis, activa en cultivos individuales; la inducción de la morfogénesis sexual por feromonas específicas del sexo; y la inducción de la carotenogénesis sexual en cultivos mixtos.

El inhibidor por retroalimentación debe ser un apocarotenoide temprano, probablemente uno de los productos de la primera ruptura del β -caroteno.¹³⁴ Debe estar presente en las células de cultivos individuales, y es improbable que sea secretado al medio, porque el color amarillo intenso de los micelios en mutantes *carS* que carecen de la inhibición (superproductoras de caroteno) no disminuye en las proximidades de los cultivos silvestres.

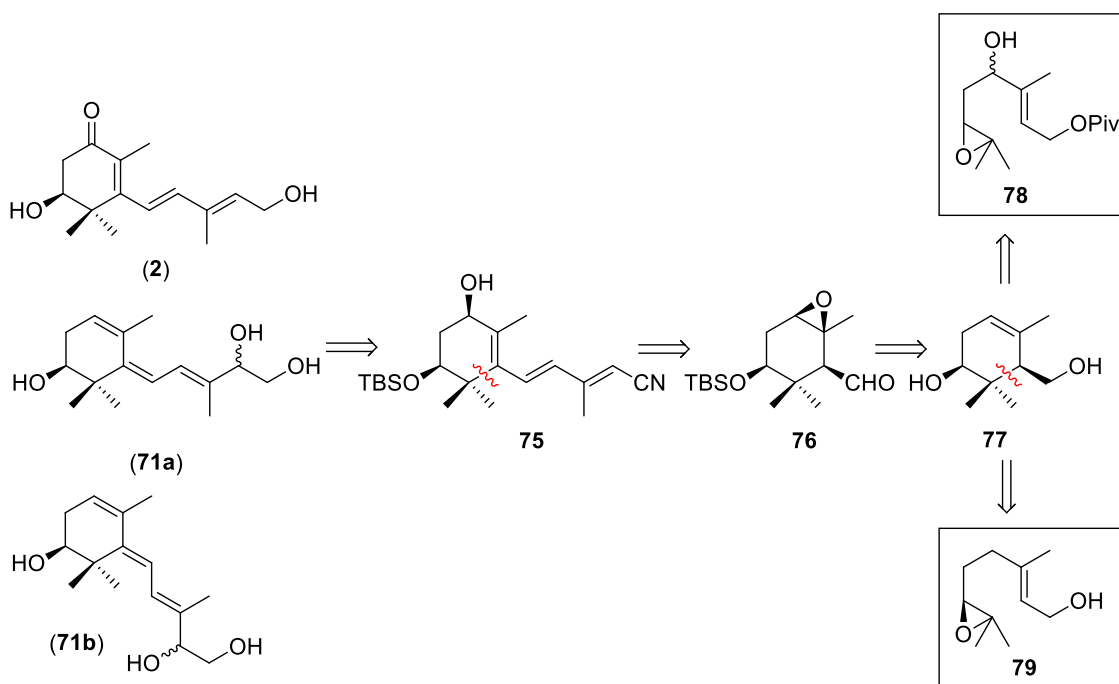
Las feromonas sexuales son específicas del sexo y deben estar presentes en el medio de los micelios individuales.^{3,20,130b} La carotenogénesis sexual ocurre solo en cultivos mixtos. El acetato, a la concentración usada, bloquea la carotenogénesis sexual e incrementa la interacción sexual enormemente con una abundante producción de cigosporas.⁷⁶ El acetato y otros ácidos carboxílicos de pequeño tamaño con los mismos efectos podrían actuar sobre los receptores, pero sus efectos drásticos sobre la composición de los apocarotenoides sugieren que actúan sobre las señales.

Las señales activas no tienen por qué ser necesariamente compuestos de los que se han detectado, ya que estos podrían ser demasiados inestables, o estar presentes y activos en concentraciones más bajas que nuestro límite de detección, o incluso no estar presentes a la hora de nuestros análisis. La multiplicidad de apocarotenoides, hace posible que cada función, pueda ser llevada a cabo por varios compuestos con diferente afinidad por los supuestos receptores. Finalmente, para las diferentes especies de Mucoramycotina no se debe asumir que usen las mismas señales; ya que han podido ser favorecidas por la especiación.

3. Síntesis total de (+)-Apotrisporina E y (+)-Apotrientriol A y B: Determinación de su estereoquímica.

El interés de los apocarotenoides de Mucorales por su papel, anteriormente mencionado, en la activación de la biosíntesis de β -caroteno (carotenogénesis sexual) unido a la estructura novedosa nos ha movido a poner a punto estrategias eficientes para su síntesis química.

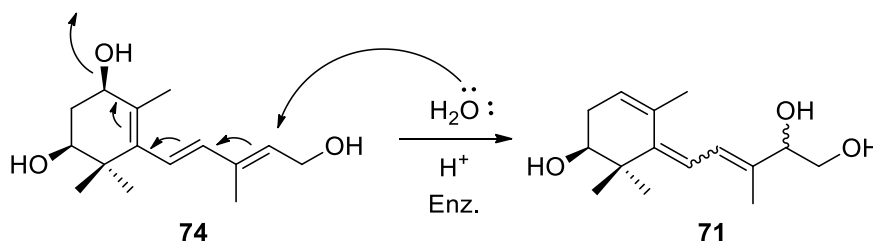
La funcionalización característica de los compuestos apotrisporina E (**2**) y apotrientrioles A-B (**71a** y **71b**), los cuales presentan un grupo hidroxilo en la posición C-2, y un grupo carbonilo en C-4 en el caso del compuesto **2** o un doble enlace para los compuestos **71a** y **71b** sobre C-4, hace que sea posible diseñar un esquema retrosintético común *vía* el intermedio **75** (Esquema 43). Este tiene dos pasos clave: la elongación de la cadena lateral desde **76** y el proceso de ciclación de los materiales de partida **78-79** derivados de geraniol comercial.



Esquema 43. Análisis retrosintético de **2**, **71a** y **71b**.

Teniendo en mente la ruta de la propuesta biosintética para los compuestos **71a** y **71b**, basada en un desplazamiento S_N2' del grupo hidroxilo en C-4 por un

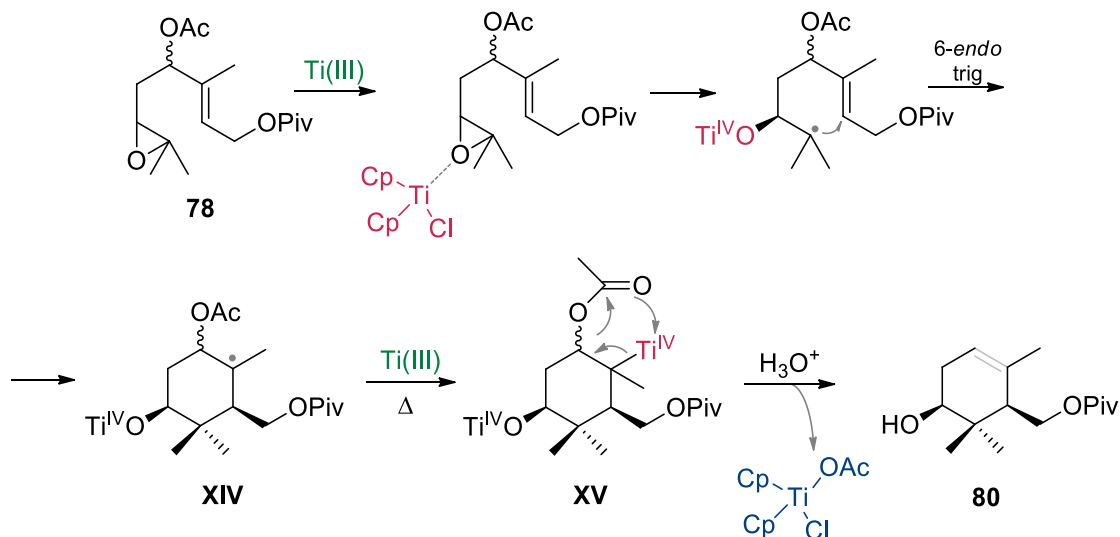
ataque nucleofílico de H₂O sobre C-10 a través de un intermedio tipo **74**, se piensa que una reacción similar catalizada por ácidos de Brønsted podría emular el procedimiento enzimático (Esquema 44).



Esquema 44. Propuesta biosintética para la formación de **71**.

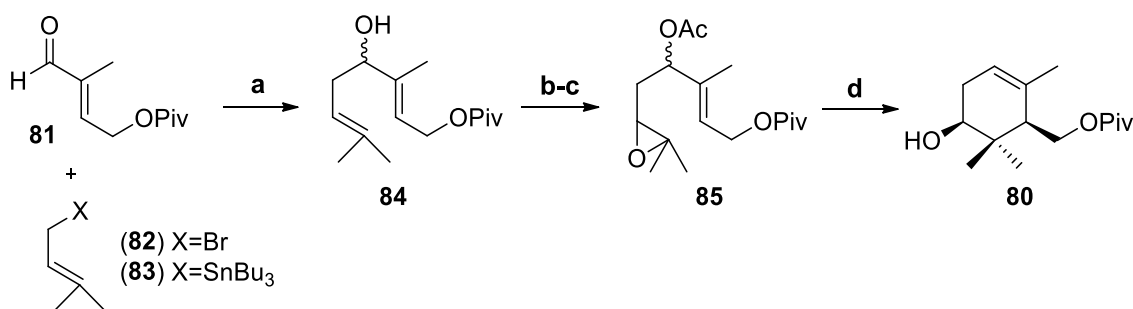
Para la síntesis del compuesto **2**, desde el intermedio **75**, solo se necesita una modificación simple del grupo funcional ciano y posterior oxidación en C-4. Una desconexión a través del doble enlace $\Delta^{7,8}$ de **75** origina el epóxido **76**, que se obtendrá desde el intermedio clave **77**.

Para preparar **77**, se plantearon dos reacciones de ciclación diferentes como estrategias adecuadas. La primera opción se basa en la metodología radicalaria usando cloruro de titanoceno¹²⁹ que provoca la apertura homolítica del epóxido **78**. Se piensa que la presencia del grupo acetato adyacente a la posición C-5 donde se localiza el radical carbonado en el intermedio **XIV** (Esquema 45), controlaría la regioselectividad de la eliminación de Ti^{IV} como paso final del proceso, permitiendo así obtener el doble enlace trisustituido a partir de la especie alquil-Ti^{IV} (**XV**). El éxito de este tipo de ciclaciones puede generalizar el empleo de esta aproximación sintética hacia otros apocarotenoides tales como trisporoles y ácidos trispóricos. Para ello habría que emplear un epoxi derivado de **78** que posea una función oxigenada en un metilo adyacente al anillo oxiránico. La segunda estrategia emplea una metodología de ciclación catiónica a partir de acetato de 6,7-epoxigeranilo mediada por ácidos de Brønsted.



Esquema 45. Mecanismo de ciclación radicalaria mediado por Ti^{III} para la formación de **80**.

Para preparar el producto acíclico **78**, se intentó prenilar el aldehído **81** a través de Cp_2TiCl ,¹³⁵ haciéndolo reaccionar con bromuro de prenilo **82** (Esquema 46) y obteniendo rendimientos moderados de **84** (36%). No se mejoraron los resultados usando prenil estannano¹³⁶ (**83**) que rindió un 24% de pivaloato de 4-hidroxigeranilo (**84**).



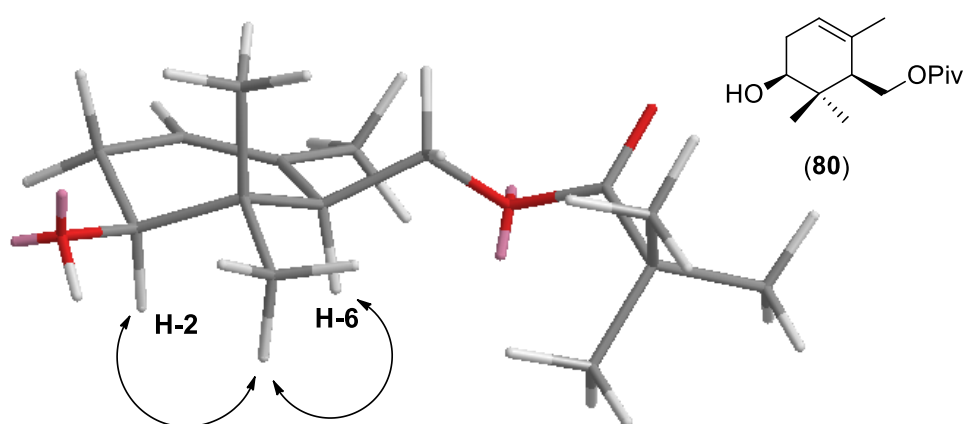
a. **82**, Cp_2TiCl_2 , Mn, THF, ta, 36% ó **83**, BCl_3 , DCM, $-78\text{ }^\circ\text{C}$, 24%. b. Ac_2O , DMAP, Piridina, ta, 95%. c. AMCPB, DCM, $0\text{ }^\circ\text{C}$, 59%. d. Cp_2TiCl_2 , Mn, THF, $40\text{ }^\circ\text{C}$, 67%.

Esquema 46. Síntesis de **80** a partir de la prenilación de **81** y de la ciclación radicalaria con Cp_2TiCl de **85**.

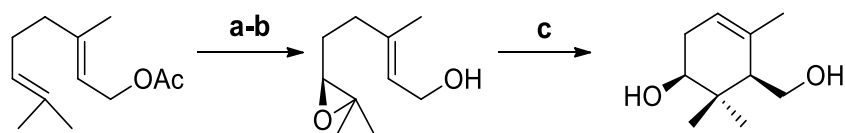
¹³⁵ Estévez, R. E.; Justicia, J.; Bazdi, B.; Fuentes, N.; Paradas, M.; Choquesillo-Lazarte, D.; García-Ruiz, J. M.; Robles, R.; Gansauer, A.; Cuerva, J. M.; Oltra, J. E. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 2774-2791.

¹³⁶ Schottner, E.; Simon, K.; Friedel, M.; Jones, P. G.; Lindel, T. *Tet. Lett.* **2008**, *49*, 5580-5582.

La obtención de **84** permite preparar la mezcla diastereoisomérica del oxirano **85** a partir de una secuencia de acetilación (95% de rendimiento) y epoxidación selectiva (56% de rendimiento). La ciclación radicalaria de **85** se realizó mediante la mezcla $\text{Cp}_2\text{TiCl}_2/\text{Mn}$ en exceso en THF a 40 °C, dando lugar a una eficiente eliminación del grupo acetato y a la formación de la olefina trisustituida (**80**, 67% de rendimiento) de acuerdo con la propuesta retrosintética. Este proceso transcurre con muy alta diastereoselectividad ($2S,2R$) o ($2R,6S$) y su estereoquímica relativa se pudo establecer por experimentos NOE (Figura 28).



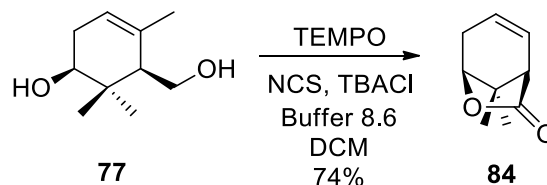
Estos resultados se compararon con la posibilidad de realizar la ciclación mediante el tratamiento de ($6S$)-6,7-epoxigeraniol (**78**) (preparado a través de dihidroxilación asimétrica de Sharpless) con ácidos de Lewis en aperturas catiónicas. Así utilizando un exceso de ZrCl_4 sobre el epoxigeraniol **78**, el diol **76** se obtuvo con un rendimiento del 59%, reproduciendo los resultados obtenidos por Vidari *et al.*^{117,118} (Esquema 47). De esta forma se eligió esta segunda opción de ciclación para obtener cantidad del intermedio **76** por presentar un rendimiento global mejor y menos pasos sintéticos.



a. i. ADMix- α , *t*-BuOH-H₂O. ii. MsCl, Piridina, -10 °C; b. K₂CO₃, MeOH, ta. c. ZrCl₄, DCM, ta, 59%.

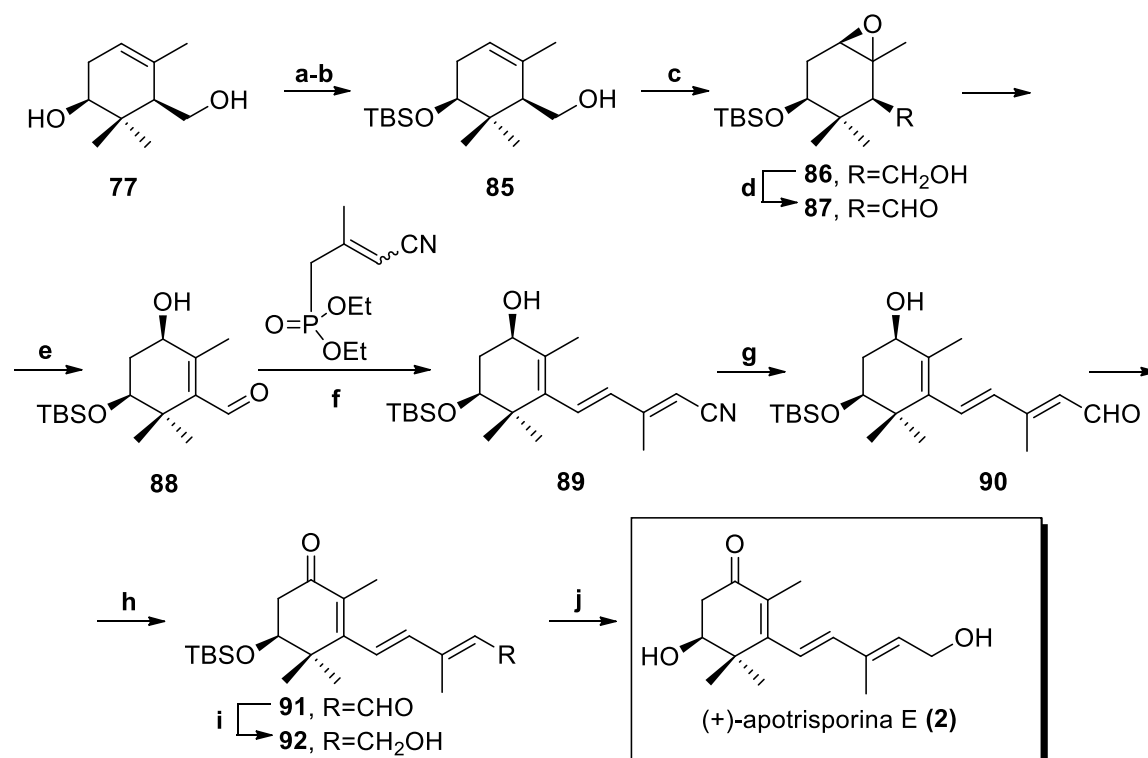
Esquema 47. Obtención del diol **77** a partir de una ciclación catiónica mediada por ZrCl₄.

Con el diol **77** en nuestras manos, se intentó realizar la oxidación selectiva del alcohol primario. Se probaron varios métodos de oxidación usando PDC, PCC o Dess-Martin periodinano (DMP) pero resultaba siempre la doble oxidación, o una muy baja selectividad y rendimiento hacia el producto mono oxidado. Sin embargo, la oxidación con TEMPO permitió tener el derivado del ácido carboxílico que espontáneamente lactonizó hacia el biciclo **84** en un 74% de rendimiento (Esquema 48).



Esquema 48. Lactonización de **77**.

Teniendo en cuenta que el hidroxialdehído derivado no era fácil de preparar desde **84**, se procedió a obtener el aldehído **87** (Esquema 49). Su preparación se consiguió mediante una secuencia de tres pasos, que incluyen una benzoilación selectiva del hidroxilo primario, una posterior sililación del alcohol secundario y finalmente la saponificación del éster para obtener el derivado **85** en un 74% de rendimiento para las tres etapas. La epoxidación estereoselectiva controlada por el grupo hidroxilo del compuesto **85** permitió obtener el oxirano **86** en un 68% de rendimiento, el cual se oxidó con DMP hasta aldehído **87** en un excelente rendimiento del 85%.



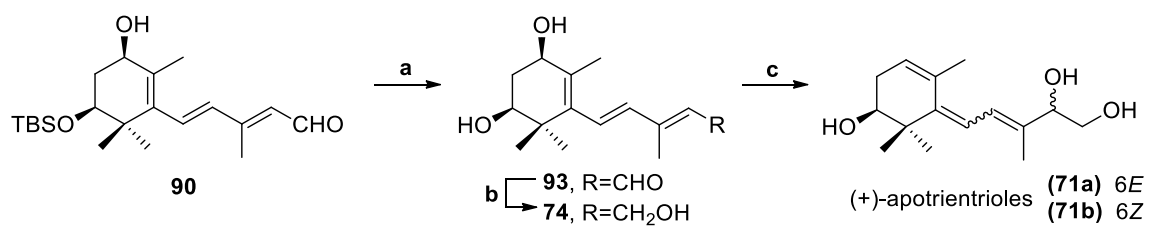
a. i. BzCl, Et₃N, DCM, -40 °C. ii. TBSOTf, 2,6-lutidina, DCM, ta, 76% en los dos pasos. b. NaOH ac., MeOH, ta. c. AMCPB, DCM, ta, 68% en los dos pasos. d. DMP, DCM, ta, 85%. e. Pirrolidina, Et₂O, ta, 90%. f. Fosfonato, *n*-BuLi, THF, ta, 58%. g. DIBALH, tolueno, de -20 °C a ta, 71%. h. DMP, DCM, ta, 84%. i. Zn(BH₄)₂, THF, -40 °C, 81%. j. TBAF, THF, ta, 70%.

Esquema 49. Síntesis de apotrisporina E (**2**) a partir del diol **77**.

En los pasos siguientes, se procedió a abrir el epóxido en medio básico por tratamiento con pirrolidina recién destilada a temperatura ambiente. Esta reacción transcurre con total regiocontrol gracias a la mayor acidez de H-5. El hidroxialdehído **88** se obtuvo con un rendimiento del 90%. La cadena lateral carbonada se acopló a **88** mediante una olefinación Horner-Wadsworth-Emmons (HWE) con el adecuado fosfonato y *n*-BuLi en exceso, dando lugar a un 58% del sintón común **89**. Desde este intermedio, los siguientes pasos hasta llegar a la (+)-apotrisporina E llevan implícitos un intercambio de reacciones oxidación/reducción y desprotección. Así pues, el grupo nitrilo se redujo hasta grupo aldehído (**90**) con DIBALH en tolueno, seguido de oxidación quimioselectiva con DMP del hidroxilo en C-4, obteniendo así el cetoaldehído **91** (85% de rendimiento). Finalmente, el compuesto **91** se redujo quimioselectivamente con

Zn(BH₄)₂ en THF a baja temperatura dando el cetoalcohol **92** con un rendimiento del 81%. Finalmente, la desprotección del sililéter con TBAF permitió obtener (+)-apotrisporina E, cuyo espectro de ¹H RMN era idéntico al del producto natural obtenido desde cultivos de *Phycomyces blakesleeanus*. Igualmente el espectro de ¹³C y otras características espectroscópicas confirmaron inequívocamente la estructura propuesta. Por otra parte, la rotación específica encontrada para este producto sintético fue de $[\alpha]_D^{20} = +7.1^\circ$ mientras que para la (+)-apotrisporina E natural aislada de un cultivo mixto de *Phycomyces blakesleeanus* era de $[\alpha]_D^{20} = +7.8^\circ$. Esto nos permitió establecer como 2*S* la configuración absoluta de la (+)-apotrisporina E natural.

La síntesis de apotrientrioles A y B, **71a** y **71b**, se completó a partir del intermedio **90** (Esquema 50). Primeramente, se eliminó el grupo -OTBS dando el hidroxialdehído **93** que se redujo con DIBALH para obtener el hipotético precursor biosintético que podemos denominar apotrientriol C **74**, que posteriormente se añade a nuestra biblioteca de metabolitos en HPLC en esta Memoria. Después de probar diferentes condiciones experimentales, el tratamiento de **74** con una cantidad catalítica de FSO₃H en THF:H₂O condujo en solo tres minutos de reacción a una mezcla (1:1) de los compuestos **71a** (6*E*) y **71b** (6*Z*) con un 40% de rendimiento total para las tres últimas reacciones. En la mezcla sintética **71** se mostró una rotación específica de $[\alpha]_D^{20} = +4.3$ (c 0.42, CH₂Cl₂), mientras que para el compuesto aislado **71a** era de $[\alpha]_D^{20} = +5.1$ (c 0.09, CH₂Cl₂). Las propiedades espectroscópicas de los compuestos sintéticos **71a** y **71b** fueron consistentes con las descritas para los correspondientes productos aislados de *Phycomyces blakesleeanus*. La concordancia de estos valores con los encontrados para el producto natural nos permite, de la misma manera que para la (+)-apotrisporina E, establecer la configuración absoluta de los (+)-apotrientrioles naturales como 2*S*, 6*E*, 8*E*, 10(*S*+*R*) y 2*S*, 6*Z*, 8*E*, 10(*S*+*R*) respectivamente.



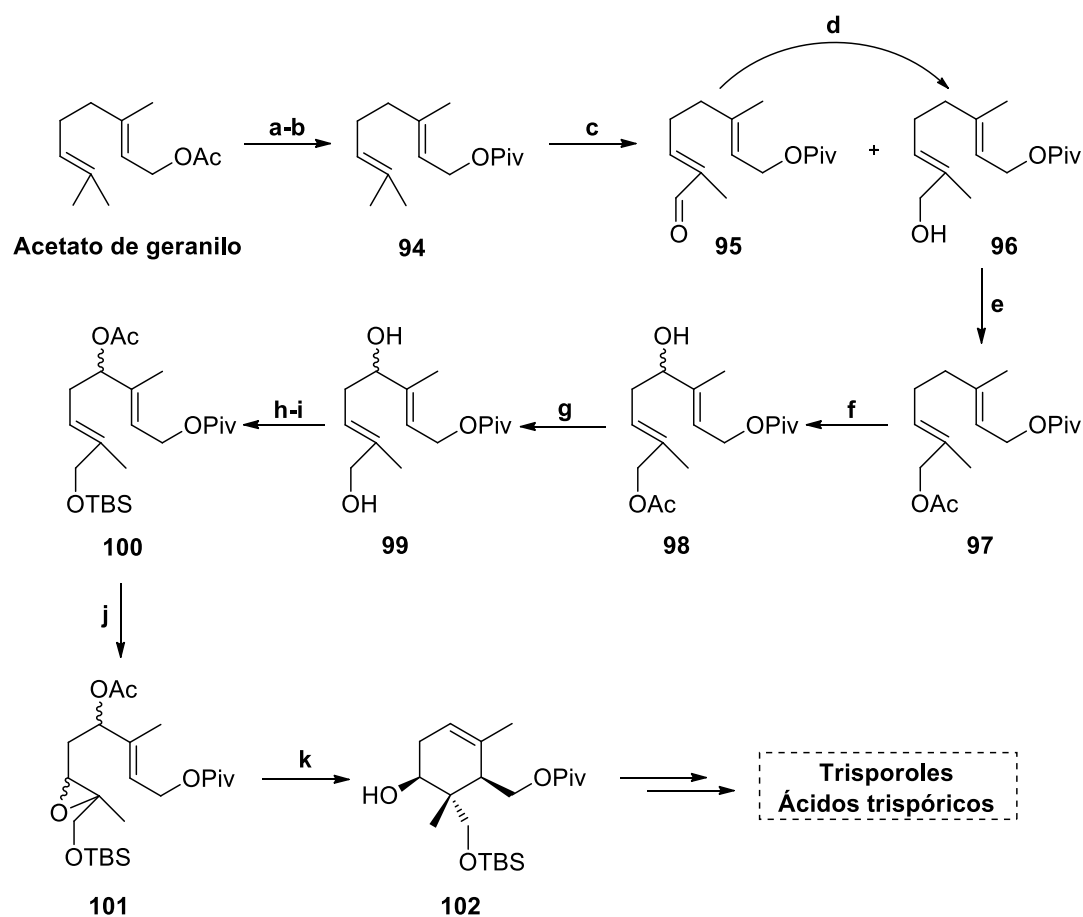
a. TBAF, THF, ta, 74%. b. DIBALH, tolueno, 82%. c. FSO₃H cat., THF:H₂O (1:1), ta, 65%.

Esquema 50. Síntesis de apotrienoles A y B (**71a** y **71b**) a partir del intermedio común **90**.

a. Aproximación hacia la síntesis de trisporoles y ácidos trispóricos mediante ciclación radicalaria con Cp₂TiCl.

La metodología radicalaria anteriormente estudiada para la obtención del esqueleto cíclico **80**, también se puede usar para obtener moléculas más funcionalizadas, en vista a las síntesis de trisporoles y ácidos trispóricos. Así pues, se desarrolla una ruta de síntesis (Esquema 51) usando dicha ciclación con Cp₂TiCl. Partiendo de acetato de geranilo y tras una desprotección en medio básico con K₂CO₃ metanólico, se protege con PivCl obteniendo el pivaloato de geranilo **94** con un rendimiento de 96% para las dos etapas. A continuación, la oxidación alílica¹³⁷ con cantidades catalíticas de SeO₂ e hidropéroxido de *terc*-butilo como regenerador para funcionalizar el *gem*-dimetilo, se efectuó con un 64% de rendimiento, tras el reciclado del producto de partida sin reaccionar. Además, el aldehído producido por la sobreoxidación de **94**, se puede reducir con NaBH₄ para obtener **96**. La acetilación de este compuesto (**96**) permite tener el intermedio adecuadamente protegido para una segunda oxidación alílica con SeO₂ en una posición secundaria menos reactiva. Por este motivo, se usan condiciones más enérgicas con cantidades estequiométricas de SeO₂ en EtOH acuoso al 97.5% y rindiendo un 42% de **98** con reciclado del producto sin reaccionar. Seguidamente, se intercambian los grupos protectores en vistas a la ciclación final. El acetato primario se desprotege para después formar selectivamente el silil éter con TBSCl y posteriormente, el alcohol secundario se protege como acetato para obtener el intermedio **100**. Finalmente, **100** se epoxida con AMCPB dando **101** en un 90% de rendimiento. El proceso final de ciclación se aborda con Cp₂TiCl calentando ligeramente a 40 °C obteniendo regioselectivamente la olefina trisustituida **102** (70%) que es un intermedio adecuado para la síntesis de trisporoles y ácidos trispóricos.

¹³⁷ Umbreit, M. A.; Sharpless, K. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 5526-5527.



a. K_2CO_3 , MeOH, ta. **b.** PivCl, Imidazol, Piridina. **c.** SeO_2 , *t*-BuOOH, DCM. **d.** $NaBH_4$, MeOH. **e.** Ac_2O , Piridina, DMAP. **f.** SeO_2 , aq. EtOH. **g.** K_2CO_3 , MeOH. **h.** TBSCl, Imidazol, DMF, 0 °C. **i.** Ac_2O , Piridina, DMAP. **j.** AMCPB, DCM, 0 °C. **k.** Cp_2TiCl_2 , Mn, THF.

Esquema 51. Síntesis hacia el esqueleto polifuncionado **102** para la obtención de epímeros de trisporoles y ácidos trispóricos a partir de una metodología radicalaria con Cp_2TiCl .

La estructura del producto de ciclación **102** se deduce fácilmente de los datos espectroscópicos, especialmente de RMN (Tabla 9).

Tabla 9. Datos espectroscópicos de **102**.

C/H	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	NOE
1	5.39 (1H, s a)	121.1	–
2	2.22 (2H, m)	30.8	–
3	3.85 (1H, dd)	71.5	β
4	–	41.4	–
5	2.02 (1H, m)	43.1	–
6	–	132.6	–
7	1.68 (3H, s)	22.0	–
8	4.07 (1H, dd) 4.30 (1H, dd)	62.7	α
9	3.53 (1H, d, $J = 10$ Hz) 3.68 (1H, d, $J = 10$ Hz)	68.9	β
10	0.88 (3H, s)	12.0	α
11	–	178.5	–
12	–	38.8	–
13	1.19 (9H, s)	27.2	–
14^a	0.07 (3H, s) 0.06 (3H, s)	-5.5	–
15	–	18.2	–
16	0.89 (9H, s)	25.9	–

^a Señales intercambiables

La configuración relativa se establece una vez asignadas las señales del espectro de ^1H -RMN (Tabla 9) a través de experimentos NOE (Figura 29). Así se pueden observar dichos efectos entre H-7 y H-17, y entre H-16 y H-1 lo cual determina disposiciones *syn* entre cada pareja. De esta manera se pone de manifiesto, que este proceso de ciclación transcurre por un lado con un excelente

control de la regioselectividad, tanto en el cierre del anillo como en la formación del doble enlace trisustituído. Por otra parte se consigue una buena estereoselectividad en la formación de los tres centros estereogénicos consecutivos de acuerdo con los precedentes en estas ciclaciones.

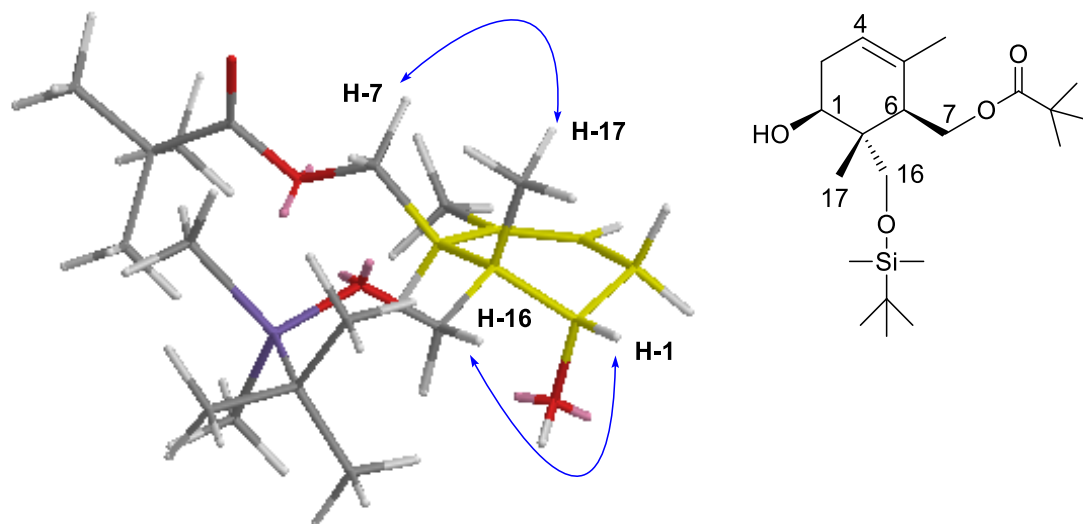


Figura 29. Experimentos NOE para establecer la estereoquímica de **102**.

4. Análisis cromatográfico de trisporoides por HPLC–MS de alta resolución.

Tal y como se indicaba en el apartado de Introducción y Objetivos de esta Tesis Doctoral, uno de sus objetivos principales es la puesta a punto de una metodología analítica más eficaz para analizar los extractos ácidos y neutros obtenidos de los medios de cultivos de Mucorales, mediante HPLC–DAD/HRMS (Bruker maXis LC/MS ESI–TOF). La detección en estos equipos con espectrometría de masas, completa aquella de DAD y debe permitir contribuir a mejorar el análisis estructural de los picos de los cromatogramas. Este análisis se fundamenta en una hipotética identificación de nuevos metabolitos hasta ahora desconocidos y debe contribuir a la puesta a punto de un perfil cromatográfico general de trisporoides en *Phycomyces* y más adelante en otros Mucorales.

Con este objetivo, se utilizaron equipos de HPLC–MS tanto de baja como de alta resolución, pertenecientes a la Fundación Medina, ubicada en el Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, (Granada). Basándonos en la dilatada experiencia de nuestro grupo en este tipo de análisis de extractos, se intentó extrapolar el método previamente implementado por nosotros a los nuevos instrumentos.

Tabla 10. Condiciones cromatográficas iniciales en el análisis de trisporoides.

	Método Cromatográfico
Columna	Waters Spherisorb-ODS2, tamaño de partícula 5 µm, 4.6 × 250 mm
Fase	Reversa
Flujo	1 ml/min
Temperatura	25 °C
Gradiente	0 – 6 min (Metanol:Agua, 1:4)
	6 – 25 min (Metanol)
	25 – 40 min (Metanol)
	40 – 45 min (Metanol:Agua, 1:4)

Con una muestra patrón (analizados e identificados los metabolitos previamente) se dispuso a optimizar el método en HPLC. Para ello, se ensayaron diferentes gradientes de metanol-agua y acetonitrilo-agua, con diferentes velocidades de flujo (0.5 mL/min o 1.0 mL/min). Los mejores resultados se obtuvieron con un gradiente metanol-agua (ver Tabla 10) y un flujo de 1.0 mL/min. Una vez optimizada la separación de las señales debidas a apocarotenoides, procedimos al análisis de la producción de estos compuestos a 2 y 5 días de incubación mediante HPLC–DAD/HRMS (Bruker maXis LC/MS ESI–TOF). La adicción de un 0.01% de TFA (ácido trifluoroacético) a las fases móviles, no alteró en absoluto el perfil y aumentó la resolución cromatográfica.

Con estas nuevas condiciones, se realizaron inicialmente análisis de las muestras de fracciones ácidas y neutras de extractos de cultivos mixtos A56 (+) × NRL1555 (–) de *Phycomyces blakesleeanus* (Ver condiciones de cultivo, Anexo 5) con el HPLC–MS de baja resolución. Estos análisis fueron infructuosos ya que los espectros de masas registrados carecen de la información debida a las fragmentaciones. Esto es debido a que los apocarotenoides tanto de la muestra ácida como de la neutra, no son fragmentados en suficiente proporción para dar espectros de masas completos. A continuación se realizaron los análisis con el instrumento HPLC–DAD/HRMS. Se analizaron y compararon muestras de cultivos individuales y mixtos, tanto a dos días como a cinco. También se liofilizaron algunas muestras, para comparar los resultados al sospechar que el tratamiento habitual de las muestras, podría originar una descomposición de los metabolitos más inestables que se trata de evitar.

Las propuestas estructurales y por lo tanto la identificación de picos se ha llevado a cabo atendiendo a: i) **Tiempo de retención:** Se ha tenido en cuenta los tiempos de retención de aquellos apocarotenoides identificados mediante aislamiento y elucidación estructural espectroscópica en los aparatados anteriores de la Memoria. Estos “patrones” definen zonas del cromatograma donde según la naturaleza neutra o ácida del compuesto y según su tamaño molecular C18, C15 ó C7, la polaridad es debida a la presencia de 4, 3 ó 2 oxígenos en la estructura. ii) **Máximos de absorción en el UV:** Se ha tenido en cuenta los modelos de absorción

de los distintos cromóforos establecidos en los patrones. iii) **Fórmula molecular deducida del HRMS:** Para el análisis de los espectros de MS, se ha usado una tabla de masas exactas monoisotópicas de aductos de iones moleculares observados frecuentemente en los espectros de masas ESI.¹³⁸

¹³⁸ Huang, N.; Siegel, M. M.; Kruppa, G. H.; Laukien, F. H. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1999**, *10*, 1166-1173.

a. Estudio de apocarotenoides en las fracciones neutras de cultivos individuales a dos días:

En las siguientes Figuras 30-32 se muestran los cromatogramas de las muestras neutras a dos días de cultivo, tanto del sexo (+) como del (-), y una superposición de ambas. Como se observa a continuación, no existen prácticamente grandes diferencias entre las dos muestras. A grandes rasgos, el perfil de la muestra del sexo (+) tiene picos más intensos que el del sexo (-). En la zona de 17-18 minutos existen picos (XVI-XVIII) que no han podido identificarse como apocarotenoides. Cada pico analizado y sus respectivos espectros de masas y UV se presentan a continuación. Las estructuras asignadas en este estudio pueden verse resumidas en la Tabla 11.

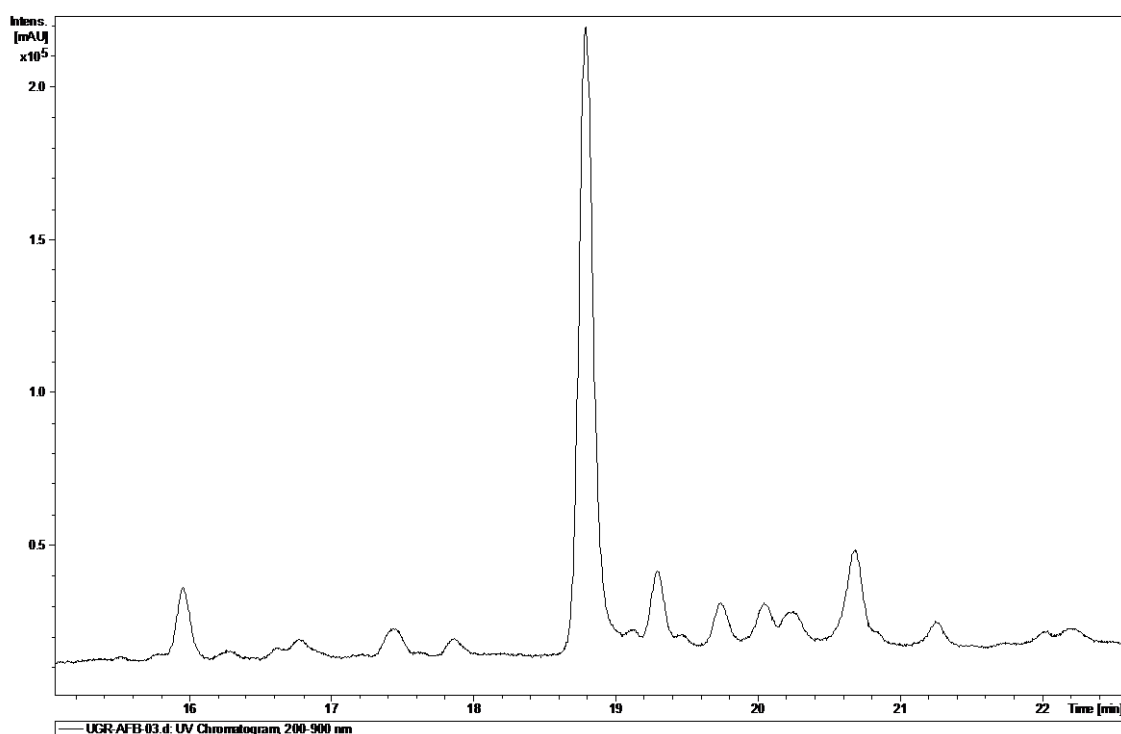


Figura 30. Cromatograma de la fracción neutra y sexo (+) del cultivo a dos días.

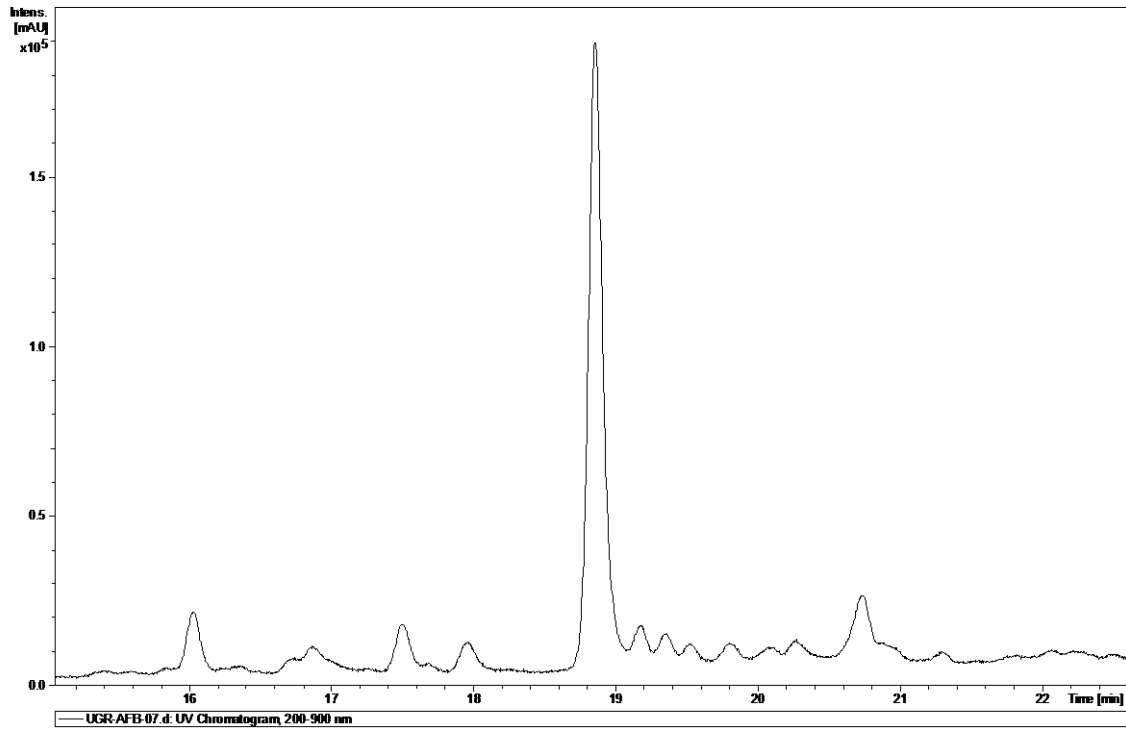


Figura 31. Cromatograma de la fracción neutra y del sexo (-) del cultivo a dos días.

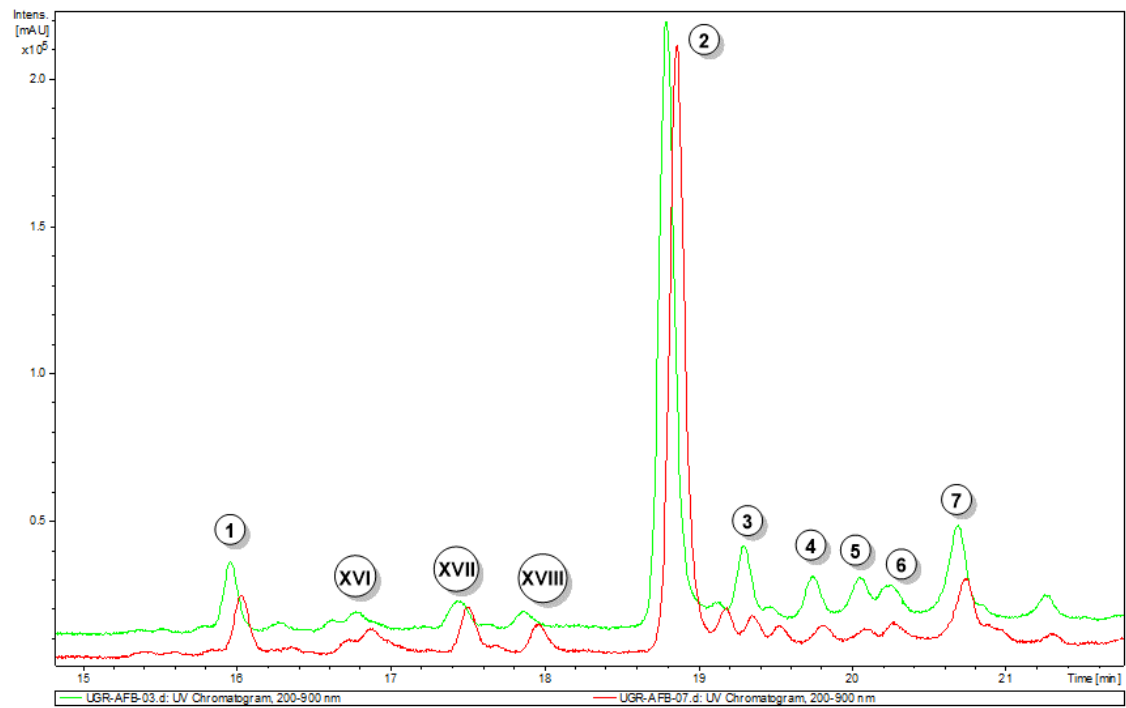
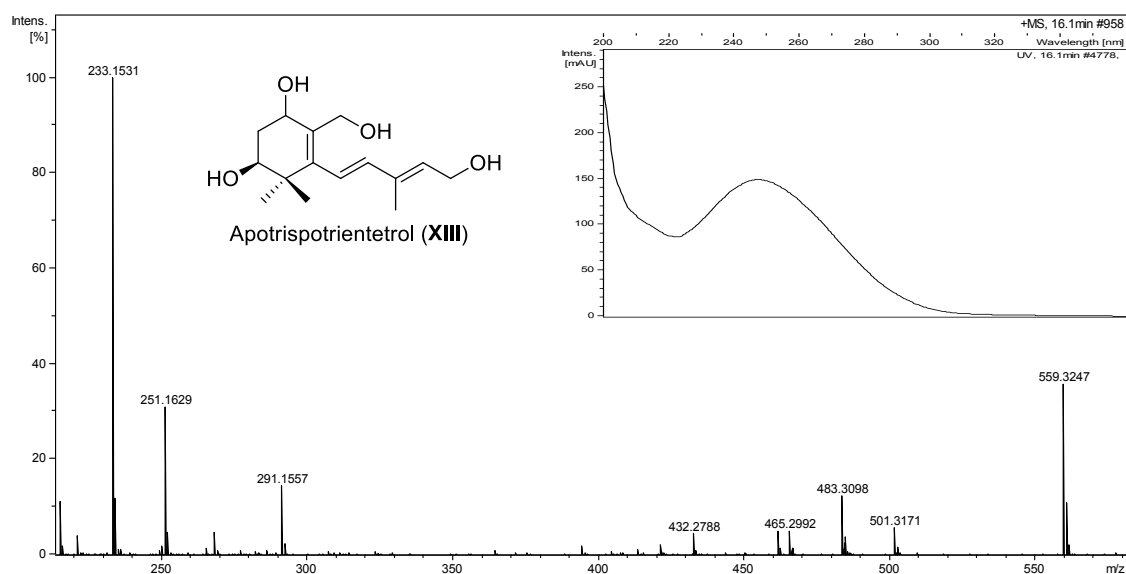


Figura 32. Cromatogramas superpuestos de los dos sexos (+) y (-) de muestras neutras a dos días.

Pico 1:

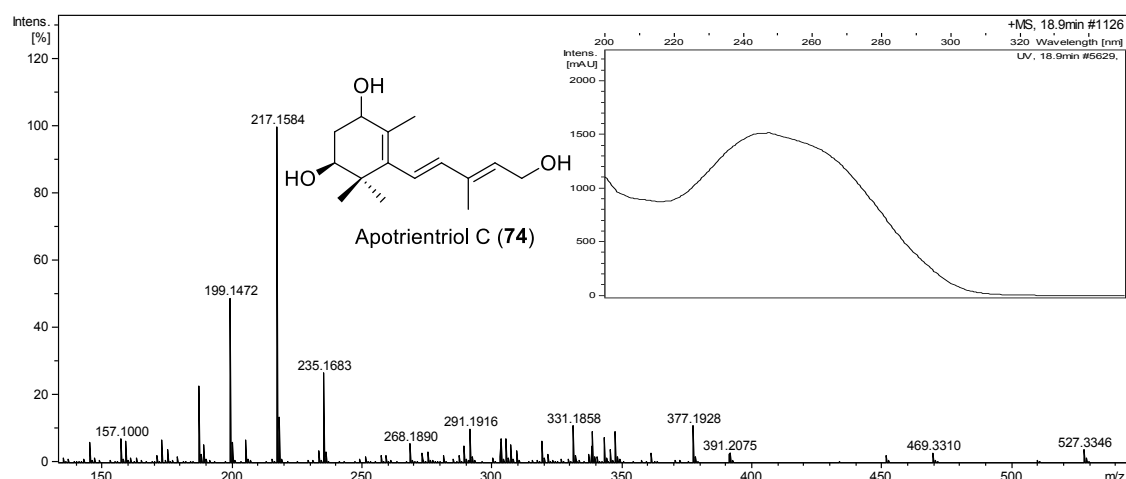
Con un tiempo de retención de 16.2 minutos, podemos sospechar que el compuesto posee 4 oxígenos y 15 carbonos. Con ese requisito a m/z 269.1973 (teórico: m/z 269.1980) aparece un pico de baja intensidad que sería el $[M + H]$ y corresponde a una fórmula $C_{15}H_{24}O_4$. Picos más intensos en el espectro aparecen a m/z 233.1531 $[M + H - 2H_2O]$ (teórico: m/z 233.1536) y a m/z 251.1629 $[M + H - H_2O]$ (teórico: m/z 251.1642). Adicionalmente se observan aductos con sodio a m/z 291.1557 $[M + Na]$ (teórico: m/z 291.1567) y m/z 559.3247 $[2M + Na]$ (teórico: m/z 559.3242). Estos datos confirman la fórmula propuesta. En el espectro UV aparece una absorción con λ_{max} : 248 nm que es característica de un trieno conjugado. Por todo ello se propone la estructura de apotrispotrientetrol **XIII** (Esquema 42) y se trata de un nuevo producto natural.



Pico 2:

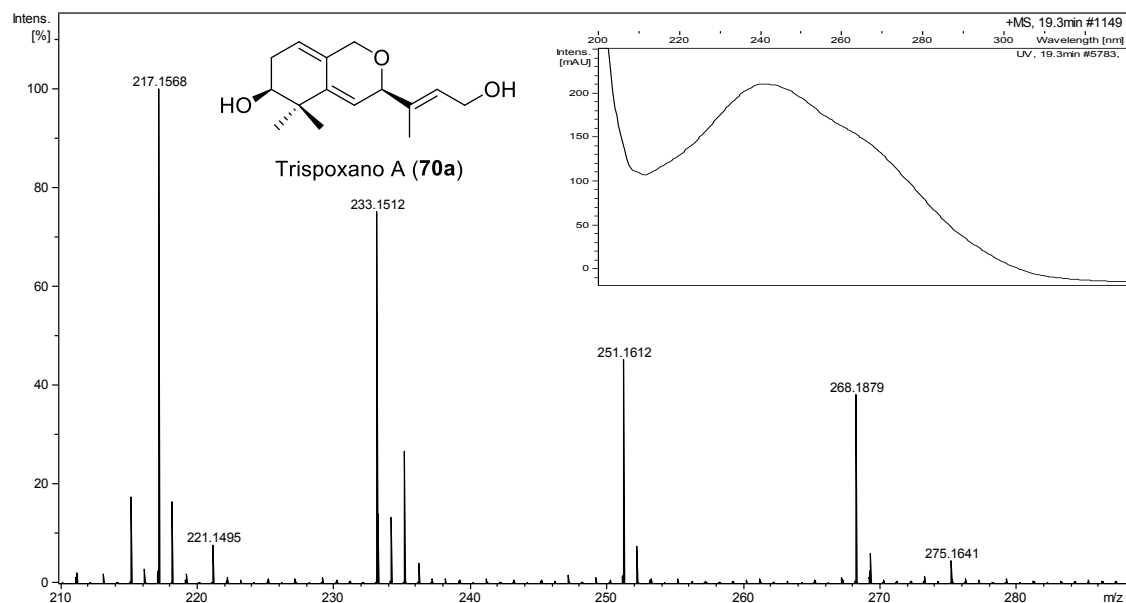
El tiempo de retención a 18.9 minutos indica probablemente la presencia de tres oxígenos y 15 carbonos en la molécula. El pico a m/z 235.1683 de fórmula $C_{15}H_{22}O_2$ debe corresponder a la pérdida de una molécula de agua $[M + H - H_2O]$ (teórico: m/z 235.1692) y el más intenso del espectro a m/z 217.1584 a la pérdida de dos moléculas de agua $[M + H - 2H_2O]$ (teórico: m/z 217.1592). El aducto a m/z

527.3346 [2M + Na] (teórico: m/z 527.3342) confirma una fórmula molecular $C_{15}H_{24}O_3$ y el máximo en el UV a 247 nm indica un trieno conjugado. Se establece entonces la estructura como apotrientriol C (**74**), un nuevo producto natural. Este compuesto se obtuvo a lo largo de la síntesis de los apotrientrioles A y B (**71a** y **71b**).



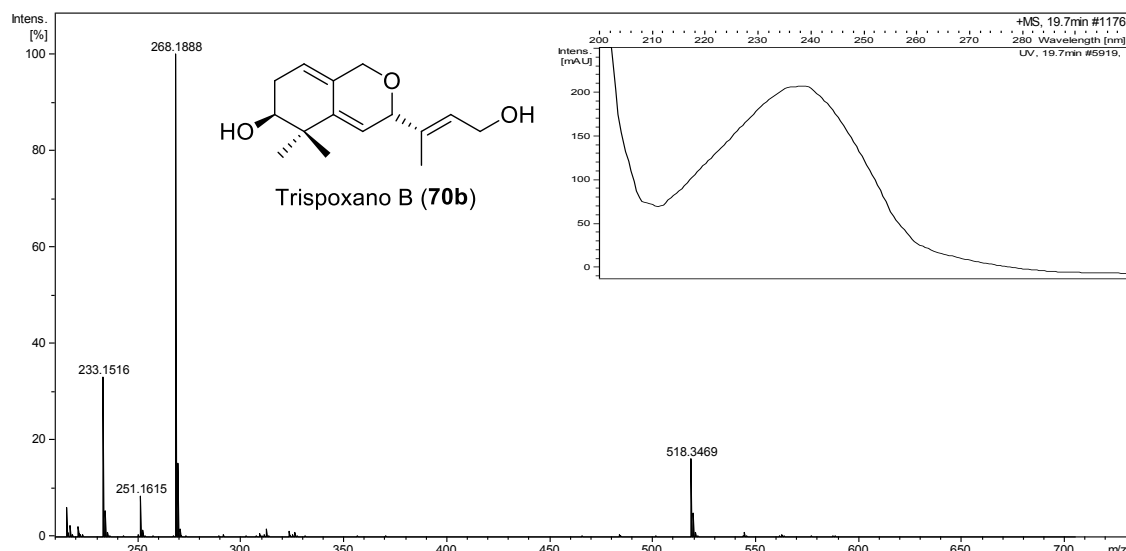
Pico 3:

El tiempo de retención 19.3 minutos está en zona de tres oxígenos y 15 carbonos. En el HRMS se presenta el pico molecular a m/z 251.1612 [M + H] (teórico: 251.1642) que le corresponde una fórmula molecular de $C_{15}H_{22}O_3$. Otros picos que confirman ese dato salen a m/z 233.1512 [M + H - H₂O] (teórico: m/z 233.1536) y m/z 268.1879 [M + NH₄] (teórico: m/z 268.1907). El máximo de absorción en el UV a 242 nm, es característico de un dieno del trispoxano. Con todos los datos se identifica como trispoxano A (**70a**) confirmado con una muestra patrón natural.

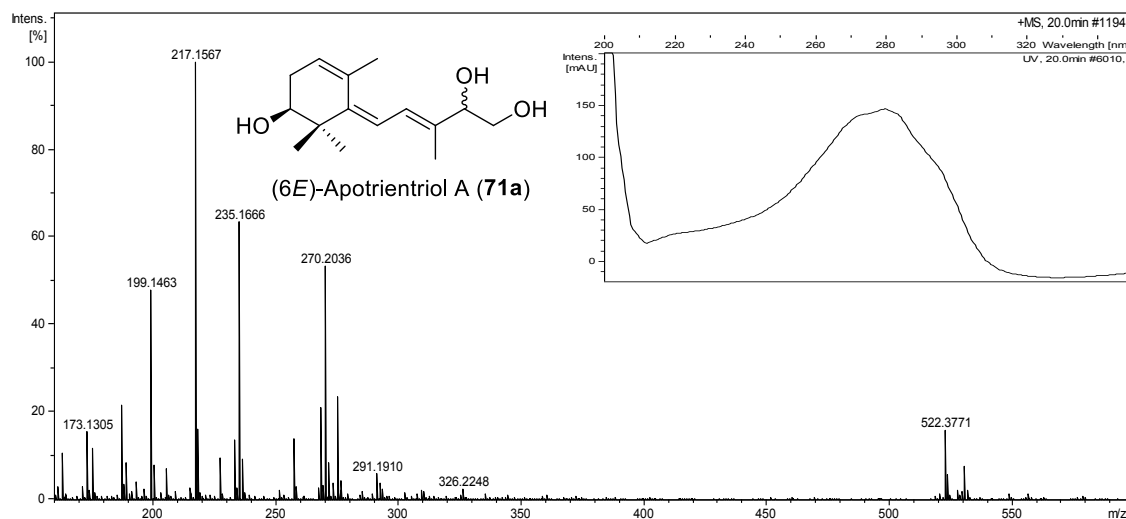


Pico 4:

Presenta características muy parecidas al Pico 3. El pico más intenso está en m/z 251.1615 $[M + H]$ (teórico: m/z 251.1642), su fórmula molecular asociada es $C_{15}H_{22}O_3$, aparece también la pérdida de agua a m/z 233.1516 $[M + H - H_2O]$ (teórico: m/z 233.1536) y existen aductos con amonio a m/z 268.1888 $[M + NH_4]$ (teórico: m/z 268.1907) y a m/z 518.3469 $[2M + NH_4]$ (teórico: m/z 518.3476). El máximo en el UV corresponde a 239 nm aproximadamente. Con estos datos, asignamos provisionalmente a este compuesto la estructura de trisoxano B (70b), un estereoisómero de trisoxano A (70a).

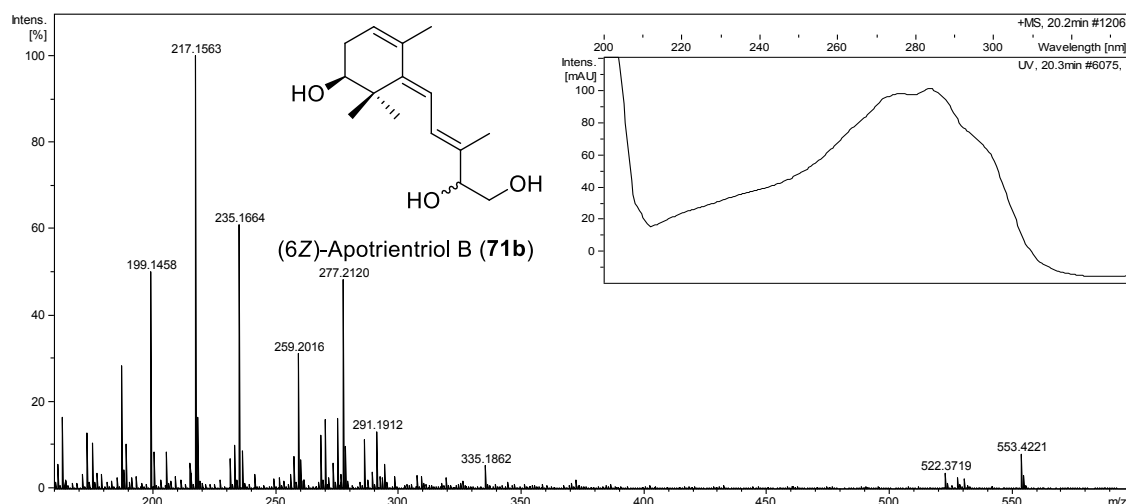
**Pico 5:**

El tiempo de retención a 20.0 minutos también está en zona de tres oxígenos. En HRMS se observa un ión correspondiente a la pérdida de agua a m/z 235.1666 $[M + H - H_2O]$ (teórico: m/z 235.1692) correspondiente a una fórmula $C_{15}H_{22}O_2$. El pico más intenso aparece a m/z 217.1567 $[M + H - 2H_2O]$ (teórico: m/z 217.1586) y se observan aductos con amonio a m/z 270.2036 $[M + NH_4]$ (teórico: m/z 270.2063) y m/z 522.3771 $[2M + NH_4]$ (teórico: m/z 522.3788). La fórmula molecular asociada es $C_{15}H_{24}O_3$. El máximo en el UV corresponde a 280 nm y el espectro presenta una estructura fina con hombros a izquierda y derecha del máximo. Esto último es característico de los denominados apotrientrioles A y B, y con estos datos, podemos indicar que se trata del estereoisómero 6E de apotrientriol A (**71a**).



Pico 6:

Este espectro es muy parecido al anterior coincidiendo con la mayoría de picos. Así pues, el pico más intenso es m/z 217.1563 [M + H - 2H₂O] (teórico: m/z 217.1586). Existen otros iones de pérdida de agua a m/z 235.1664 [M + H - H₂O] (teórico: m/z 235.1692) y aducto a m/z 522.3719 [2M + NH₄] (teórico: m/z 522.3788). La fórmula molecular asociada es C₁₅H₂₄O₃ y el máximo en el UV corresponde a 283 nm siendo su forma similar al anterior. Con todo ello, se trata del estereoisómero 6Z de apotrientriol B (**71b**).



Pico 7:

El tiempo de retención 20.7 minutos está en la región de los tres oxígenos. Los iones a m/z 217.1568 $[M + H - 2H_2O]$ (teórico: m/z 217.1586) y a m/z 235.1658 $[M + H - H_2O]$ (teórico: m/z 235.1692) deben corresponder a la pérdida de dos y una molécula de agua respectivamente. La fórmula molecular asociada entonces es $C_{15}H_{24}O_3$. El máximo en el UV corresponde a 248 nm aproximadamente. Estos datos son similares a aquellos del Pico 2 y debe tratarse de un isómero posicional del compuesto **74** donde el hidroxilo sobre C-2 está en otra posición. La menor polaridad respecto de su isómero hace sospechar que pudiera ubicarse sobre C-3, allí formaría puentes de hidrógeno que bajarían la polaridad. Se denomina apotrientriol D **103**.

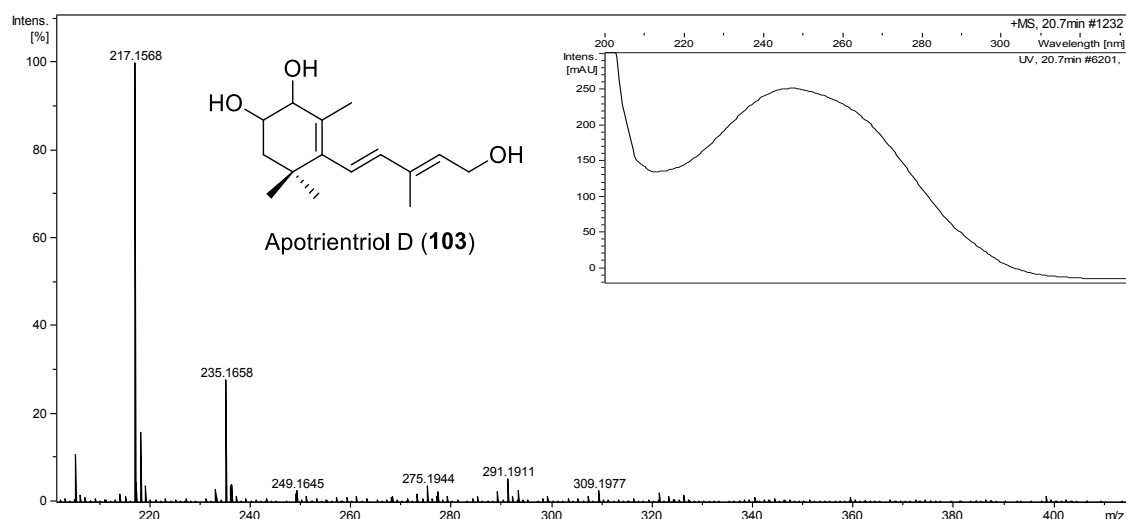
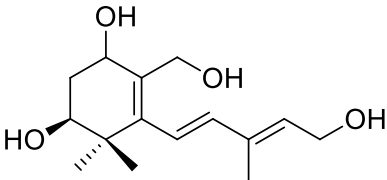
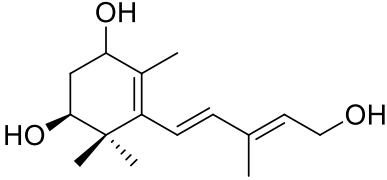
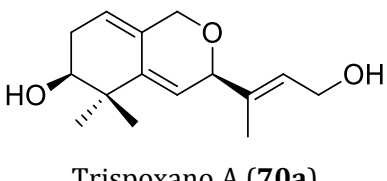
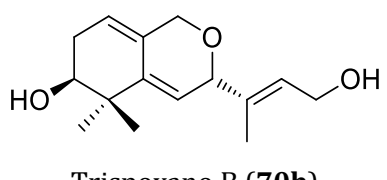
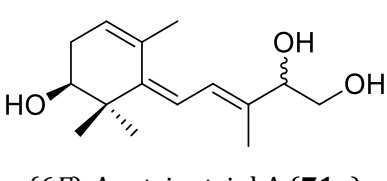
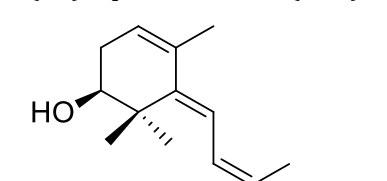
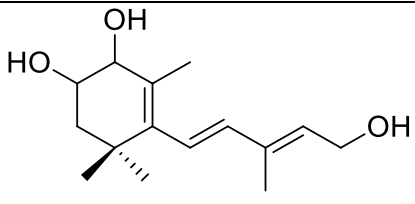


Tabla 11. Datos de los picos identificados en el HPLC–HRMS de la fracción neutra de cultivos individuales a dos días.

	Fórmula molecular	Tiempo de retención (min)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Picos m/z	Posible estructura
1	$C_{15}H_{24}O_4$	16.2	248	233.1534	 <p>Apotrispotrientetrol (XIII)</p>
2	$C_{15}H_{24}O_3$	18.9	247	217.1584	 <p>Apotrientriol C (74)</p>
3	$C_{15}H_{22}O_3$	19.3	242	233.1512	 <p>Trispoxano A (70a)</p>
4	$C_{15}H_{22}O_3$	19.7	239	268.1888	 <p>Trispoxano B (70b)</p>
5	$C_{15}H_{24}O_3$	20.0	280	217.1567	 <p>(6<i>E</i>)-Apotrientriol A (71a)</p>
6	$C_{15}H_{24}O_3$	20.3	283	217.1563	 <p>(6<i>Z</i>)-Apotrientriol B (71b)</p>

7	C ₁₅ H ₂₄ O ₃	20.7	248	217.1568	 <p>Apotrientriol D (103)</p>
---	--	------	-----	----------	--

En el resumen de la Tabla 11, se muestra como en los picos 1, 2 y 7 aparecen los compuestos apotrispotrientetrol (**XIII**) y apotrientrioles C (**74**) y D (**103**). Todos son nuevos productos naturales y no se han identificado previamente mediante extracción, fraccionamiento y aislamiento cromatográfico probablemente debido a su inestabilidad química. Esta hay que asociarla a la presencia del hidroxilo -OH en C-4, secundario y alílico que fácilmente sufre reacciones de eliminación o de desplazamiento nucleofílico. Dada la semejanza estructural y funcional entre ellos y otras moléculas identificadas, **XIII** y **74** serían los precursores de los otros compuestos identificados que podrían ser artefactos resultantes de la manipulación de los extractos. Así **XIII** podría ser el precursor de los apocarotenos heterocíclicos (**70a** y **70b**) (Picos 3 y 4). De ellos el menos polar podría ser el aislado e identificado inequívocamente en esta Memoria. Por otro lado **74** sería el precursor de los apotrientrioles A y B (**71a** y **71b**, Picos 5-6).

b. Estudio de apocarotenoides en las fracciones ácidas de cultivos individuales a dos días:

En las fracciones ácidas de los cultivos (+) y (-) a dos días de incubación, existen más diferencias que con respecto a las fracciones neutras, sobre todo cuantitativas. El sexo (-) es, por lo general, el que tiene más cantidad de algunos apocarotenoides, tal y como se observa en los picos **XIX** y **3**; sin embargo, hay una disminución importante en la proporción del metabolito correspondiente al pico 4. En la parte central del cromatograma, entre 13 y 18 minutos, los datos espectroscópicos indican que no se tratan de apocarotenoides (picos **XIX-XXII**).

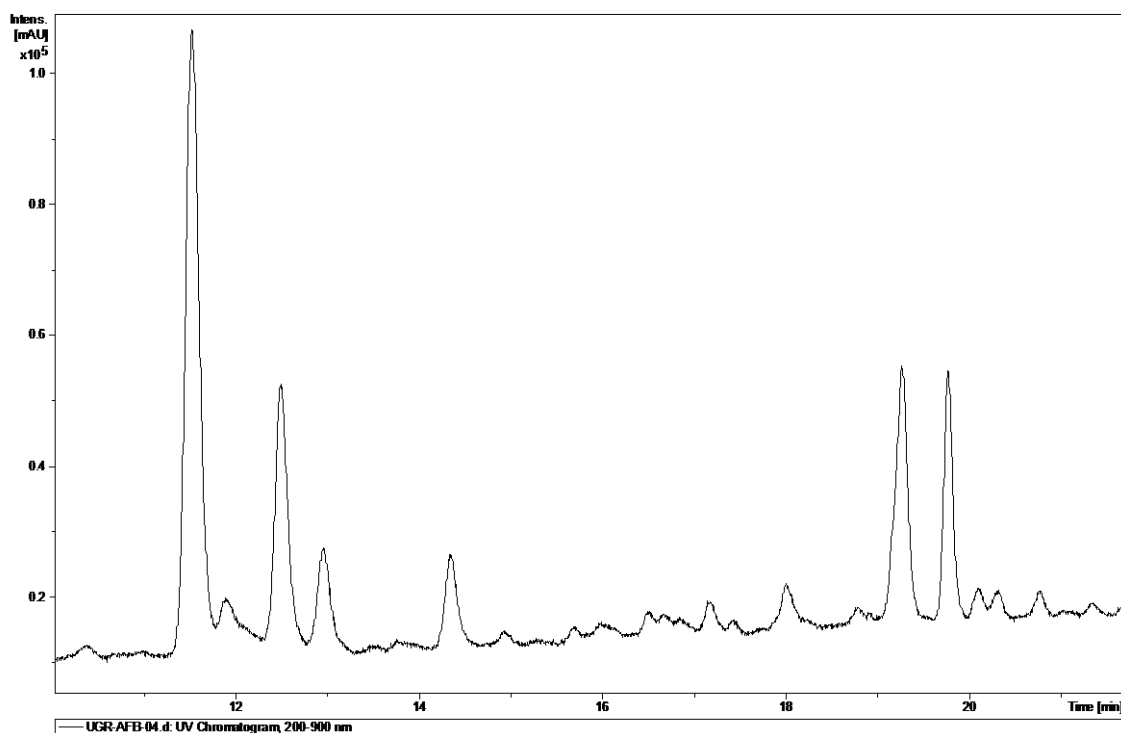


Figura 33. Cromatograma de la fracción ácida del sexo (+) de cultivos a dos días.

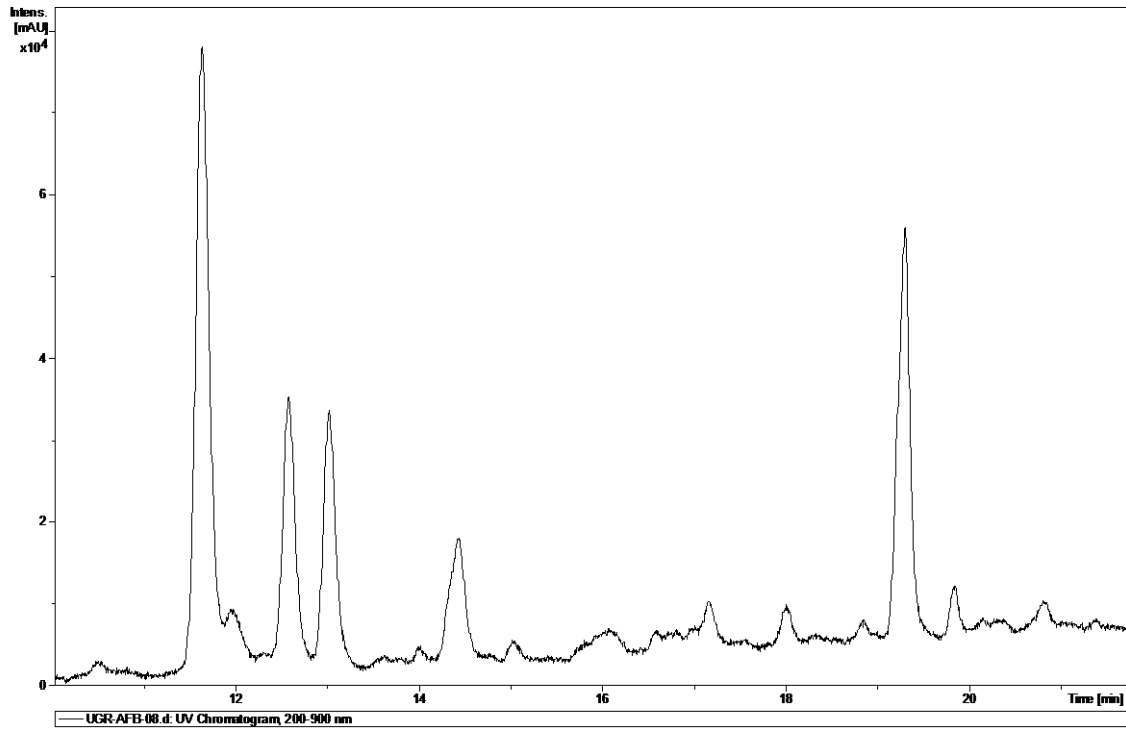


Figura 34. Cromatograma de la fracción ácida del sexo (-) de cultivos a dos días.

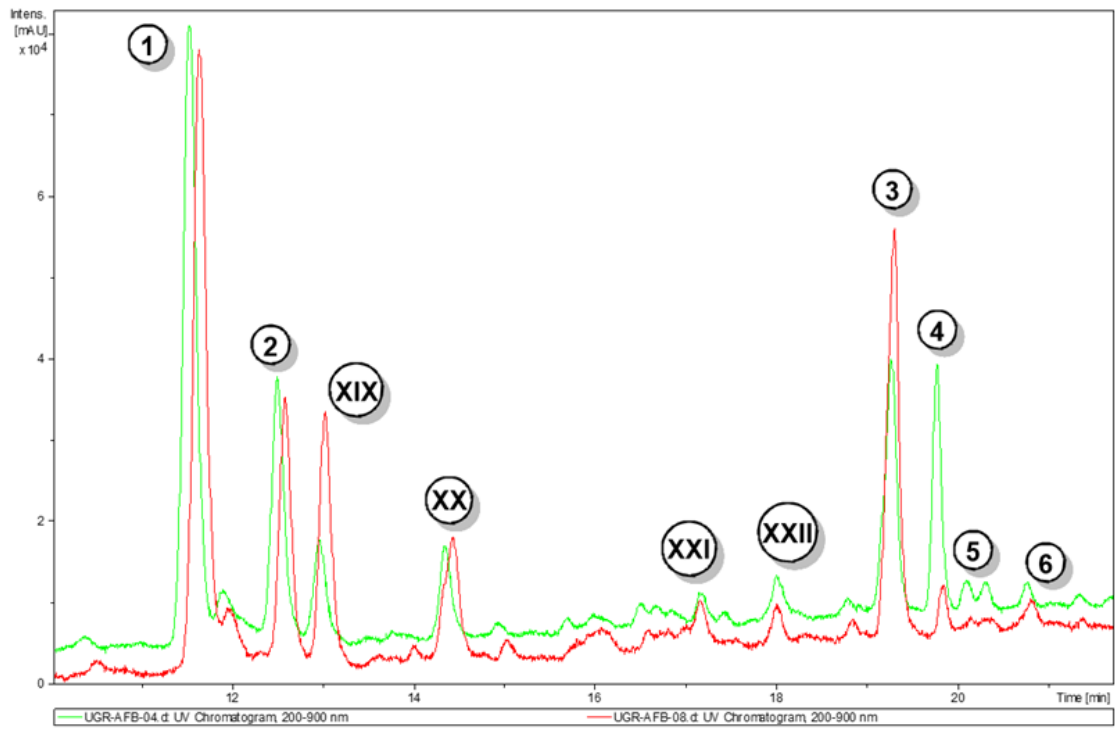
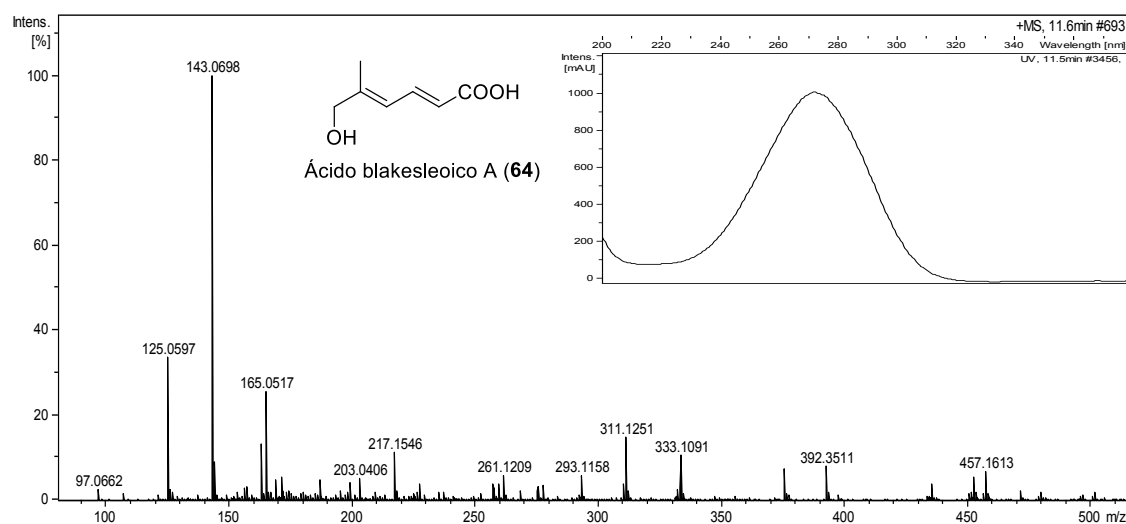


Figura 35. Cromatograma comparativo de las fracciones ácidas del sexo (+) y (-) de cultivos a dos días.

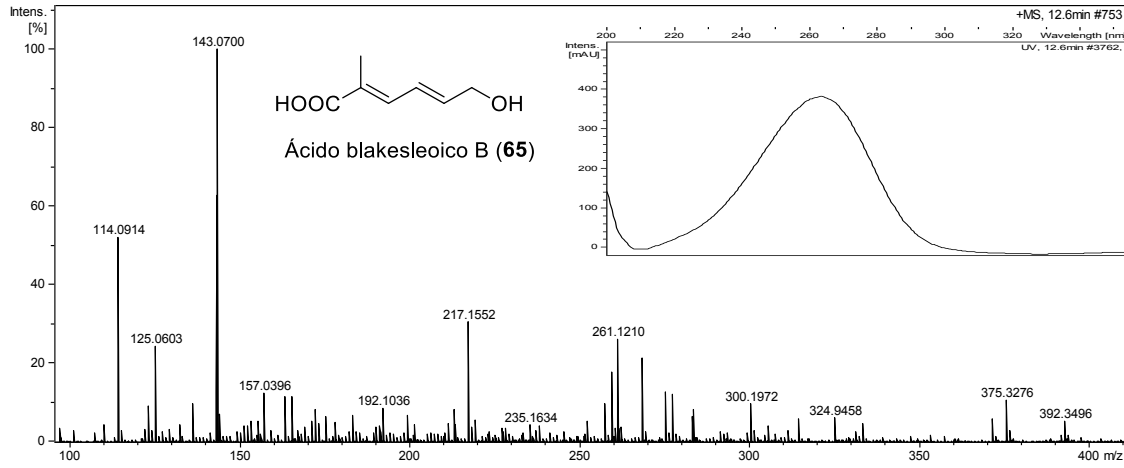
Pico 1:

El tiempo de retención es de 11.6 minutos como consecuencia de la mayor polaridad debida al grupo carboxílico frente a los componentes neutros estudiados en las fracciones anteriores. El pico más intenso aparece a m/z 143.0698 [M + H] (teórico: m/z 143.0703) y por lo tanto, su fórmula corresponde a $C_7H_{11}O_3$. También se ven picos correspondientes a la pérdida de agua a m/z 125.0597 [M + H - H₂O] (teórico: m/z 125.0597) y a un aducto con sodio a m/z 165.0517 [M + Na] (teórico: m/z 165.0522). El máximo de absorbancia en el UV es de 272 nm. Se identifica como ácido blakesleico A (**64**).



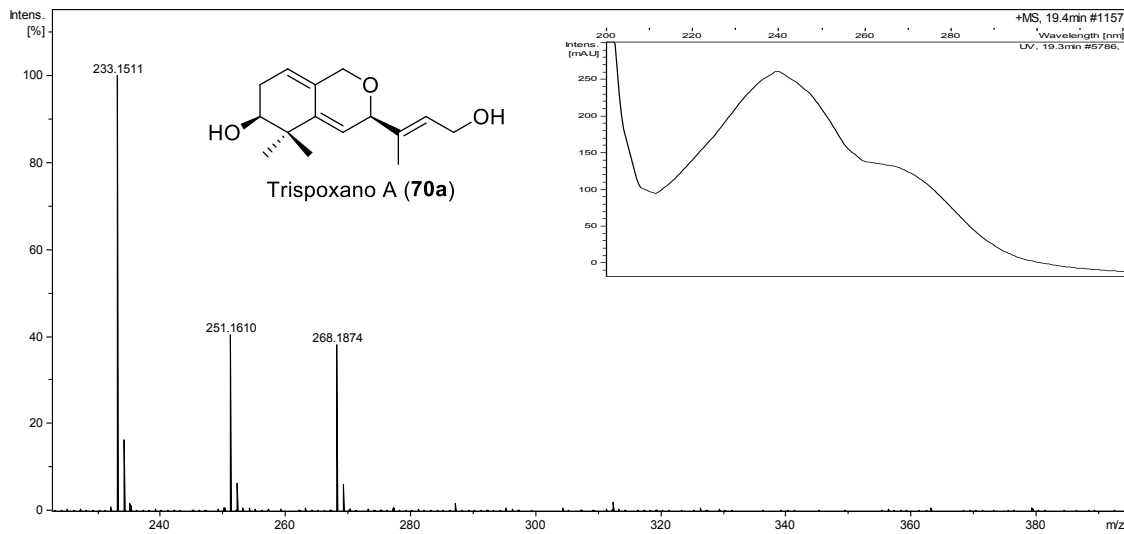
Pico 2:

El pico más intenso es m/z 143.0700 [M + H] (teórico: m/z 143.0703) y por lo tanto, su fórmula corresponde a $C_7H_{11}O_3$. Además se observa la pérdida de agua a m/z 125.0603 [M + H - H₂O] (teórico: m/z 125.0597). El máximo de absorbancia en el UV es de 264 nm y con el tiempo de retención de 12.6 minutos, se identifica como ácido blakesleico B (**65**), regioisómero de **64**.



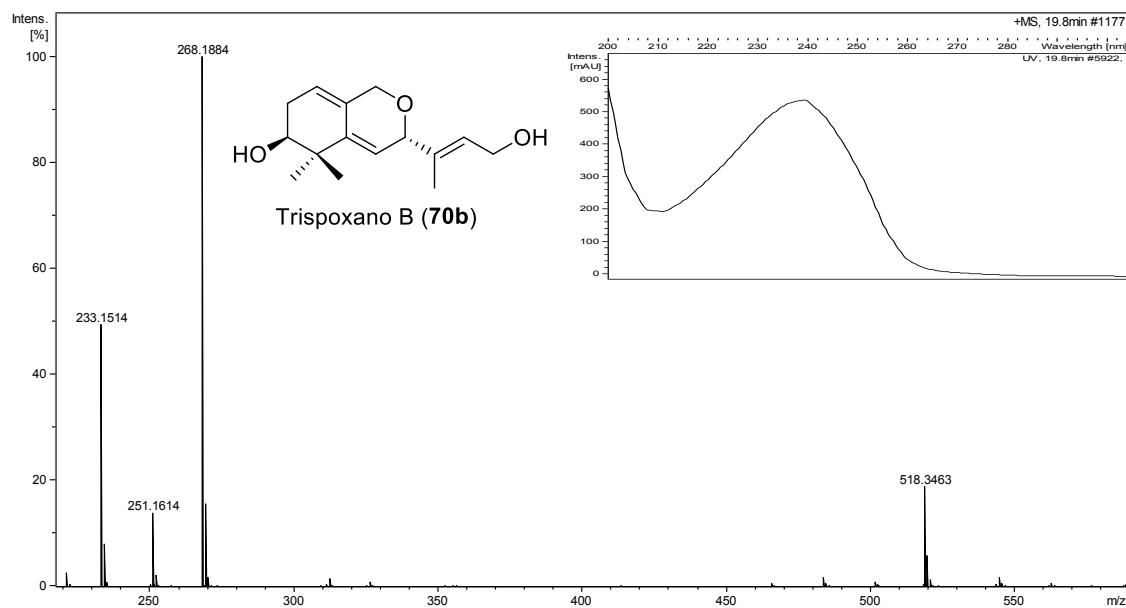
Pico 3:

Los datos permiten identificarlo como el trisoxano A (70a).



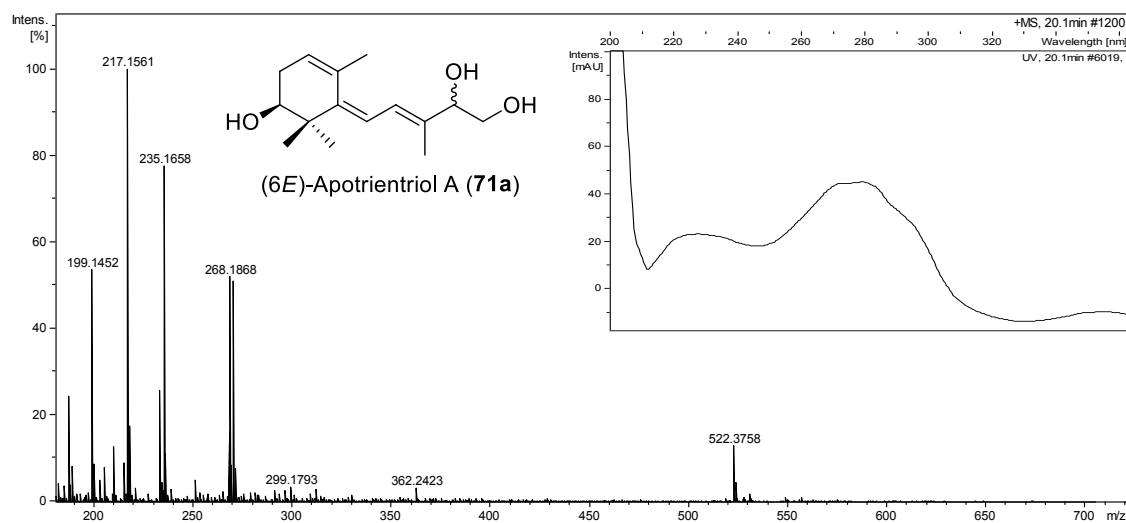
Pico 4:

En este caso se trata de trisoxano B (70b).



Pico 5:

Se identifica como apotrientriol A (71a).



Pico 6:

Se trata de apotrientriol B (71b).

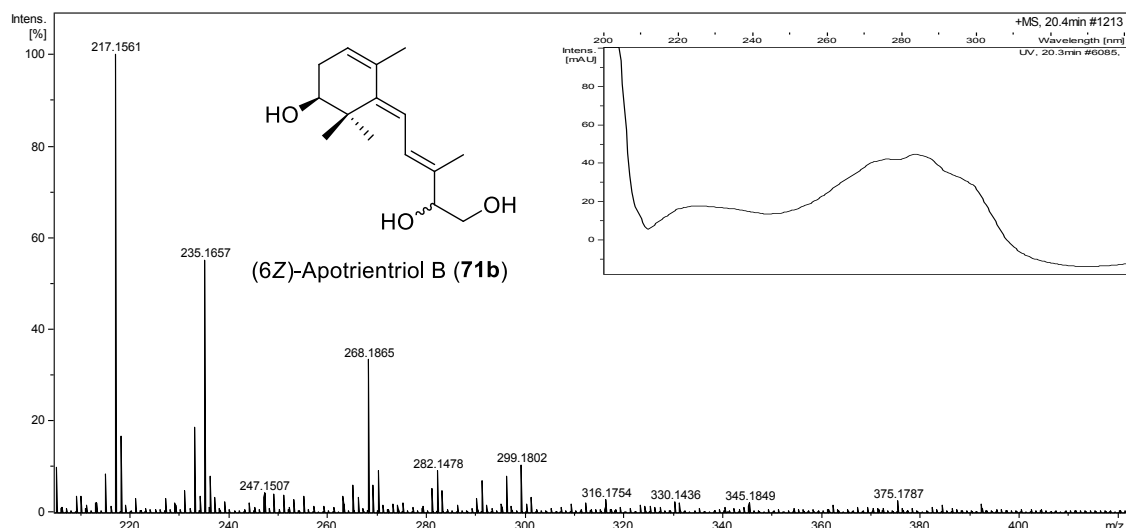
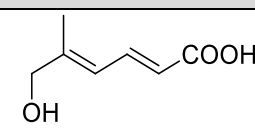
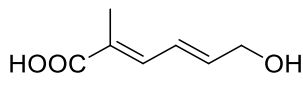
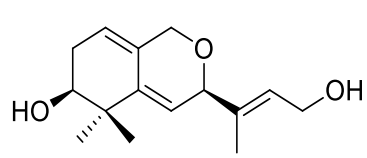
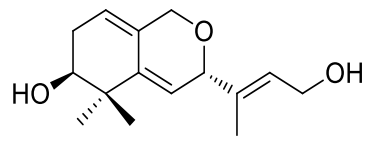
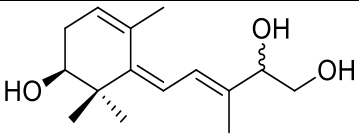
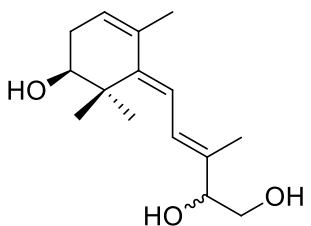
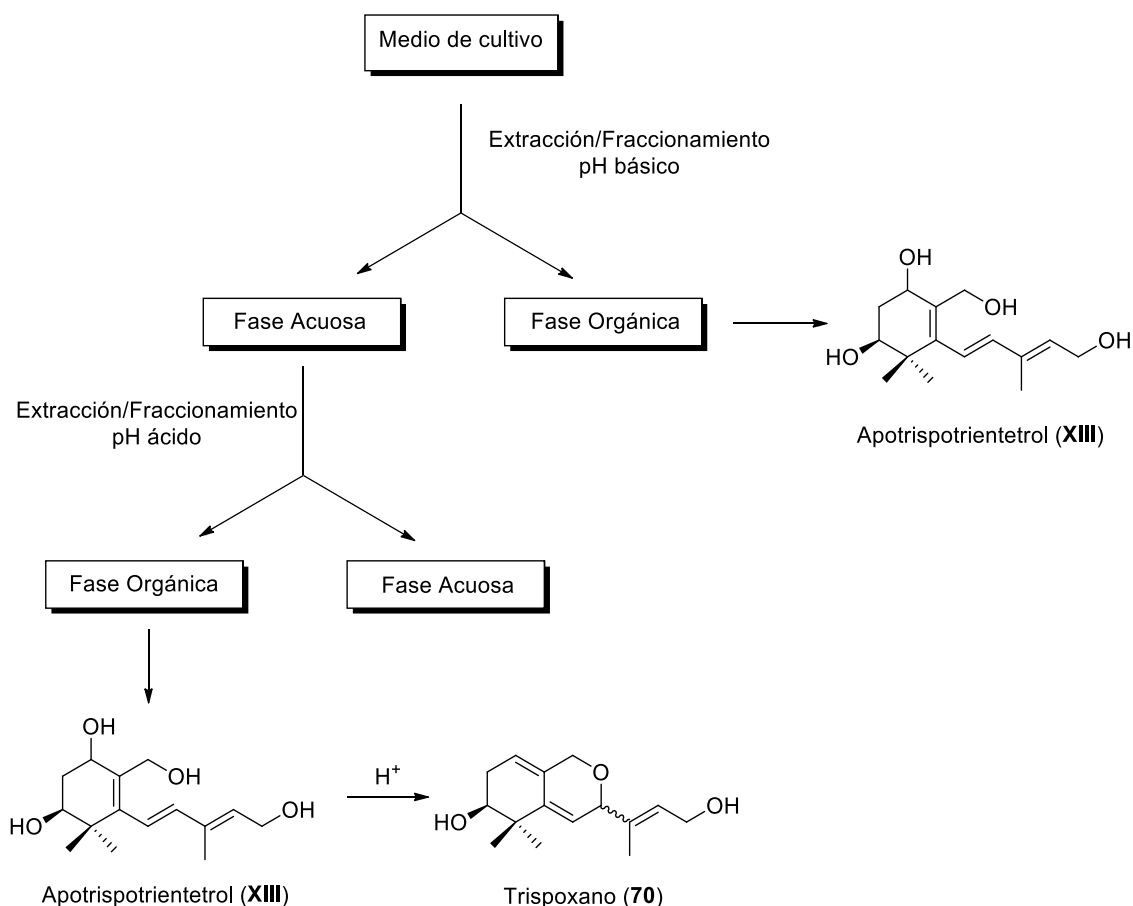


Tabla 12. Datos de los picos identificados en el HPLC–HRMS de la fracción ácida de cultivos individuales a dos días.

	Fórmula molecular	Tiempo de retención (min)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Picos m/z	Posible estructura
1	$C_7H_{11}O_3$	11.6	272	143.0698	 Ácido blakesleico A (64)
2	$C_7H_{11}O_3$	12.6	264	143.0700	 Ácido blakesleico B (65)
3	$C_{15}H_{22}O_3$	19.3	240	233.1511	 Trispoxano A (70a)
4	$C_{15}H_{22}O_3$	19.8	239	268.1884	 Trispoxano B (70b)

5	C ₁₅ H ₂₄ O ₃	20.1	280	217.1561	 (6E)-Apotrientriol A (71a)
6	C ₁₅ H ₂₄ O ₃	20.4	283	217.1561	 (6Z)-Apotrientriol B (71b)

En el resumen de la Tabla 12, se muestra como en los picos 1 y 2 aparecen los apocarotenoides C7 mayoritario (**64**) y minoritario (**65**). Hacia el final del cromatograma, aparecen los picos 3 y 4 que corresponderían con trispoxano A (**70a**) y su epímero, trispoxano B (**70b**). Y para terminar, en los picos 5 y 6 estarían los apotrientrioles A y B (**71a** y **71b**). En este caso, no se han podido identificar los precursores de estos últimos cuatro compuestos (apotrispotrientetrol **XIII** y apotrientriol C **74**) como en la fracción neutra anterior. La razón de que estos compuestos aparezcan en la fracción ácida, puede ser debida al método usado para el fraccionamiento. En esta Memoria se ha propuesto que el apocarotenoide heterocíclico C15 (**70**) es biosintetizado a partir de un precursor apotrispotrientetrol intermedio **XIII** que podría estar como tal en el medio de cultivo (Esquema 42). Cuando se llevan a cabo los procesos de extracción y fraccionamiento, al ser el tetrol muy polar, la extracción con acetato de etilo a pH básico de las sustancias neutras podría dejar al tetrol en la fase acuosa. Sin embargo al cambiar el pH a ácido para liberar los ácidos carboxílicos el ácido podría catalizar la transformación de apotrispotrientetrol en el heterociclo **70** (Esquema 42) que se extraería entonces dentro de la fracción ácida.



Esquema 51. Procedimiento de extracción/fraccionamiento de apocarotenoides y la posible formación de trisproxano (70) en fracciones ácidas.

El proceso de ciclación puede originar dos estereoisómeros según sea el ataque del $-OH$ sobre las caras proquirales de la olefina. Finalmente, en los picos 5 y 6 aparecen los apotrientrioles A y B aislados, identificados y sintetizados en este Trabajo. Basándonos en la misma hipótesis que con los compuestos heterocíclicos, la biosíntesis de los apotrientrioles A y B (71a y 71b) se daría lugar a partir del apotrientriol (74) en presencia del ácido del medio, originando de igual forma a dos isómeros, según el ataque del $-OH$ sobre C-10 (Esquema 44).

c. Estudio de apocarotenoides en fracciones neutras liofilizadas y no liofilizadas de cultivos mixtos a cinco días:

Se estudia a continuación si el procedimiento analítico descrito anteriormente, permite distinguir cambios en la composición de los extractos de cultivos mixtos de estirpes de *Phycomyces blakesleeanus* idénticas a las anteriores, si se someten los medios de cultivo a una liofilización previa al fraccionamiento.

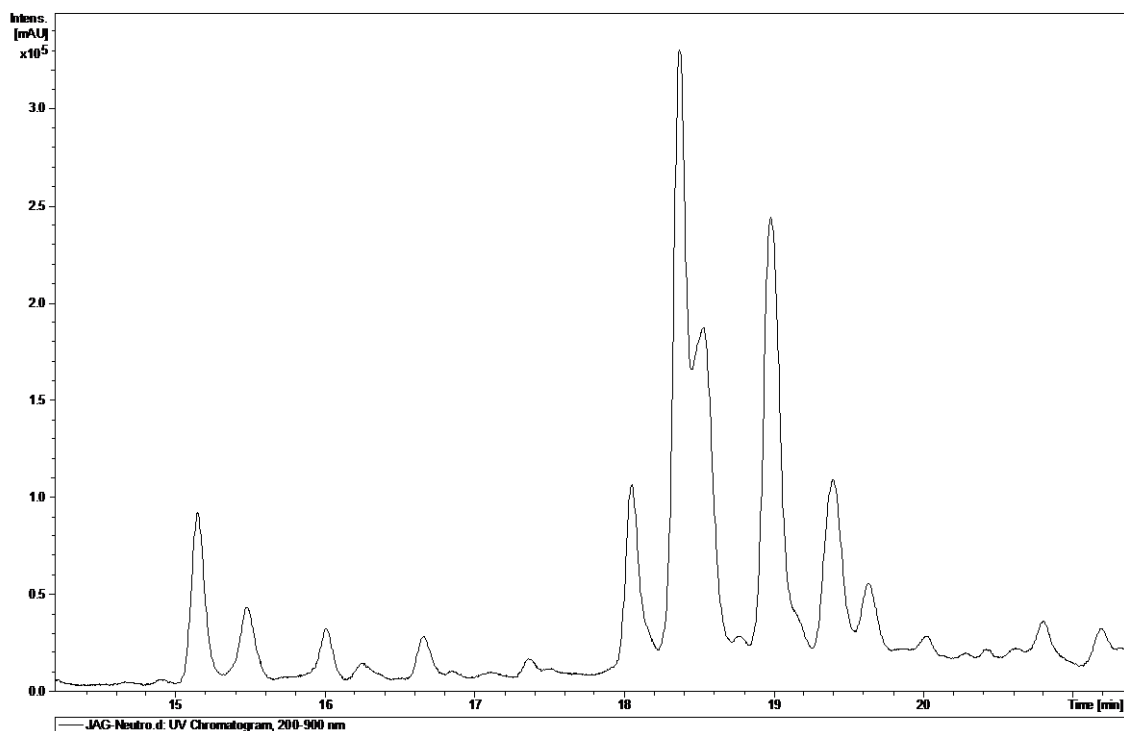


Figura 36. Cromatograma de la fracción neutra sin liofilizar.

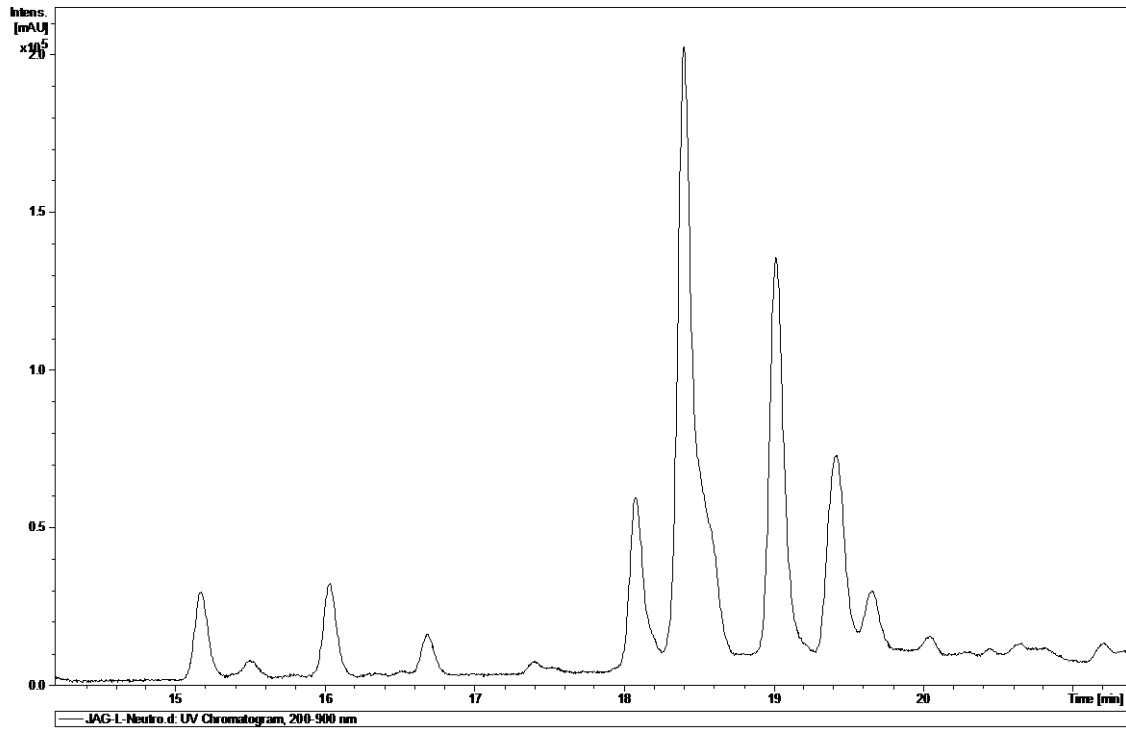


Figura 37. Cromatograma de la fracción neutra liofilizada.

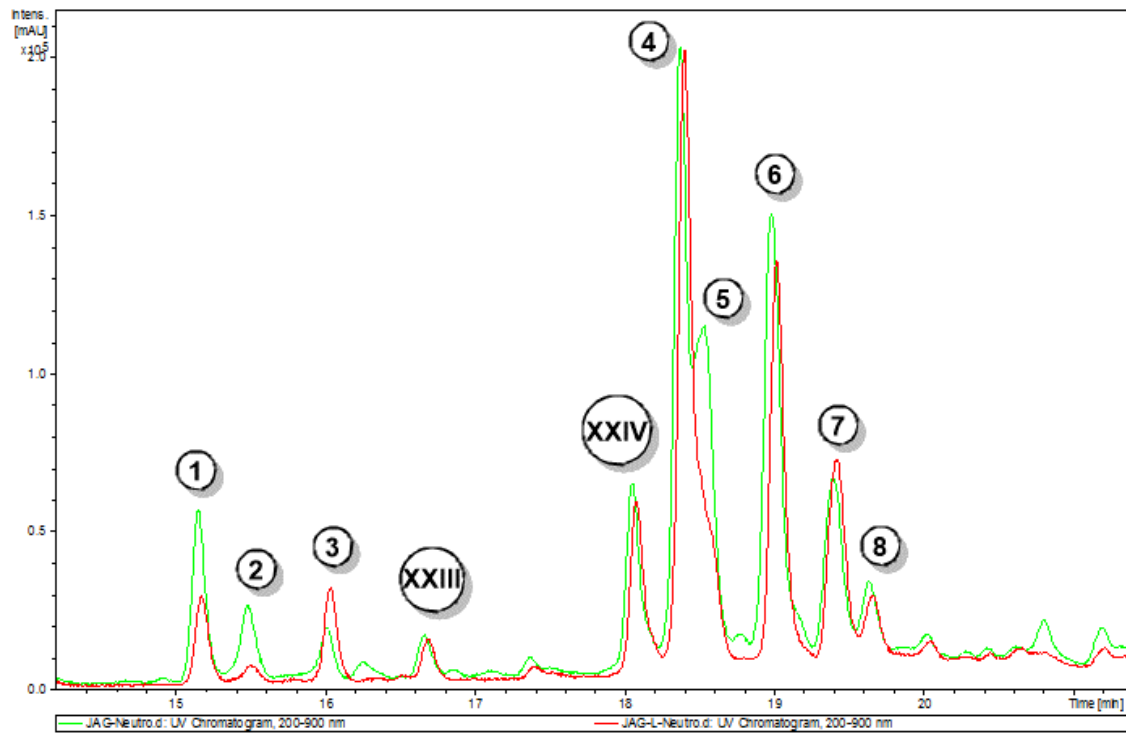
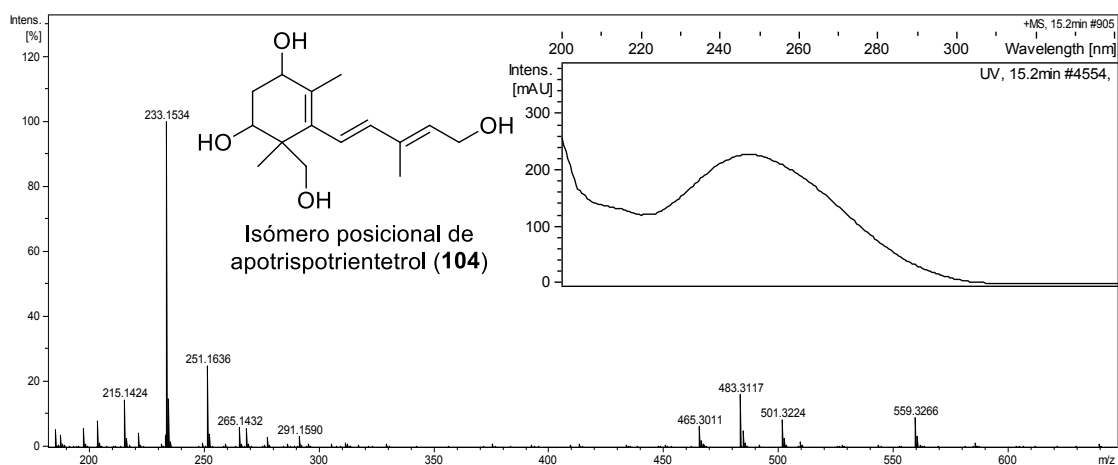


Figura 38. Cromatogramas superpuestos de los dos tipos de muestras neutras.

Se comparan entonces los cromatogramas de las fracciones neutras sin liofilizar, liofilizada y una comparativa entre ambas. Tal y como se observa en las Figuras 30–32, los perfiles de ambas muestras son similares aunque se observan diferencias. El perfil de la muestra liofilizada es más sencillo, tiene menos picos que el otro, además se observan cambios en la zona de los metabolitos más polares al comienzo del cromatograma y en la proporción relativa entre los Picos 4 y 5. En la Tabla 13 se muestran las fórmulas moleculares deducidas y de acuerdo con los tiempos de retención y los datos de patrones, las posibles estructuras.

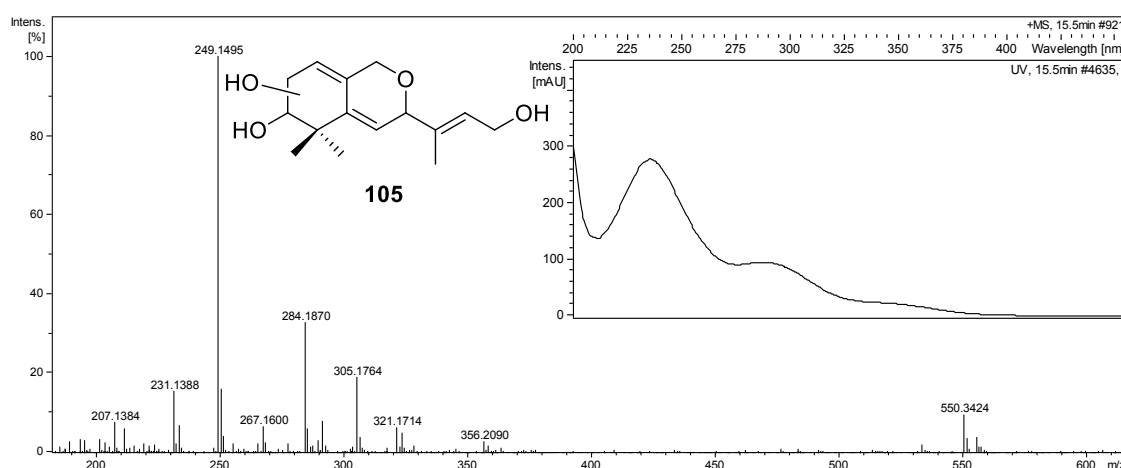
Pico 1:

El tiempo de retención a 15.2 minutos está en zona de 4 oxígenos. Su espectro de masas presenta $[M + H]$ a m/z 269.1974 (teórico: m/z 269.1980) muy pequeño y pérdida de agua $[M + H - H_2O]$ a m/z = 251.1632 (teórico: m/z 251.1642) concordantes con una fórmula molecular $C_{15}H_{25}O_4$. Otros fragmentos a m/z = 233.1534 (teórico: m/z 233.1536) y m/z 215.1424 (teórico: m/z 215.1430) son atribuibles a pérdidas sucesivas de agua. Estos datos junto con λ_{max} = 248 nm en el UV, permiten identificar este pico con la estructura de un apotrispotrientetrol isómero de **XIII (104)**. Dada la mayor polaridad de este se podría proponer la ubicación del nuevo –OH sobre uno de los metilos en C–4.

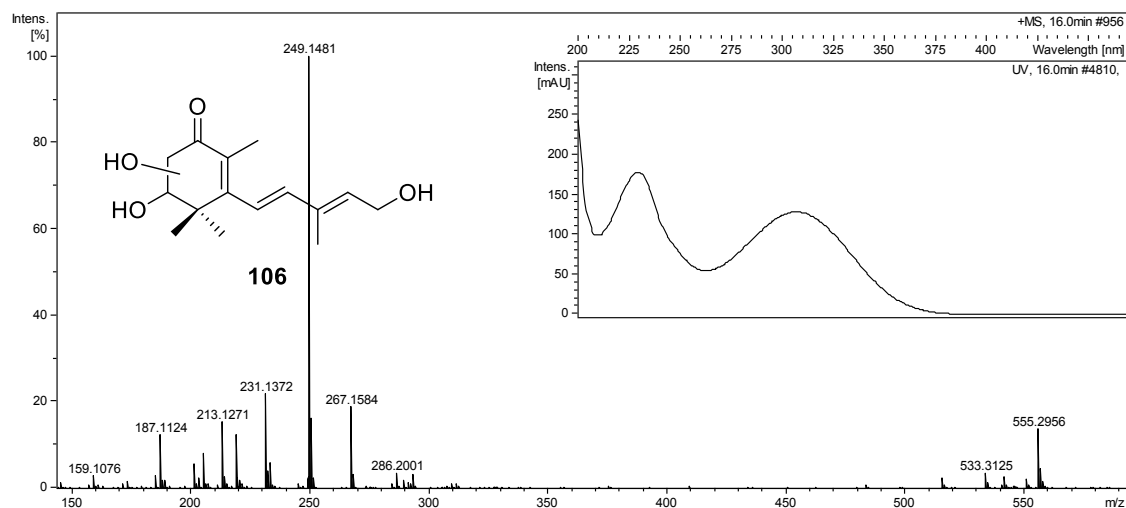


Pico 2:

El tiempo de retención a 15.5 minutos determina la presencia de 4 oxígenos. Su espectro de masas presenta un pico a $m/z = 267.1600$ [M + H] (teórico: m/z 267.1591) concordante con una fórmula molecular $C_{15}H_{23}O_4$, con fragmentos a $m/z = 249.1495$ [M + H - H₂O] (teórico: m/z 249.1485) y m/z 231.1388 [M + H - 2H₂O] (teórico: m/z 231.1379) atribuibles a pérdidas sucesivas de agua. Otro fragmento importante aparece a $m/z = 284.1870$ (teórico: m/z 284.1856) correspondiente al aducto con amonio. Estos datos junto con un $\lambda_{max} = 236$ nm en el UV permiten identificar este pico como el apocarotenoide **105**.

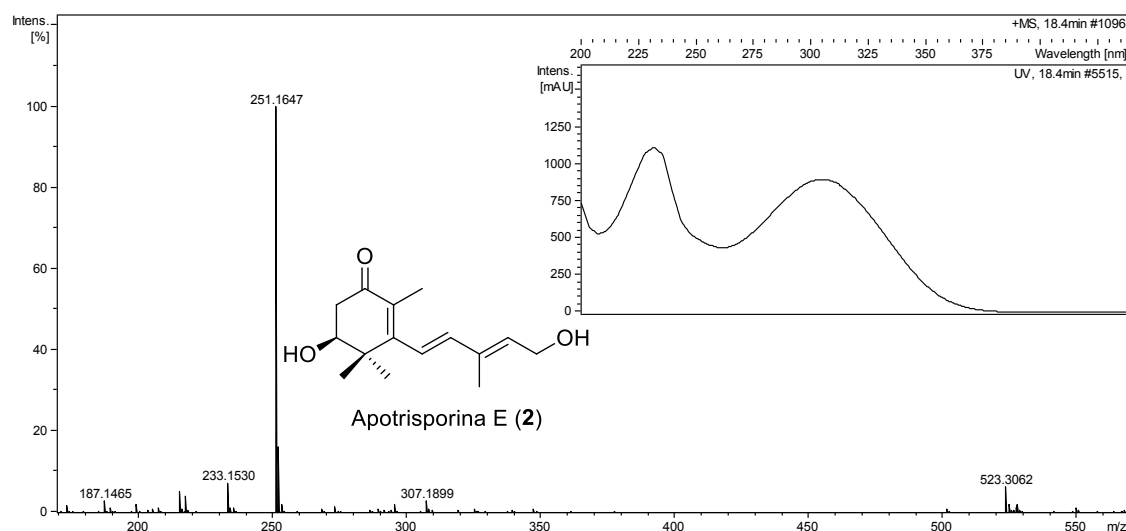
**Pico 3:**

El tiempo de retención a 16.0 minutos sigue siendo característico de 4 oxígenos. Su espectro de masas presenta un pico a $m/z = 267.1584$ [M + H] (teórico: m/z 267.1591) concordante con una fórmula molecular $C_{15}H_{23}O_4$, con fragmentos a $m/z = 249.1481$ [M + H - H₂O] (teórico: m/z 249.1485) y m/z 231.1372 [M + H - 2H₂O] (teórico: m/z 231.1379) atribuibles a pérdidas sucesivas de agua. Estos datos junto con un $\lambda_{max} = 230$ y 307 nm en el UV permiten identificar este pico como el apocarotenoide **106**.



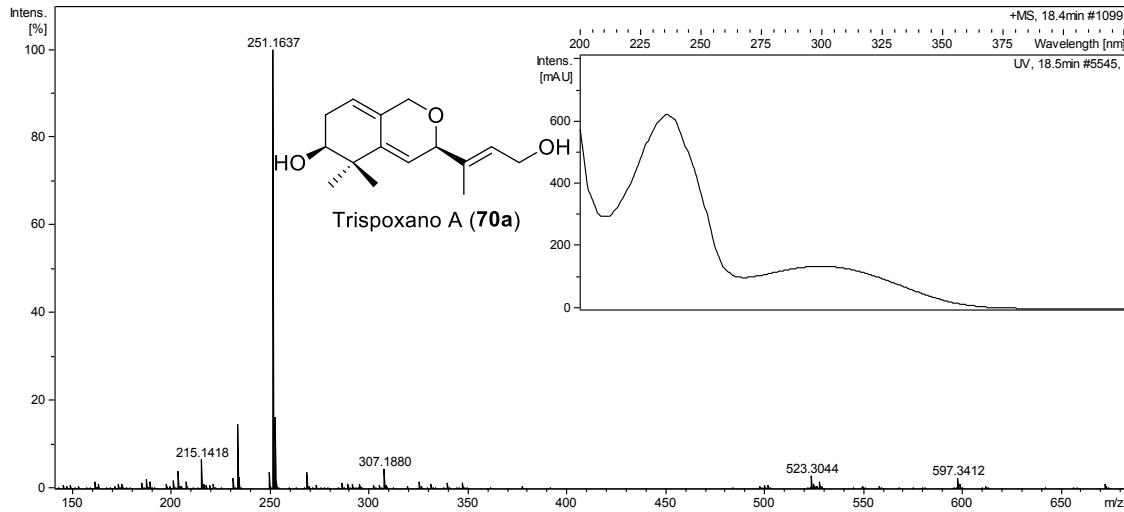
Pico 4:

El tiempo de retención a 18.4 minutos ya está en zona de tres oxígenos. Su espectro de masas presenta un pico a $m/z = 251.1647$ $[M + H]$ (teórico: m/z 251.1642) concordante con una fórmula molecular $C_{15}H_{25}O_3$, con fragmentos a $m/z = 233.1532$ $[M + H - H_2O]$ (teórico: m/z 233.1536) y m/z 215.1426 $[M + H - 2H_2O]$ (teórico: m/z 215.1430) atribuibles a pérdidas sucesivas de agua. Otro fragmento importante aparece a $m/z = 268.1902$ $[M + NH_4]$ (teórico: m/z 268.1907) correspondiente al aducto con amonio. Estos datos junto con un $\lambda_{max} = 232$ y 304 nm en el UV permiten identificar este pico como apotrisporina E (2).



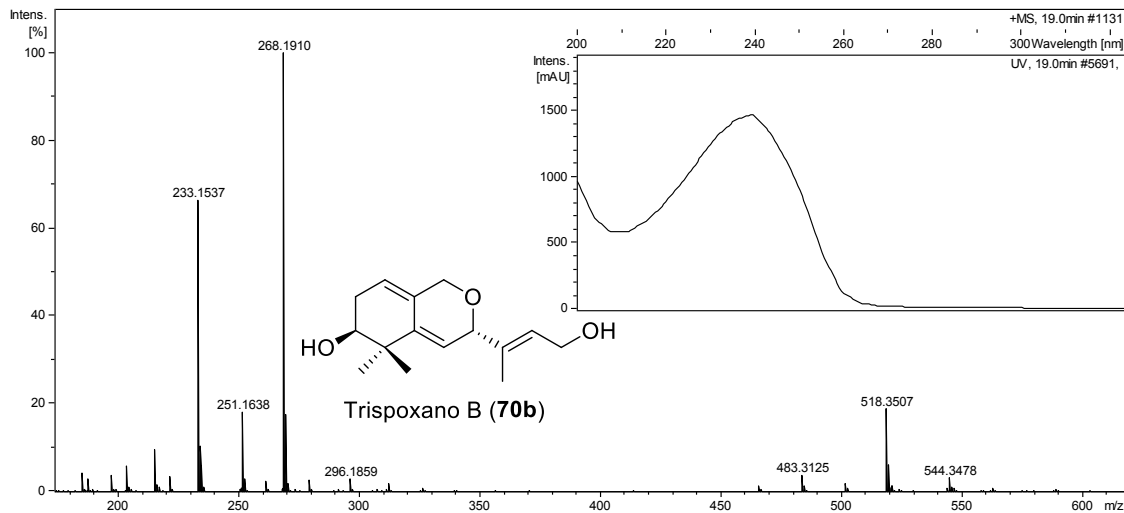
Pico 5:

Por comparación con datos anteriores se identifica como el apocarotenoide heterocíclico trispoxano A (**70a**).



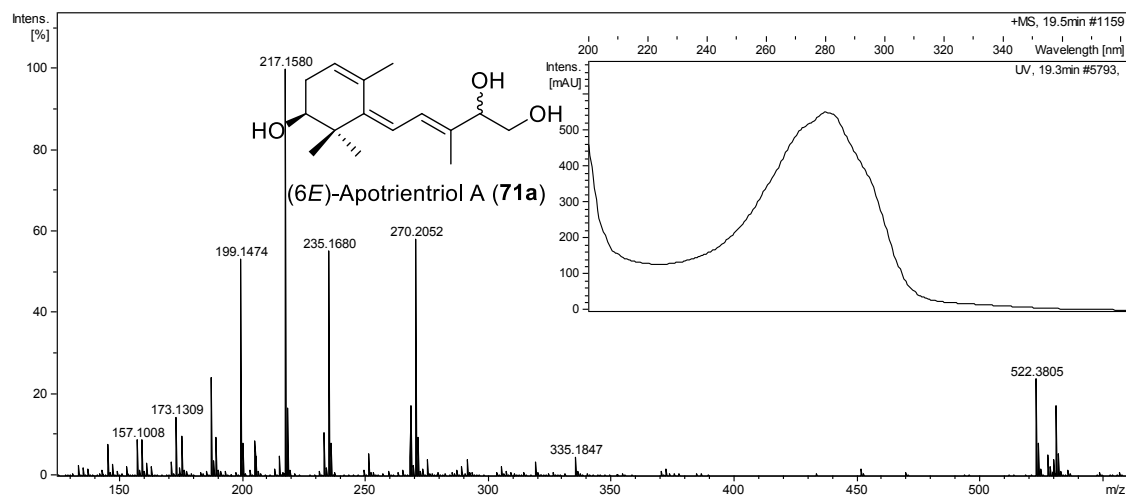
Pico 6:

Por comparación con datos anteriores se identifica como el apocarotenoide heterocíclico trispoxano B (**70b**), epímero de **70a**.



Pico 7:

Por comparación con datos anteriores se identifica como el apocarotenoide apotrientriol A (**71a**).



Pico 8:

Por comparación con datos anteriores se identifica como el apocarotenoide apotrientriol B (**71b**).

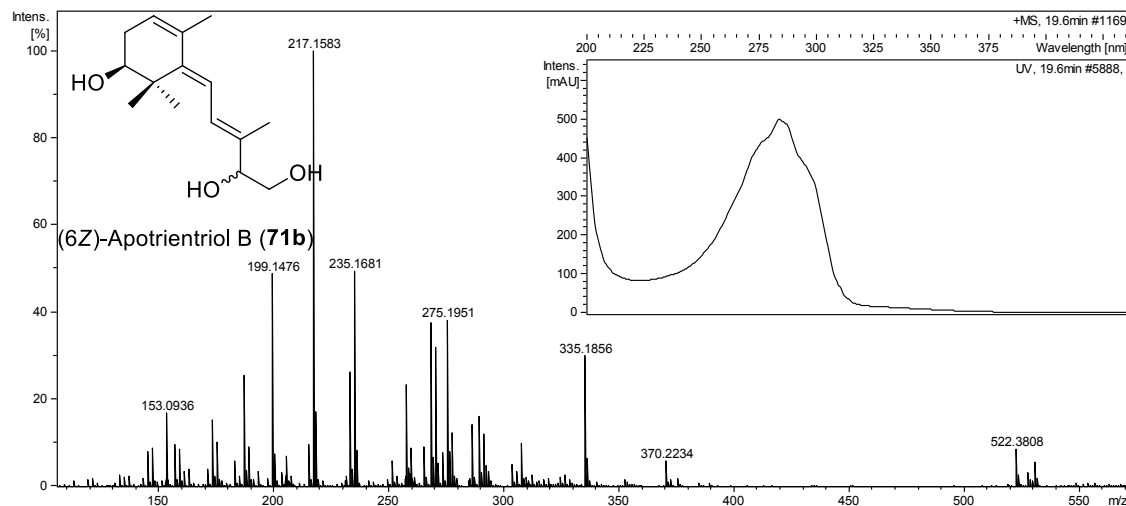
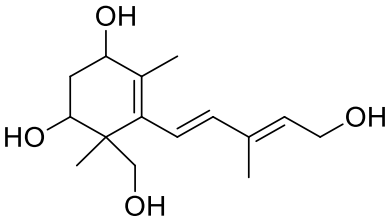
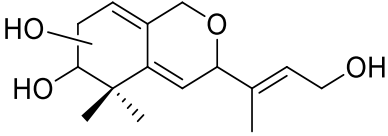
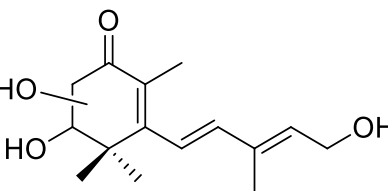
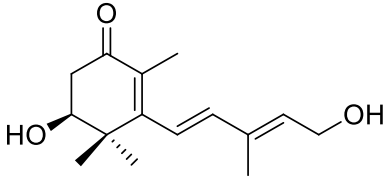
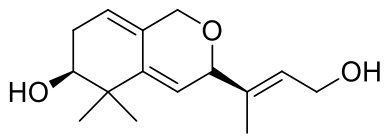
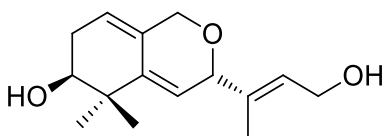
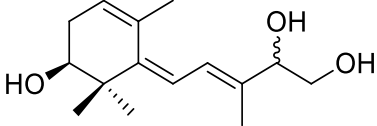
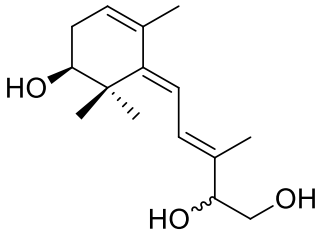


Tabla 13. Datos de los picos identificados en el HPLC–HRMS de las fracciones neutras liofilizadas y no liofilizadas de cultivos mixtos a cinco días.

	Fórmula molecular	Tiempo de retención (min)	λ_{\max} (nm)	Picos m/z	Posible estructura
1	C ₁₅ H ₂₄ O ₃	15.2	248	233.1534	 <p>Isómero posicional de apotrispotrientetrol (104)</p>
2	C ₁₅ H ₂₂ O ₃	15.5	280	249.1495	 <p>105</p>
3	C ₁₅ H ₂₂ O ₃	16.0	230 310	249.1481	 <p>106</p>
4	C ₁₅ H ₂₂ O ₃	16.7	232 304	251.1647	 <p>Apotrisporina E (2)</p>
5	C ₁₅ H ₂₂ O ₃	18.5	239	251.1637	 <p>Trispoxano A (70a)</p>
6	C ₁₅ H ₂₂ O ₃	19.0	240	268.1910	 <p>Trispoxano B (70b)</p>

7	$C_{15}H_{24}O_3$	19.5	280	217.1580	
(6E)-Apotrientriol A (71a)					
8	$C_{15}H_{24}O_3$	19.6	280	217.1583	
(6Z)-Apotrientriol B (71b)					

En estos cultivos mixtos a cinco días, se han identificado prácticamente los mismos metabolitos que en las fracciones neutras de cultivos a dos días, con las excepciones de la apotrisporina E (**2**) y su hidroxiderivado (picos 3-4). Además es de destacar, la ausencia de apotrientriol C (**74**). Presumiblemente, éste último ha debido de sufrir una oxidación enzimática en C-4 para así formar los metabolitos identificados en los picos 3 y 4, por otra parte se ha transformado en el medio de cultivo debido al mayor tiempo (5 días) en los apotrientrioles A y B (**71a y 71b**).

d. Estudio de trisporoides en fracciones ácidas liofilizadas y no liofilizadas de cultivos mixtos a cinco días:

En los cromatogramas de los cultivos mixtos a cinco días de las fracciones ácidas liofilizadas y no liofilizadas, cualitativamente son prácticamente iguales, la disparidad aparece cuando se analizan cuantitativamente. Por una parte, en la muestra liofilizada existen más cantidad de metabolitos correspondientes a los picos **XXV**, **XXVI**, 5 y 7; sin embargo, esa misma muestra es menos abundante en los metabolitos de los picos 6 y 8.

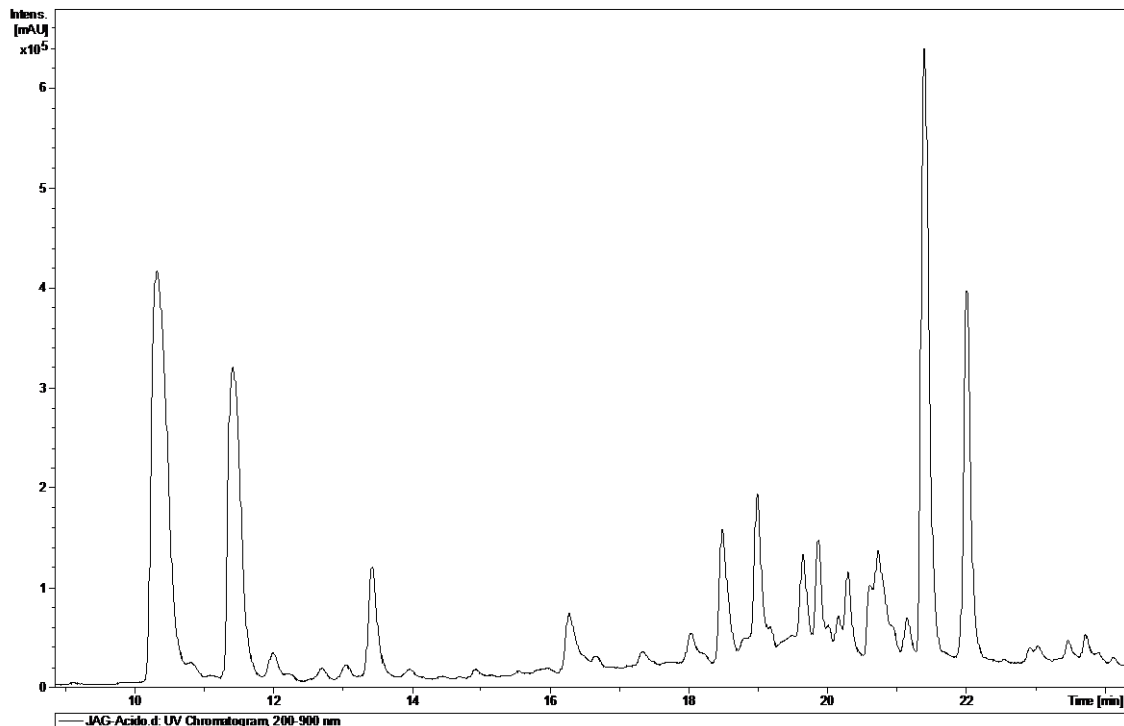


Figura 39. Cromatograma de la fracción ácida liofilizada.

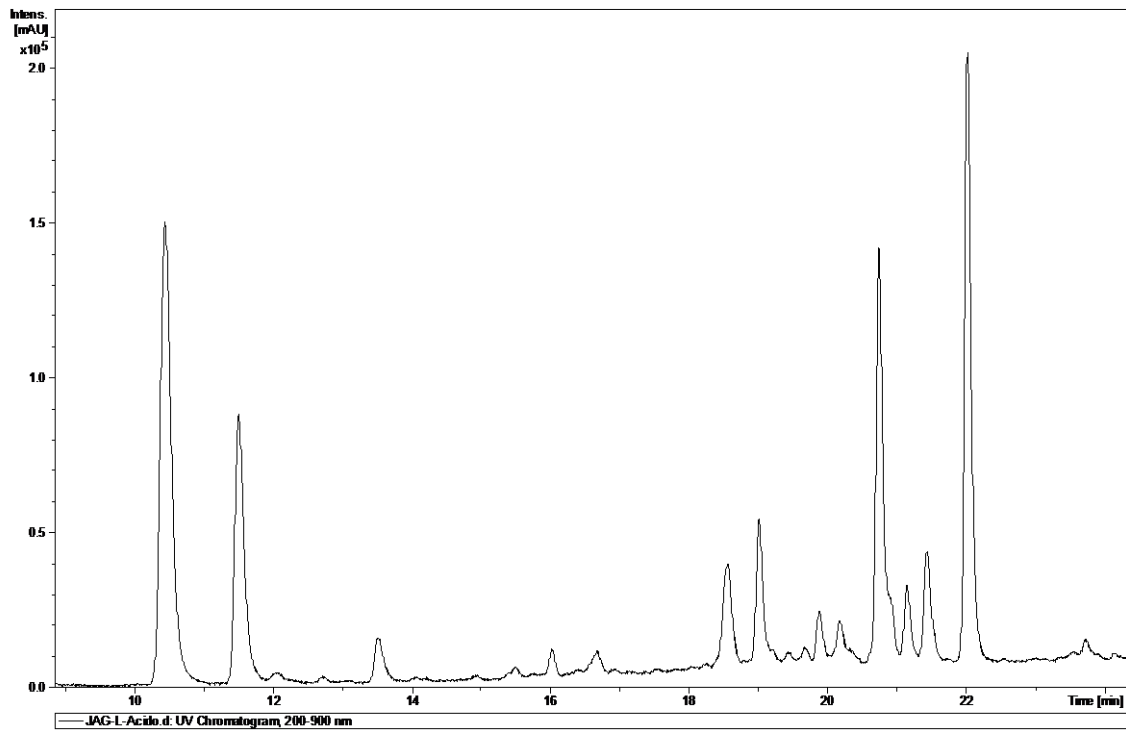


Figura 40. Cromatograma de la fracción ácida sin liofilizar.

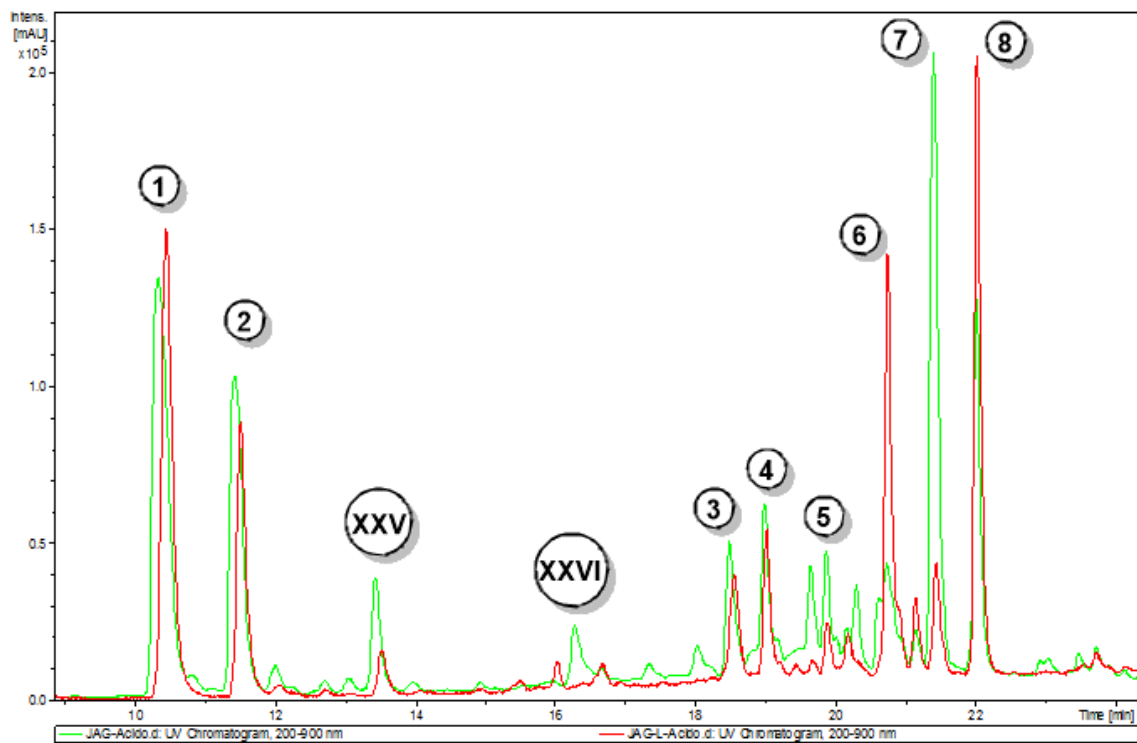
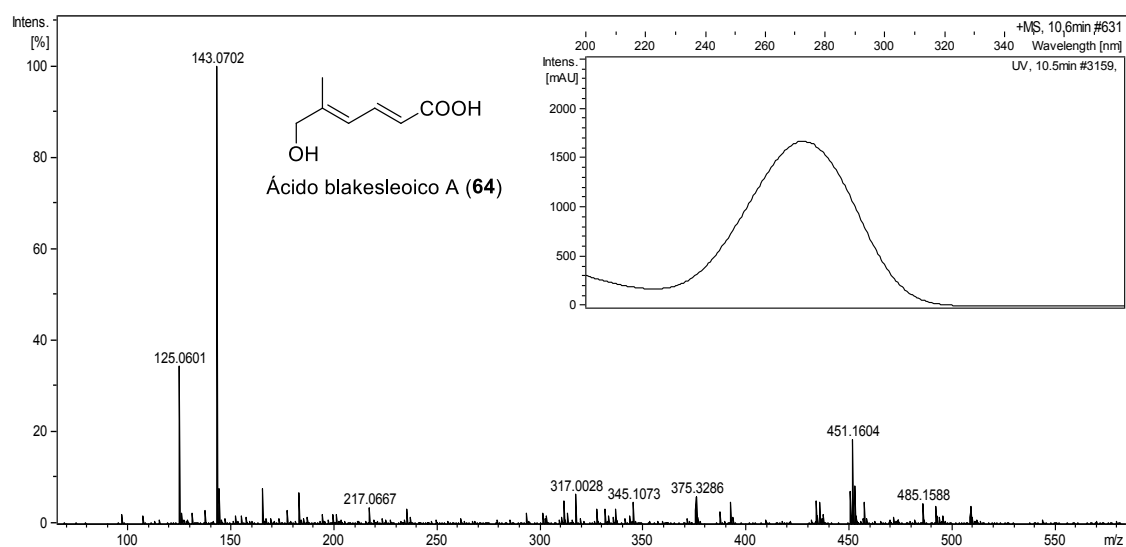


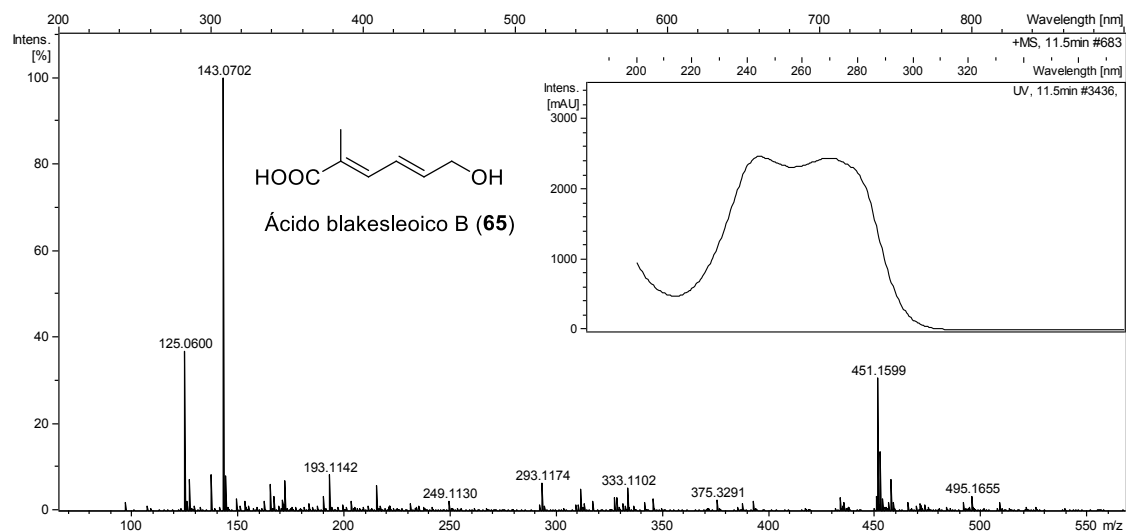
Figura 41. Cromatogramas superpuestos de los dos tipos de muestras ácidas.

Pico 1:

Su espectro de masas presenta un pico a $m/z = 143.0702$ [M + H] (teórico: m/z 143.0703) concordante con una fórmula molecular $C_7H_{11}O_3$, y un fragmento a $m/z = 125.0601$ [M + H - H₂O] (teórico: m/z 125.0597) correspondiente a pérdida de agua. Estos datos junto con un tiempo de retención de 10.6 minutos y $\lambda_{\max} = 272$ nm en el UV permiten identificar este pico como ácido blakesleico A (**64**).

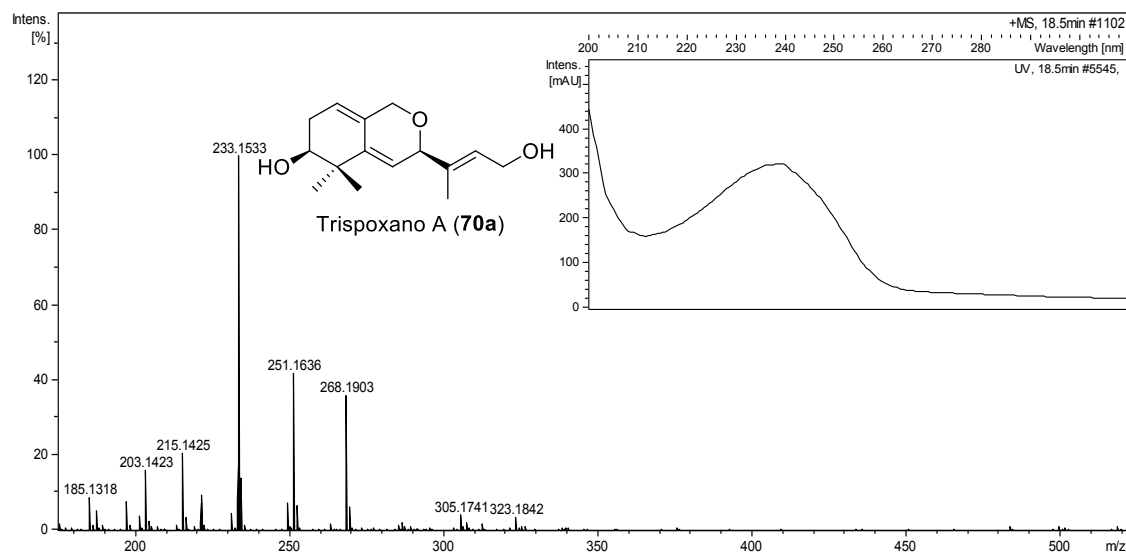
**Pico 2:**

El espectro de masas de este pico es igual al anterior, su tiempo de retención es de 11.5 minutos y $\lambda_{\max} = 264$ nm en el UV. Estos datos permiten identificar este pico como ácido blakesleico B (**65**), regioisómero de **64**.



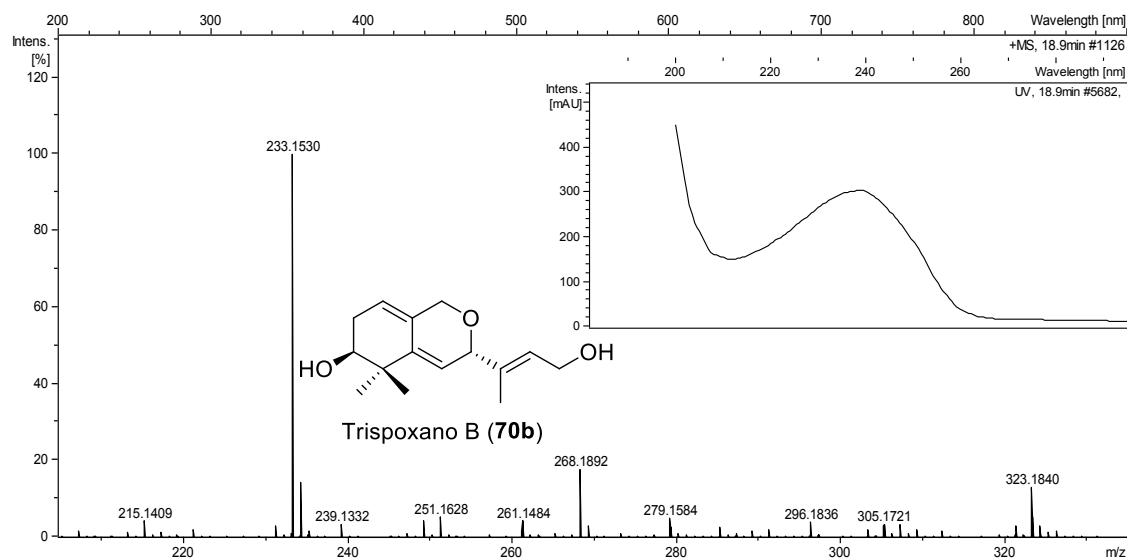
Pico 3:

Se trata del apocarotenoide heterocíclico trisoxano A (70a), al igual que aparece también en la fracción neutra.



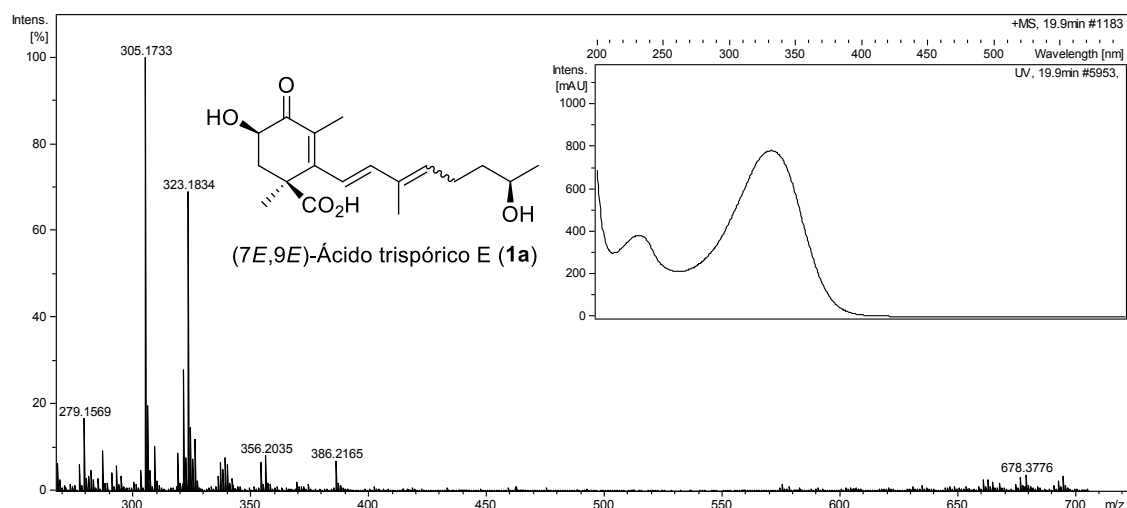
Pico 4:

Se trata del epímero del anterior, trisoxano B (70b).



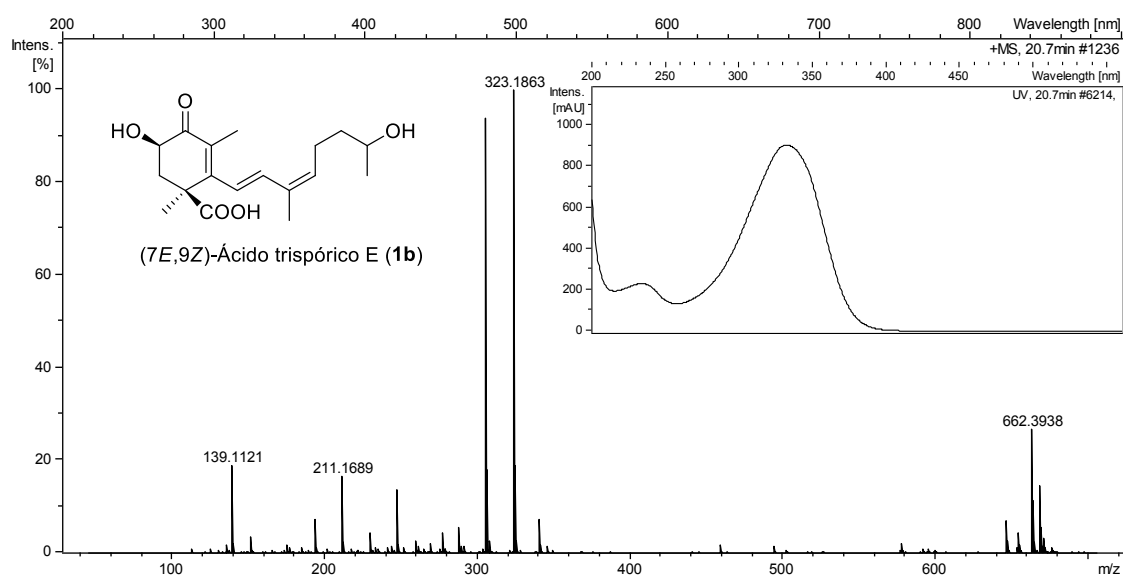
Pico 5:

En su espectro de masas se puede distinguir el pico más intenso a m/z 323.1834 [M+ H] (teórico: m/z 323.1853) concordante con una fórmula molecular C₁₈H₂₇O₅, y a m/z 305.1733 [M + H - H₂O] (teórico: m/z 305.1747) atribuible a pérdida de agua. Estos datos junto con un tiempo de retención de 19.9 minutos y λ_{max} = 234 y 332 nm en el UV permiten identificar este pico como ácido trispórico E con estereoquímica 7E,9E (1a).



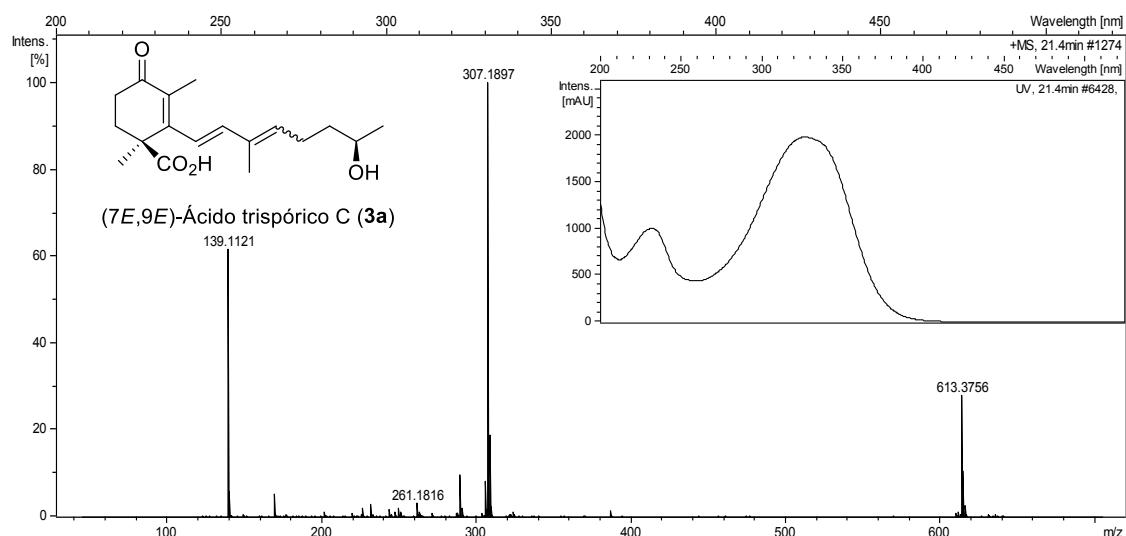
Pico 6:

Su espectro de masas presenta un pico a m/z 323.1863 [M + H] (teórico: m/z 323.1853) concordante con una fórmula molecular $C_{18}H_{27}O_5$, con un fragmento a m/z = 305.1716 [M + H - H₂O] (teórico: m/z 305.1747) atribuible a pérdida de agua. Estos datos junto con un tiempo de retención de 20.7 minutos y λ_{max} = 232 y 332 nm en el UV permiten identificar este pico como ácido trispórico E con estereoquímica 7E,9Z (**1b**).



Pico 7:

Su espectro de masas presenta un pico a m/z 307.1897 [M + H] (teórico: m/z 307.1904) concordante con una fórmula molecular $C_{18}H_{27}O_4$, con un fragmento a m/z = 289.1772 [M + H - H₂O] (teórico: m/z 289.1798) atribuible a pérdida de agua. Estos datos junto con un tiempo de retención de 21.4 minutos y λ_{max} = 232 y 332 nm en el UV permiten identificar este pico como ácido trispórico C con estereoquímica 7E,9E (**3a**).



Pico 8:

Su espectro de masas presenta un pico a m/z 307.1913 [M + H] (teórico: m/z 307.1904) concordante con una fórmula molecular $C_{18}H_{27}O_4$, con un fragmento a m/z = 289.1783 [M + H - H₂O] (teórico: m/z 289.1798) atribuible a pérdida de agua. Estos datos junto con un tiempo de retención de 22.0 minutos y λ_{max} = 235 y 332 nm en el UV permiten identificar este pico como ácido trispórico C con estereoquímica 7E,9Z (**3b**).

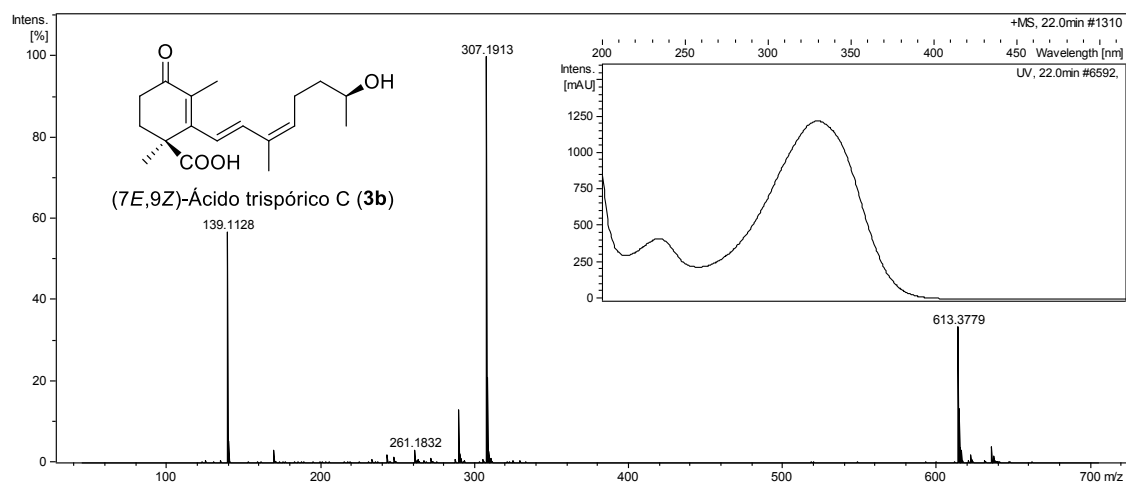
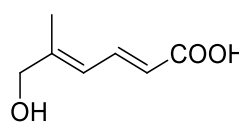
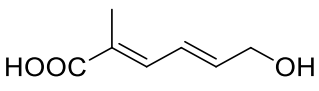
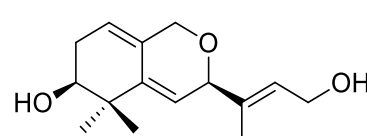
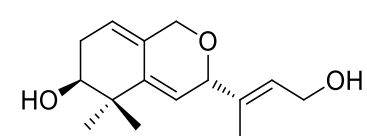
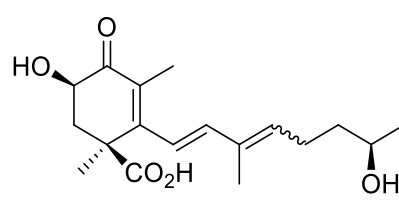
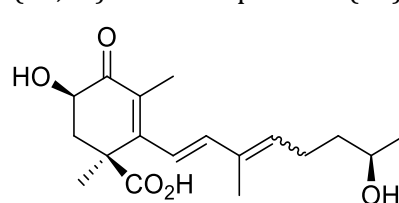
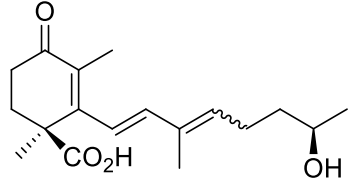
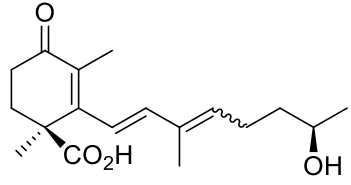


Tabla 14. Datos de los picos identificados en el HPLC–HRMS de las fracciones ácidas liofilizadas y no liofilizadas de cultivos mixtos a cinco días.

	Fórmula molecular	Tiempo de retención (min)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Picos m/z	Posible estructura
1	C ₇ H ₁₁ O ₃	10.5	272	143.0702	 <p>Ácido blakesleico A (64)</p>
2	C ₇ H ₁₁ O ₃	11.5	245 272	143.0702	 <p>Ácido blakesleico B (65)</p>
3	C ₁₅ H ₂₁ O ₂	18.5	239	233.1533	 <p>Trisporano A (70a)</p>
4	C ₁₅ H ₂₁ O ₂	18.9	239	233.1530	 <p>Trisporano B (70b)</p>
5	C ₁₈ H ₂₆ O ₅	19.9	332	305.1733	 <p>(7<i>E</i>,9<i>E</i>)-Ácido trispórico E (1a)</p>
6	C ₁₈ H ₂₇ O ₅	20.7	332	323.1863	 <p>(7<i>E</i>,9<i>Z</i>)-Ácido trispórico E (1b)</p>

7	C ₁₈ H ₂₇ O ₄	21.4	328	307.1897	 (7 <i>E</i> ,9 <i>E</i>)-Ácido trispórico C (3a)
8	C ₁₈ H ₂₇ O ₄	22.0	330	307.1913	 (7 <i>E</i> ,9 <i>Z</i>)-Ácido trispórico C (3b)

En los resultados resumidos en la Tabla 14, se muestra como en los picos 1 y 2 aparecen los apocarotenos C7, uno mayoritario que otro, tal y como se había indicado anteriormente en la identificación de estos compuestos. Los compuestos pertenecientes a los picos 3 y 4 corresponden al apocaroteno heterocíclico (**70a**) y a su epímero (**70b**). Finalmente, en los picos 5-8 aparecen los isómeros de los ácidos trispóricos E y C (**1a**, **1b**, **3a** y **3b**), respectivamente. Comparativamente se observan cambios en el contenido de los picos 5-8 correspondientes a los ácidos trispóricos E (**1a-1b**) y C (**3a-3b**). La proporción de los ácidos trispóricos E baja notablemente siguiendo un tratamiento convencional mientras que parte del ácido trispórico C **3b** (isómero 6*E*,8*Z*) se isomeriza al **3a** (isómero 6*E*,8*E*).

e. Comparación del contenido en apocarotenoides en las fracciones neutras de cultivos mixtos a dos y cinco días:

Existen diferencias muy significativas entre los cultivos mixtos a dos y cinco días de las fracciones neutras, tal y como se puede comprobar en las Figuras 42-44. Apotriental C (74) es de largo el compuesto mayoritario a los dos días; mientras que a cinco días se observan como los metabolitos mayoritarios son varios y no coinciden con aquel. A continuación, se identifican los picos del cultivo mixto a dos días (trazo rojo) ya que los de cinco (trazo verde) habían sido ya analizados anteriormente. Los picos XXVII y XXVIII no han podido identificarse como apocarotenoides.

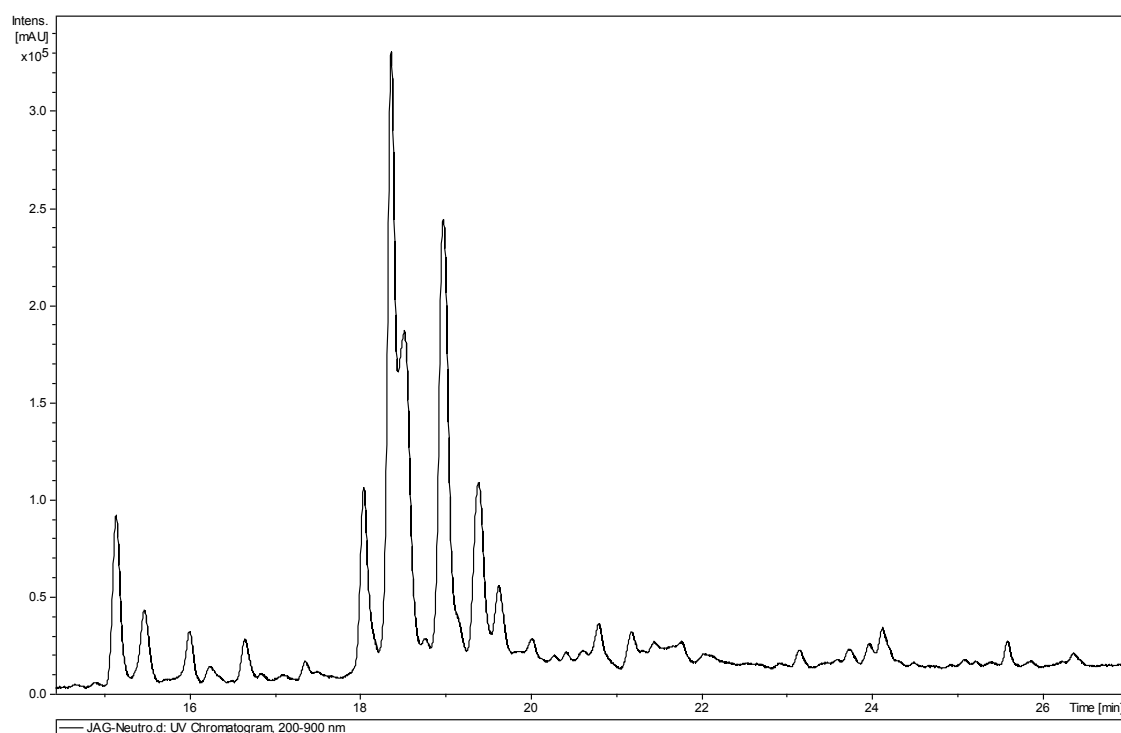


Figura 42. Cromatograma de la fracción neutra de cultivos mixtos a cinco días.

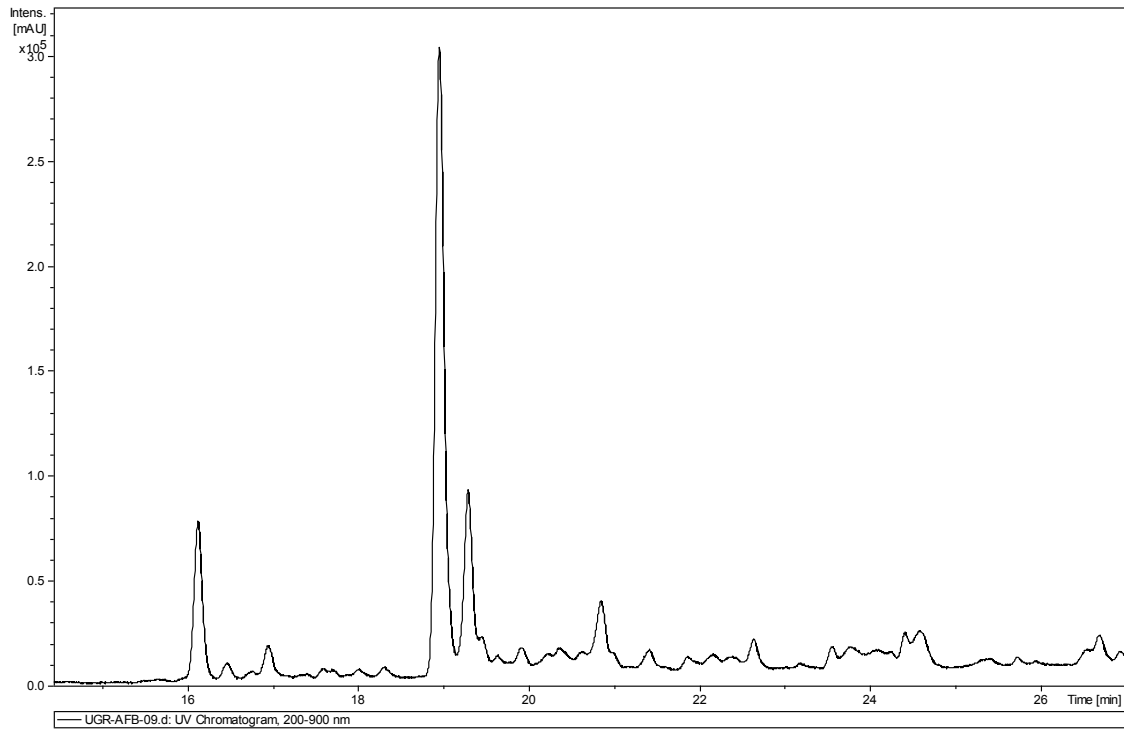


Figura 43. Cromatograma de la fracción neutra de cultivos mixtos a dos días.

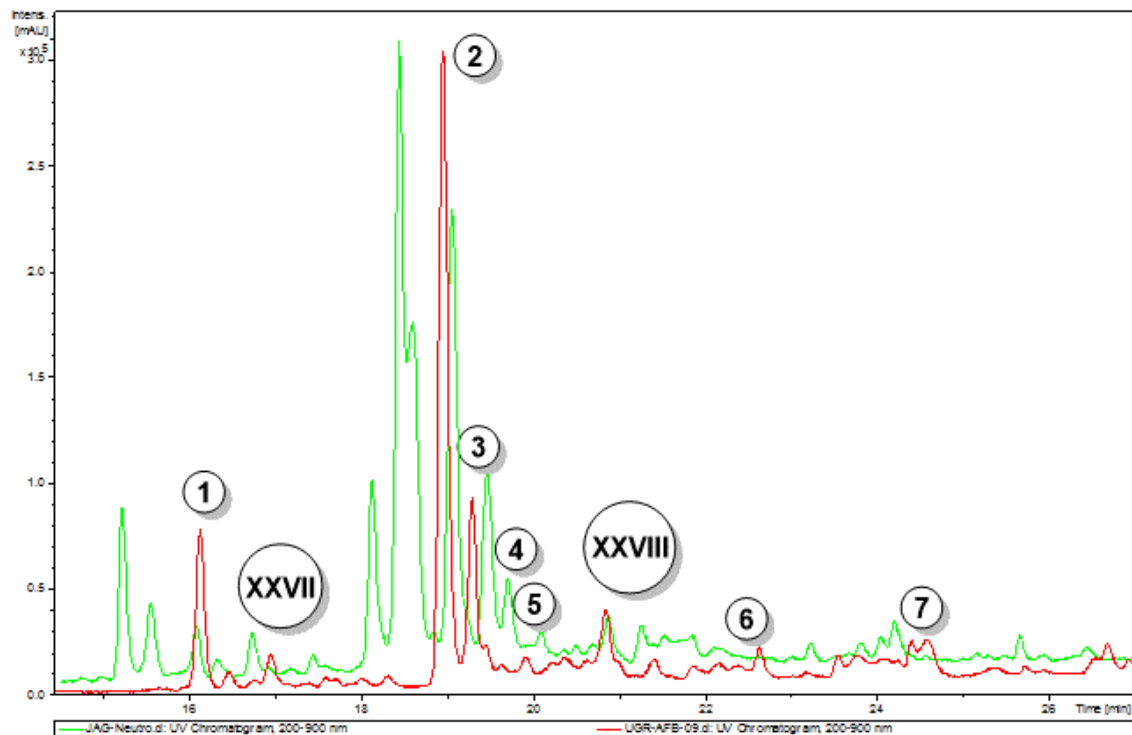
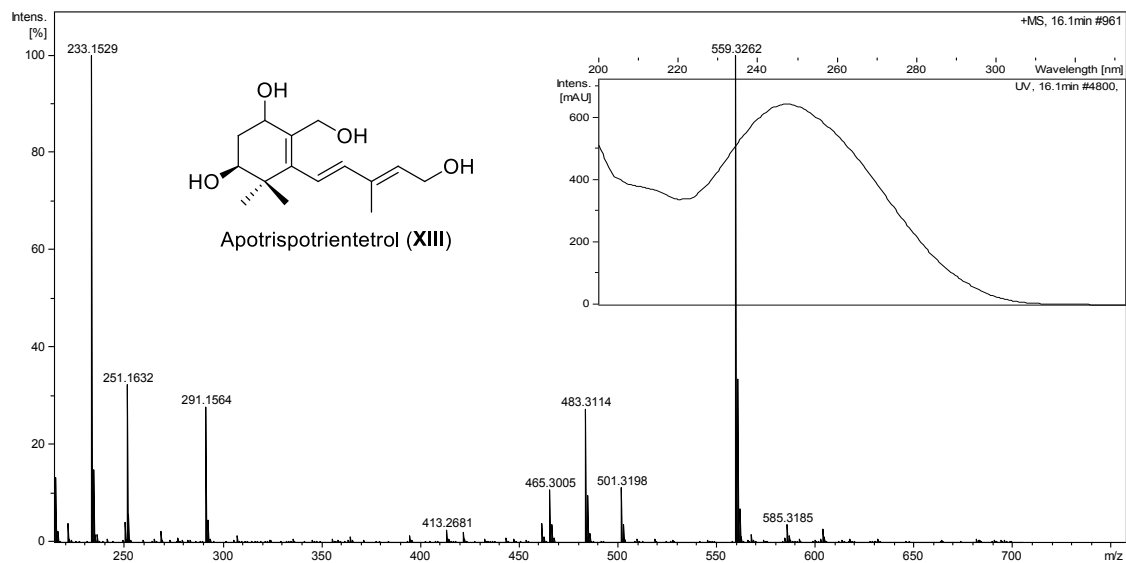


Figura 44. Cromatogramas superpuestos de las fracciones neutras de cultivos mixtos a dos y cinco días.

Composición de la fracción neutra a 2 días:

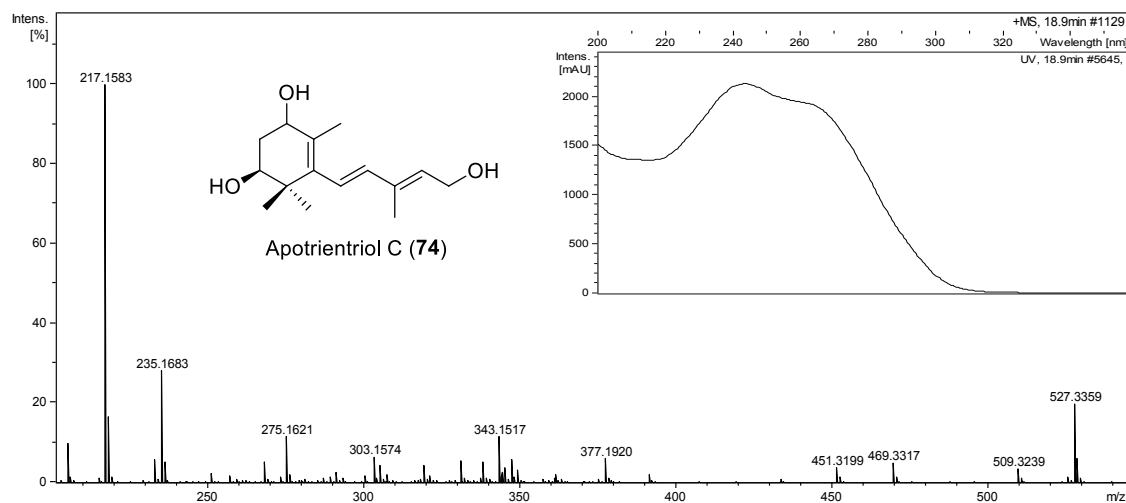
Pico 1:

Por comparación con datos previos se identifica como apotrispotrientetrol (XIII, Esquema 42).



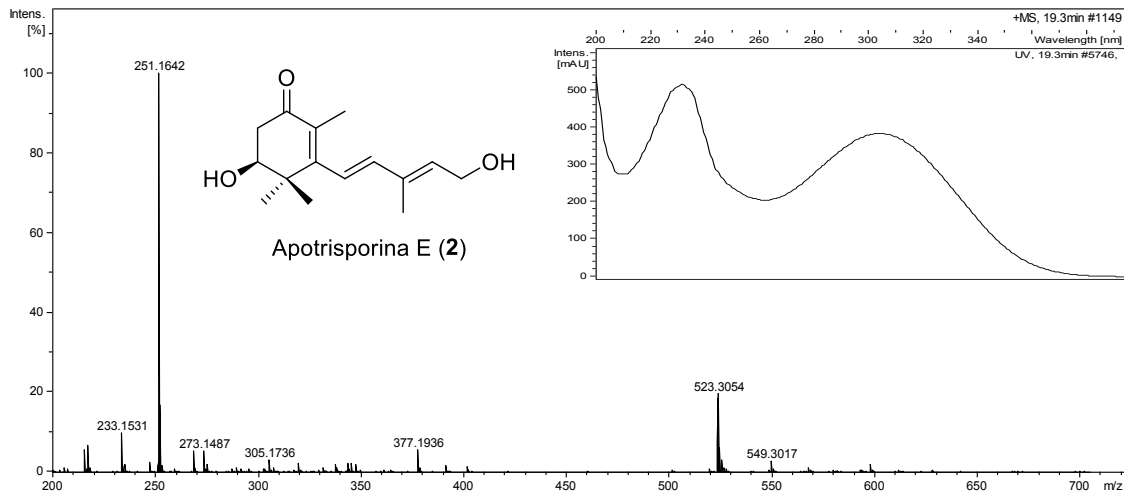
Pico 2:

Se identifica como apotrientriol C (74).



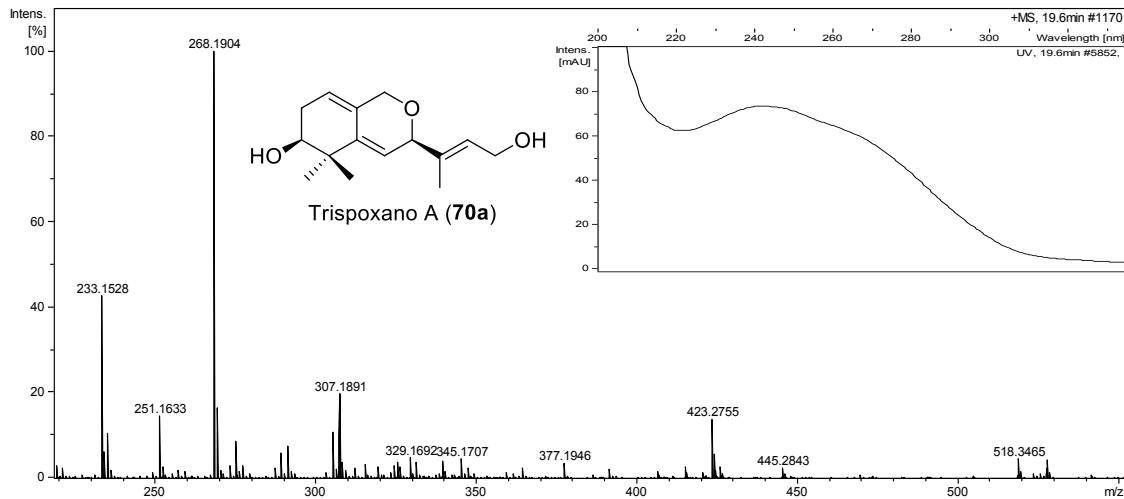
Pico 3:

Se identifica como apotrisporina E (2).



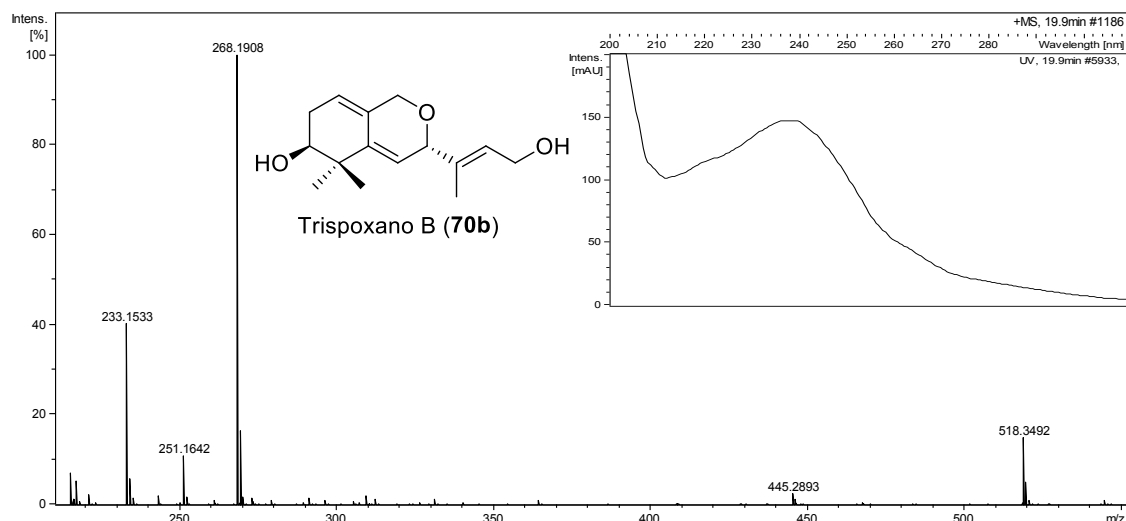
Pico 4:

Se identifica como trispoxano A (70a).



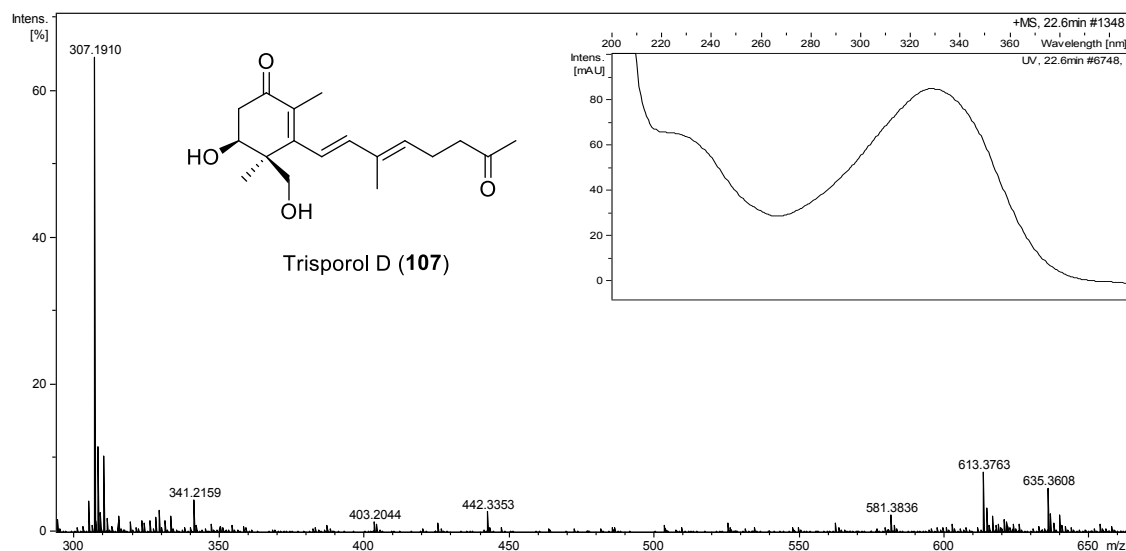
Pico 5:

Se identifica como trispoxano B (70b).



Pico 6:

El pico más abundante corresponde al pico molecular a m/z 307.1910 [M + H] (teórico: m/z 307.1904) al que corresponde la fórmula molecular $C_{18}H_{26}O_4$. También existe un pico asociado a un dímero a m/z 613.3763 [2M + H] (teórico: m/z 613.3735). El espectro de UV tiene su máximo de absorción a 330 nm característico de una trienona conjugada y su tiempo de retención es de 22.6 minutos. Con todos estos datos, se identifica como trisporol D (**107**).



Pico 7:

El tiempo de retención es de 24.6 minutos indicando dos oxígenos y baja polaridad. En el espectro de masas el pico más intenso corresponde a m/z 275.2012 [M + H] (teórico: m/z 275.2006) y la fórmula molecular es $C_{18}H_{26}O_2$. También existen otros picos correspondientes a pérdida de agua a m/z 257.1898 [M + H - H₂O] (teórico: m/z 257.1900) y aducto a m/z 292.2253 [M + NH₄] (teórico: m/z 292.2271). El espectro de UV tiene su máximo de absorción a 252 nm de acuerdo con la presencia de un trieno conjugado del tipo de los contenidos en apotrientriol C. Con todos estos datos, una posible estructura es la representada a continuación (**108**).

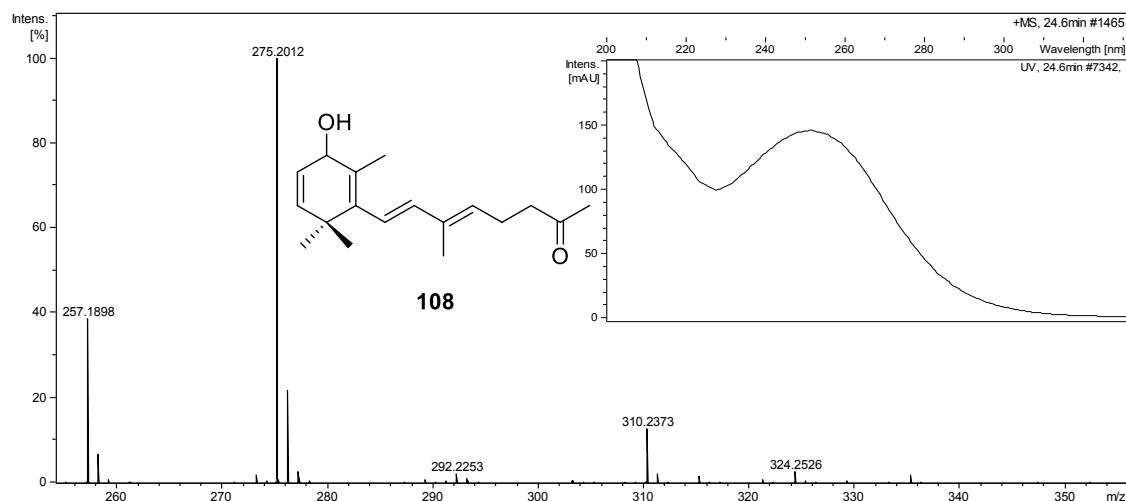
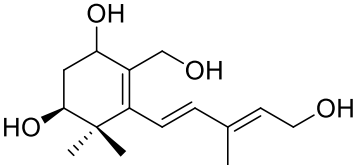
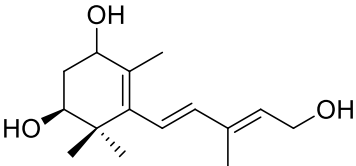
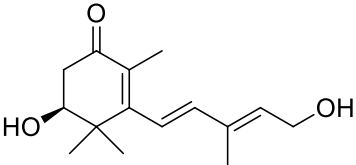
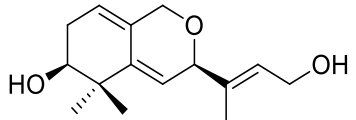
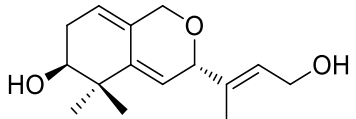
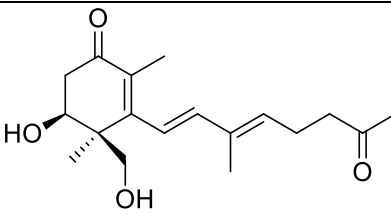
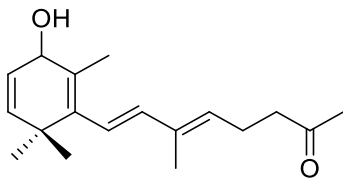


Tabla 15. Datos de los picos identificados en el HPLC–HRMS de la fracción neutra de cultivos mixtos a dos días.

	Fórmula molecular	Tiempo de retención (min)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Picos m/z	Posible estructura
1	$C_{15}H_{24}O_4$	16.1	248	233.1529	 <p>Apotrispotrientetrol (XIII)</p>
2	$C_{15}H_{24}O_3$	18.9	244	217.1583	 <p>Apotrientriol C (74)</p>
3	$C_{15}H_{22}O_3$	19.3	232 304	251.1642	 <p>Apotrisporina E (2)</p>
4	$C_{15}H_{22}O_3$	19.6	240	268.1904	 <p>Trisporano A (70a)</p>
5	$C_{15}H_{22}O_3$	19.9	240	268.1908	 <p>Trisporano B (70b)</p>

6	$C_{18}H_{26}O_4$	22.6	330	307.1910	 <p>Trisporol D (107)</p>
7	$C_{18}H_{26}O_2$	24.6	252	275.2012	 <p>108</p>

La comparación semicuantitativa basada en las alturas de los picos de los cromatogramas conduce a algunas conclusiones. A dos días los compuestos más abundantes son apotrientriol C (**74**), apotrispotrientetrol (**XIII**) y en tercer lugar la apotrisporina E (**2**). A cinco días se observa un aumento significativo de la proporción de apotrisporina E (**2**) que es el mayoritario, la desaparición de apotrientriol C (**74**) y la aparición de nuevos compuestos resultantes de hidroxilaciones sobre el anterior y sobre trispoxanos A ó B (**70a** y **70b**). Estos cambios parecen significar que en tiempos cortos los metabolitos más abundantes no poseen función carbonilo sobre C-4, cuya oxidación sigue para los C15 una cinética relativamente lenta.

f. Comparación del contenido en trisporoides en las fracciones ácidas de cultivos mixtos a dos y cinco días:

Al igual que con las muestras anteriores, en estas fracciones ácidas también se observan diferencias muy significativas tanto cualitativas como cuantitativas. Solamente el trazo rojo (cultivo mixto a dos días) ha sido analizado ya que el de cinco (trazo verde) había sido realizado anteriormente. Existe únicamente el pico **XXIX** que no ha podido identificarse como apocarotenoide.

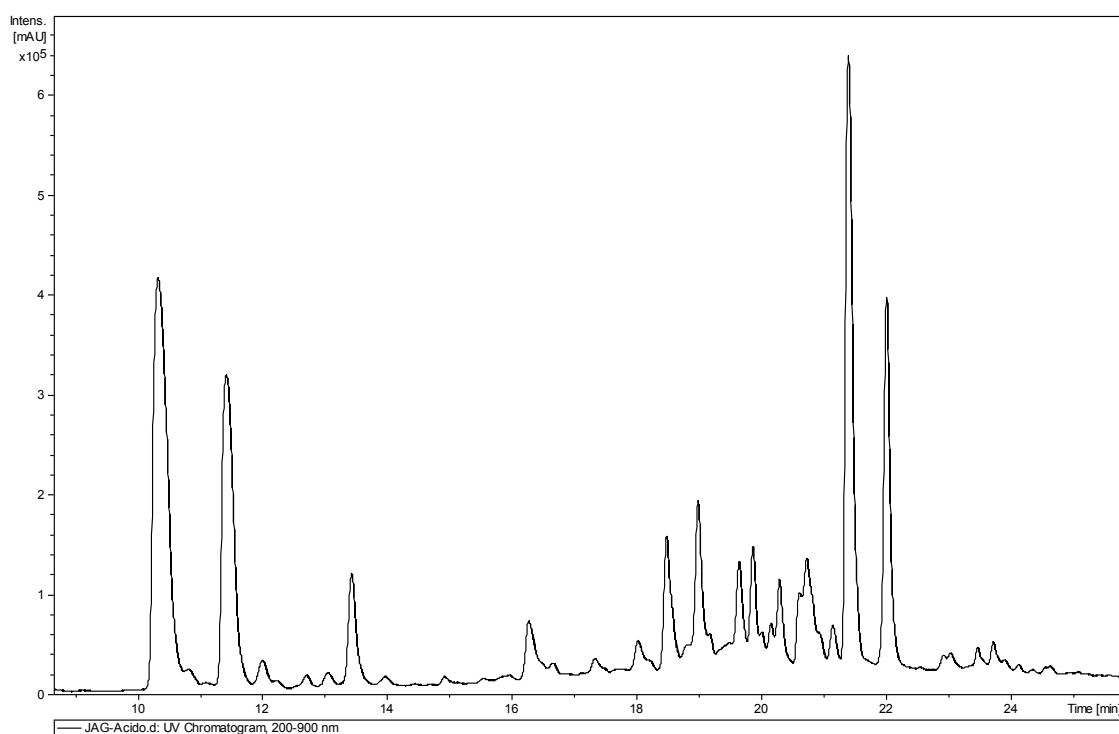


Figura 45. Cromatograma de la fracción ácida de cultivos mixtos a cinco días.

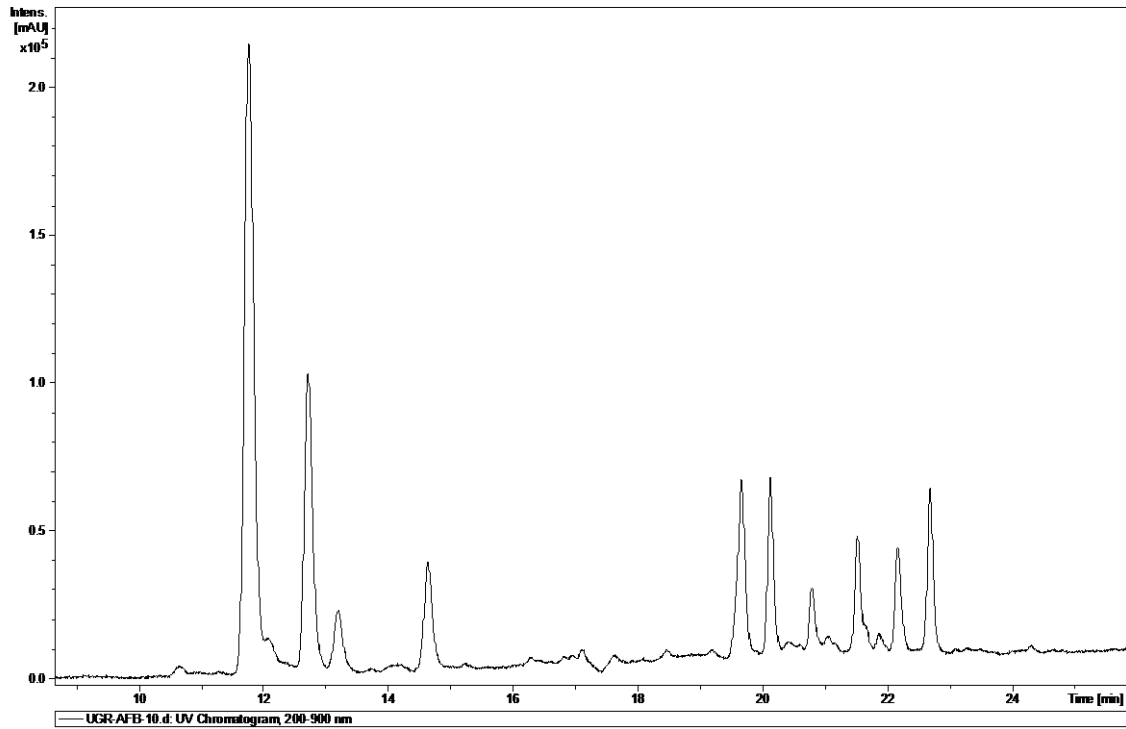


Figura 46. Cromatograma de la fracción ácida de cultivos mixtos a dos días.

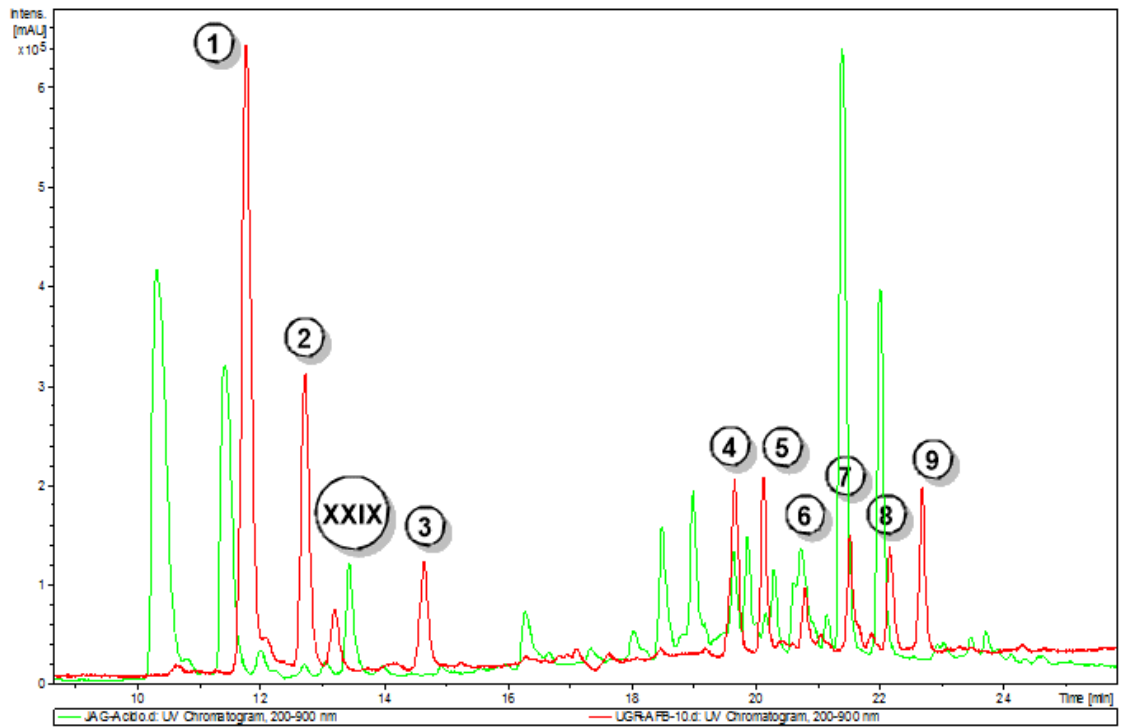
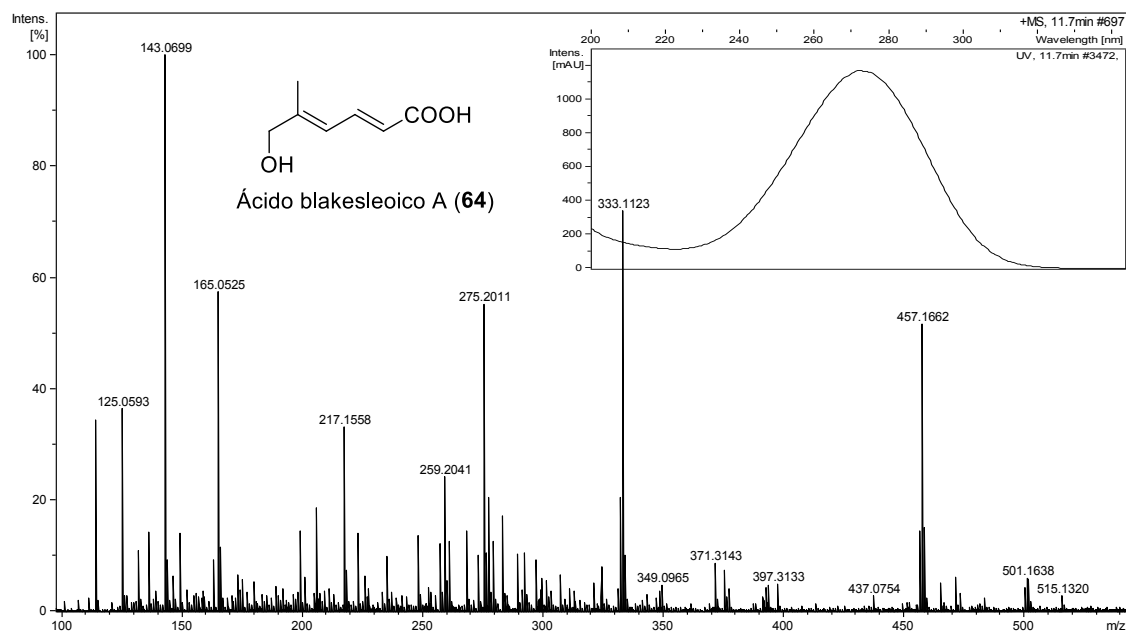


Figura 47. Cromatogramas superpuestos de las fracciones ácidas de cultivos a dos y cinco días

Composición de la fracción ácida a 2 días:

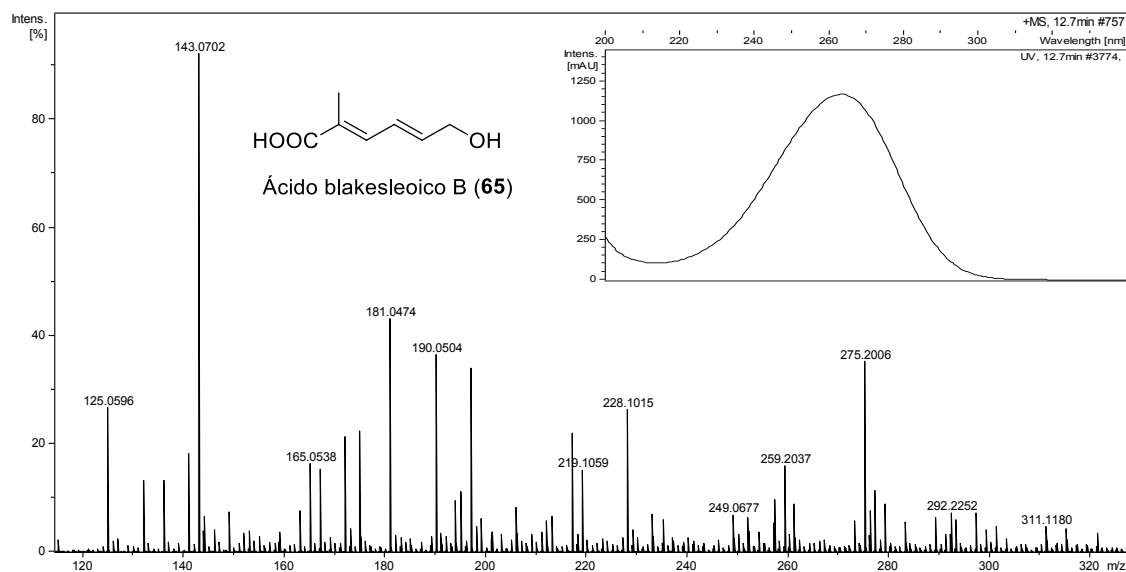
Pico 1:

Los datos indican que se trata del apocarotenoide C7 hidroxiaácido mayoritario (**64**) identificado también en la muestra ácida anterior.



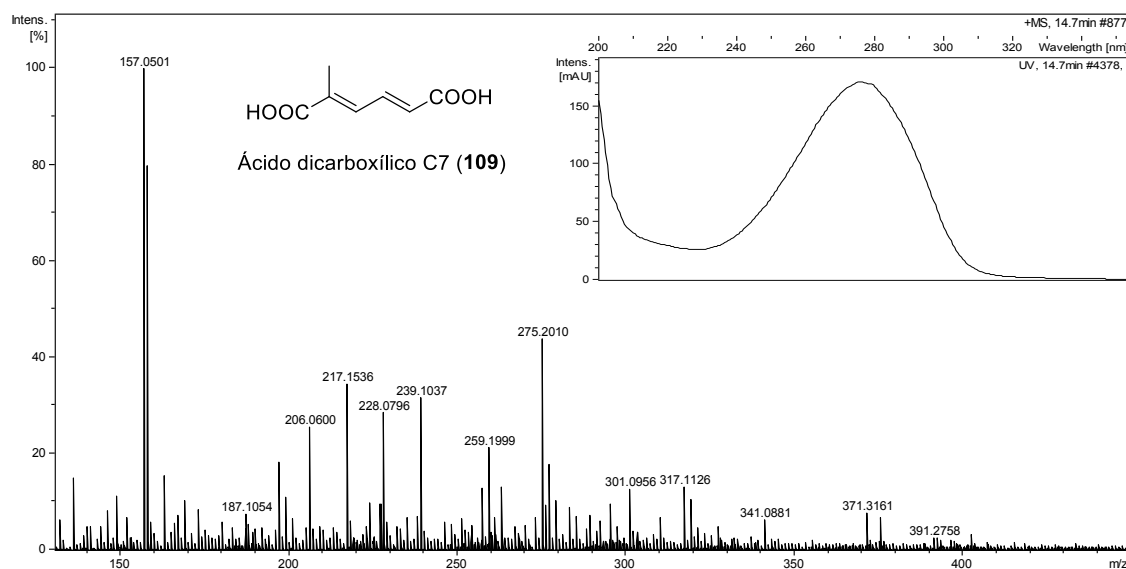
Pico 2:

Todos sus datos coinciden con el metilhexanoide C7 minoritario (**65**) identificado también en la muestra ácida anterior.



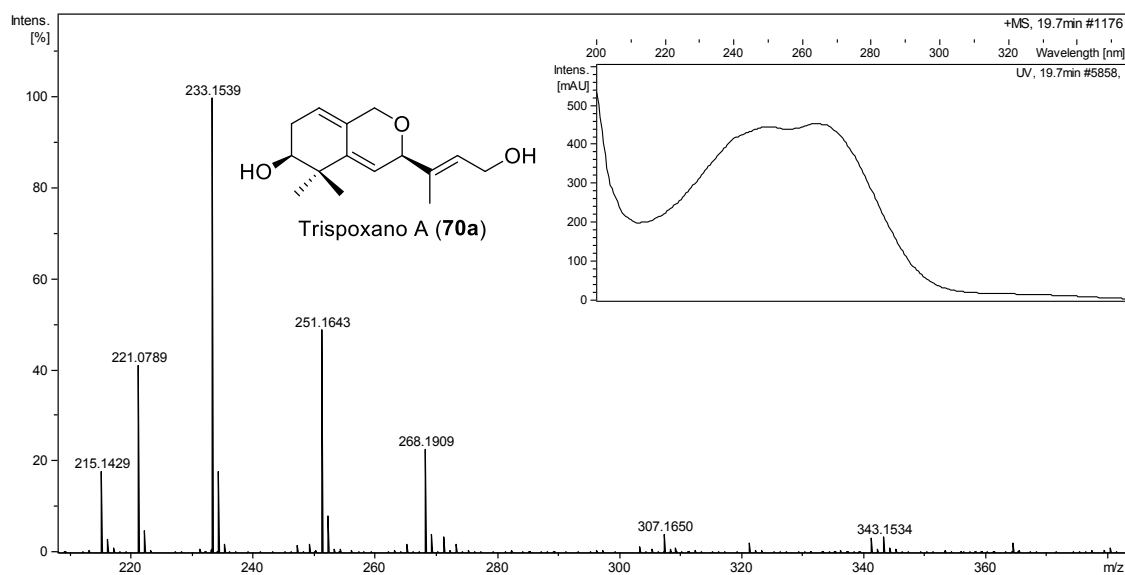
Pico 3:

Aunque se trata de un pico con mezcla de compuestos, el pico más intenso corresponde a m/z 157.0501 [M + H] (teórico: m/z 157.0496) acompañado de un aducto a m/z 239.1037 [M + 2ACN + H] (teórico: m/z 239.1027). Le corresponde una fórmula molecular asociada de $C_7H_8O_4$. Su máximo en el UV es de 276 nm aproximadamente y su tiempo de retención es de 14.7 minutos. Con estos datos, se piensa que podría ser el ácido dicarboxílico C7 (109).



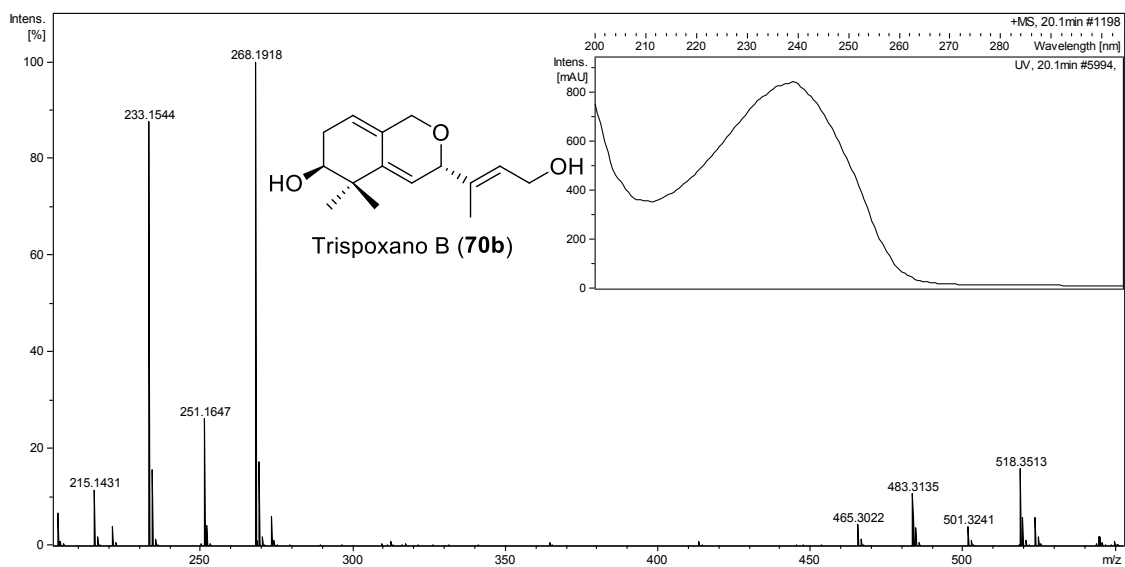
Pico 4:

Se identifica como trisproxano A (**70a**).



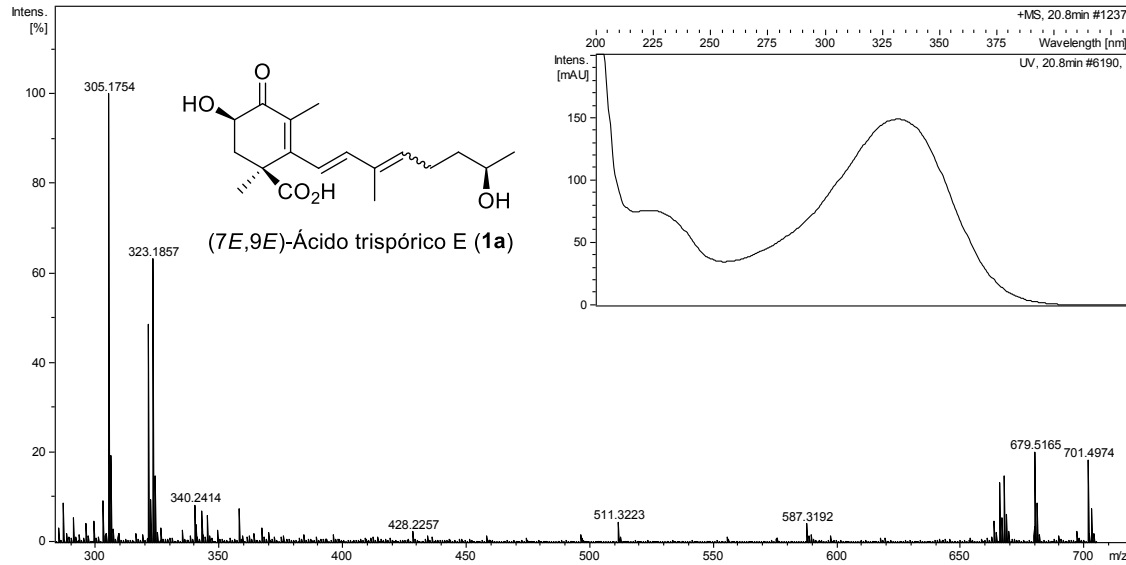
Pico 5:

Se identifica como trisproxano B (**70b**).



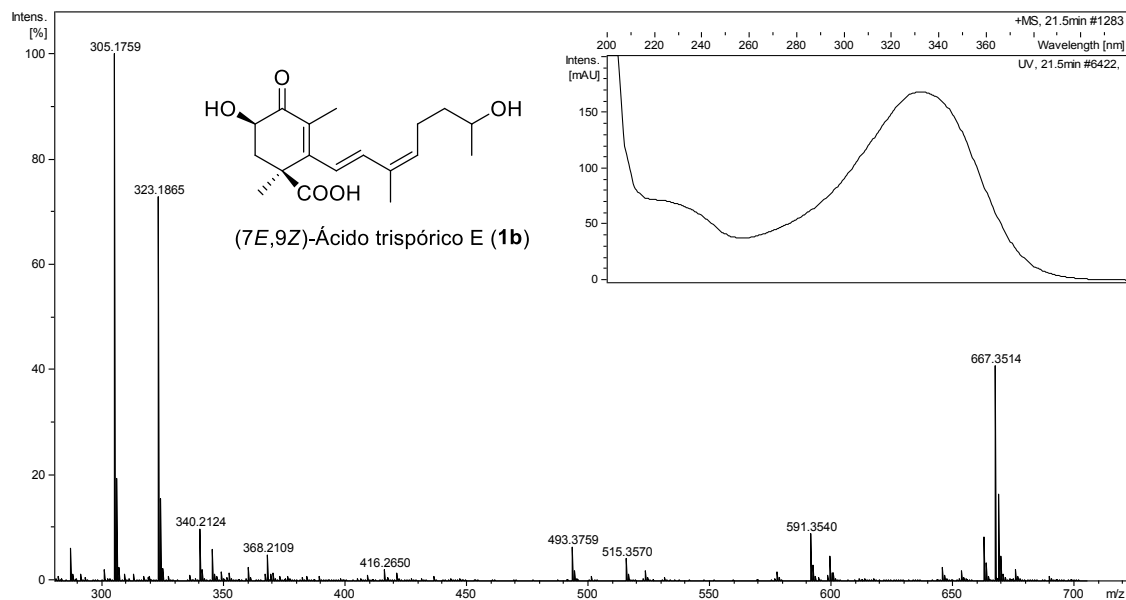
Pico 6:

Los datos son coincidentes con los del ácido trispórico E con isomería *E,E* (**1a**).



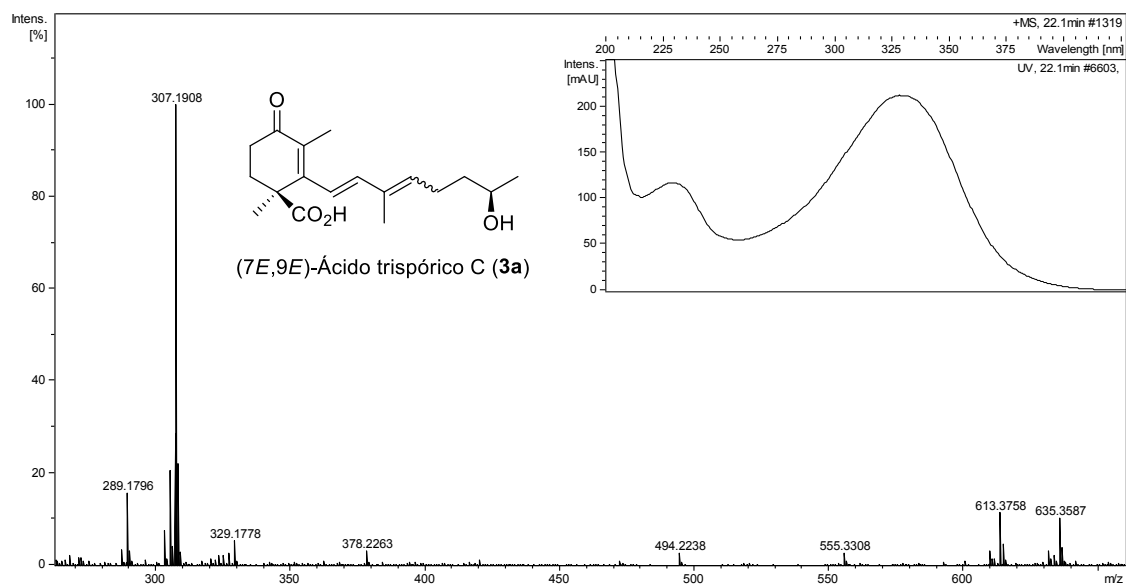
Pico 7:

Los datos corresponden con el ácido trispórico E (**1b**) con isomería *E,Z*.



Pico 8:

Se identifica como ácido trispórico C con isomería *E,E* (**3a**).



Pico 9:

Se trata del isómero *E,Z* del ácido trispórico C (**3b**).

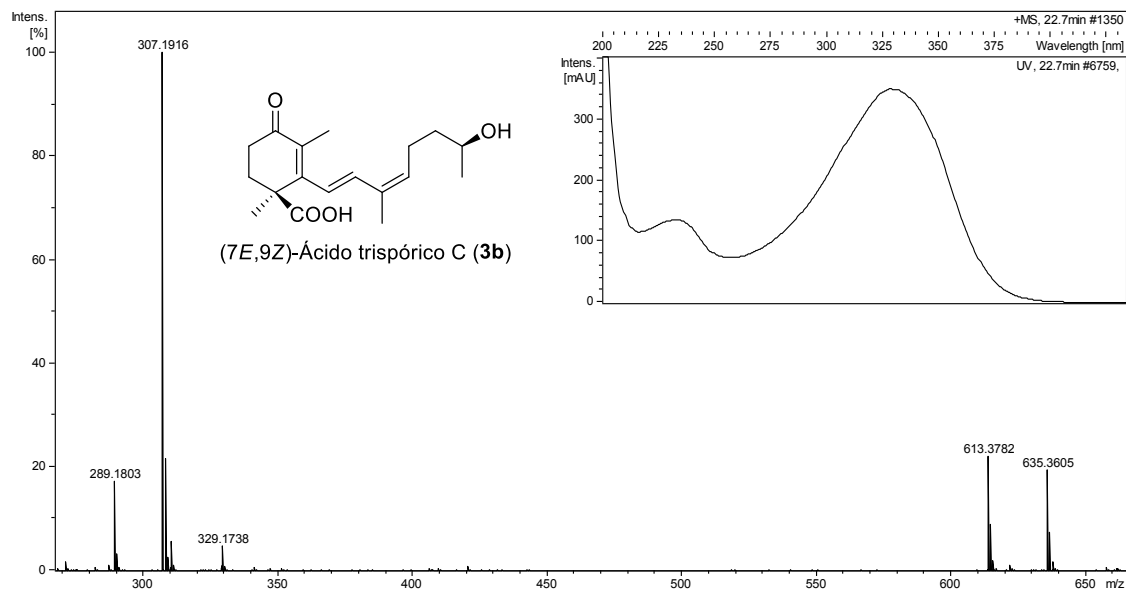
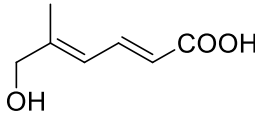
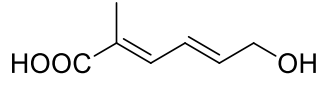
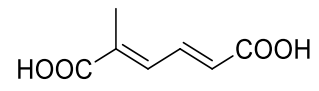
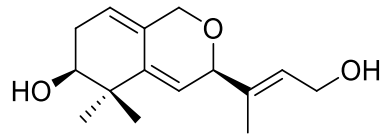
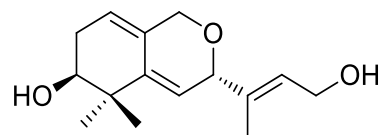
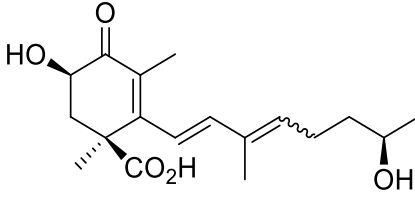
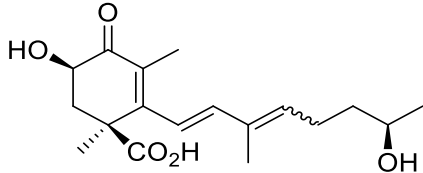
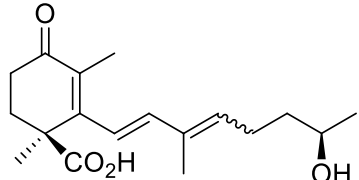
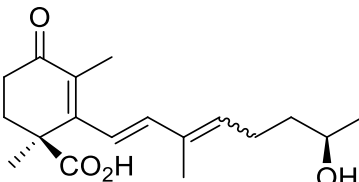


Tabla 16. Datos de los picos identificados en el HPLC–HRMS de la fracción ácida de cultivos mixtos a dos días.

	Fórmula molecular	Tiempo de retención (min)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Picos m/z	Posible estructura
1	C ₇ H ₁₀ O ₃	11.7	272	143.0699	 Ácido blakesleico A (64)
2	C ₇ H ₁₀ O ₃	12.7	264	143.0702	 Ácido blakesleico B (65)
3	C ₇ H ₈ O ₄	14.7	276	157.0501	 Ácido dicarboxílico (109)
4	C ₁₅ H ₂₂ O ₃	19.7	264	233.1539	 Trispoxano A (70a)
5	C ₁₅ H ₂₂ O ₃	20.1	240	268.1918	 Trispoxano B (70b)
6	C ₁₈ H ₂₆ O ₅	20.8	332	305.1754	 (7 <i>E</i> ,9 <i>E</i>)-Ácido trispórico E (1a)

7	$C_{18}H_{26}O_5$	21.5	332	305.1759	 (7 <i>E</i> ,9 <i>Z</i>)-Ácido trispórico E (1b)
8	$C_{18}H_{26}O_4$	22.1	329	307.1908	 (7 <i>E</i> ,9 <i>E</i>)-Ácido trispórico C (3a)
9	$C_{18}H_{26}O_4$	22.7	328	307.1916	 (7 <i>E</i> ,9 <i>Z</i>)-Ácido trispórico C (3b)

Una comparación semicuantitativa basada en la altura de los picos en los cromatogramas a dos y cinco días pone de manifiesto dos cambios cuantitativos en la composición. En primer lugar a cinco días el segundo hidroxilado C7 (**65**) (Pico 2) baja en su proporción y parece transformarse en el diácido C7 (**109**) (Pico 3). En segundo lugar a dos días la proporción relativa de los ácidos trispóricos C y E (**3** y **1**) es similar, por el contrario a cinco días sube de forma acusada aquella de la pareja de ácidos trispóricos C (**3a** y **3b**). Mientras que lo primero parece una transformación razonable, lo segundo es biosintéticamente extraño ya que crece la proporción de los ácidos menos hidroxilados C frente a los E que deberían ser los que aumentarían con el paso del tiempo. Una explicación podría residir en la existencia de dos formas distintas de biosintetizar ácidos trispóricos a lo largo de la interacción sexual, una primera rápida dedicada a hacer llegar las señales sexuales (feromonas sexuales) que inician el proceso de sexualidad y otra segunda con la finalidad de producir cantidades importantes de ácidos trispóricos C que se encarguen de completar todo el ciclo de reproducción sexual.

VIII. CONCLUSIONES

/CONCLUSIONS

- 1.- Se ha llevado a cabo una completa revisión bibliográfica sobre la presencia de apocarotenoides en *Phycomyces blakesleeanus* y *Blakeslea trispora*. Se describen sus estructuras, propiedades, la síntesis química y biosíntesis.
- 2.- Mediante técnicas cromatográficas preparativas se han aislado 12 apocarotenoides en cultivos mixtos de *Blakeslea trispora* de las estirpes F986 (+) y F921 (-). Sus estructuras se han elucidado vía técnicas espectroscópicas en especial RMN. Seis de ellos son nuevos productos naturales y dos nunca antes se habían encontrado en *Blakeslea trispora*. Se incluyen dos trisporoides C18, (9E)-trisporato de metilo C (**8a**) y (9Z)-trisporato de metilo C (**8b**); tres C15 ciclofarnesoides (**57**, **58a** y **59a**), cinco C7 2-metilhexanoides, **61–63**, ácido blakesleoico A y B (**64** y **65**); un compuesto heterocíclico C15 (**60**) y una pequeña cantidad de un C13 (**6a**). De estos tres primeros grupos, tras un análisis semicuantitativo por RMN, se encontraron cantidades equimoleculares.
- 3.- Se ha completado con éxito la síntesis química de varios metabolitos (**61–63**) de *Blakeslea trispora*. La síntesis del diol **61** se ha realizado en 8 etapas con un rendimiento global del 35%, mientras que las de los hidroxialdehidos (**62–63**) han sido de 12 y 14 etapas con un 26 y 18% de rendimiento global, respectivamente.
- 4.- En base a que las familias de apocarotenoides C18, C15 y C7 se han encontrado en cultivos de *Blakeslea trispora* en cantidades aproximadamente equimoleculares, se ha propuesto como paso inicial en la biosíntesis de

apocarotenoides una doble ruptura asimétrica de β -caroteno en los dobles enlaces $\Delta^{13,14}$ y $\Delta^{11,12}$. Este mecanismo ya se había descrito en *Phycomyces blakesleeanus*, por lo que parece ser extensible a otras especies de Mucorales.

5.- Mediante aislamiento y elucidación estructural se han identificado 13 apocarotenoides en *Phycomyces blakesleeanus* tanto en cultivos mixtos como individuales de las estirpes A56 (+) y NRL1555 (-). Destacan siete apocarotenoides C18, ácido trispórico E (**1**), (9*E*)-ácido trispórico C (**3a**), (9*Z*)-ácido trispórico C (**3b**), (9*Z*)-trisorato de metilo C (**8b**), trisporina B (**46**), (9*Z*)-ácido trispórico D (**72a**) y **7**; cuatro C15, apotrisporina E (**2**), **70**, trispoxano A (**71a**) y trispoxano B (**71b**); y dos C7, ácido blakesleoico A y B (**64** y **65**). Se ha demostrado que la adición de pequeñas cantidades de acetato al medio disminuye la diversidad química.

6.- Se ha comprobado la existencia de una diversidad estructural entre los apocarotenoides de cultivos individuales y mixtos de *Phycomyces blakesleeanus*. Ocho apocarotenoides han aparecido en ambos tipos de cultivos, de los cuales 6 eran muy abundantes (cuatro 1,6-ciclofarnesoides y dos metilhexanoides) y los otros dos eran minoritarios (**73** y desconocido). Sus cantidades son siempre mayores en cultivos mixtos. Dos compuestos minoritarios sólo se han encontrado en cultivos individuales (-) (**46** y desconocido). Cuatro ácidos trispóricos y el metil éster **8b** se han encontrado solamente en cultivos mixtos, siendo el más abundante el ácido trispórico E (**1**).

7.- Se ha propuesto una ruta biosintética para apocarotenoides en *Phycomyces blakesleeanus* donde los tres nuevos compuestos trispoxano A y apotrientrioles A y B (**70a**, **71a** y **71b**, respectivamente) son biosintetizados a través del intermedio trihidroxilado apotrientriol C (**74**). El compuesto heterocíclico **70** se formaría por hidroxilación del metilo 14 y heterociclación concomitante del grupo hidroxilo del anillo vía S_N2' , mientras que los apotrientrioles A y B (**71a** y **71b**) se formarían por un ataque enzimático de agua en C-10 con eliminación del grupo -OH del anillo también vía S_N2' .

8.- Se ha diseñado una ruta de ciclación biomimética para la síntesis enantioselectiva de apocarotenoides con funcionalización en C-2 y C-4, mediante el uso de estrategias radicalarias ó catiónicas, vía Cp_2TiCl y ZrCl_4 , respectivamente. Demostrando la viabilidad del método, se completó la primera síntesis enantioselectiva de (+)-apotrisporina E (**2**) y (+)-apotrientrioles A y B (**71a** y **71b**) en 12 etapas con un rendimiento global de 3 y 2%, respectivamente, confirmándose así la configuración absoluta *S* en C-2. Además, con la misma metodología radicalaria de Ti^{III} se puede acceder a epímeros de trisporoles y ácidos trispóricos.

9.- La posibilidad de obtención de estos metabolitos en cantidades suficientes mediante síntesis, permite no sólo la confirmación de la configuración absoluta *S* en C-2 sino en futuros trabajos realizar pruebas de bioactividad y carotenogénesis y biotransformaciones en su caso.

10.- Se ha puesto a punto un método analítico para el estudio de apocarotenoides en *Phycomyces blakesleeanus* basado en el empleo combinado de HPLC-MS/DAD obteniendo un perfil cromatográfico general en cultivos individuales y mixtos a diferentes días de incubación y tratamiento de la muestra.

11.- En los cultivos individuales de las fracciones neutras a dos días se han identificado apotrientriol C (**74**), apotrispotrientetrol (**XIII**) y apotrisporina E (**2**). Los dos primeros serían los precursores de los metabolitos apotrientrioles A y B (**71a** y **71b**) trispoxano A y B (**70a** y **70b**) respectivamente. En las fracciones ácidas, se han identificado los ácidos blakesleicos A y B (**64** y **65**), y pequeñas proporciones de los trispoxanos A y B (**70a** y **70b**) y los apotrientrioles (**71a** y **71b**) pero no se han detectado sus precursores.

12.- En los cultivos mixtos a cinco días de incubación no hubieron diferencias cualitativas significativas en el análisis de las muestras liofilizadas y no liofilizadas. En la fracción neutra, se han identificado apotrisporina E (**2**), trispoxanos A y B (**70a** y **70b**), apotrientrioles A y B (**71a** y **71b**) y algunos isómeros posicionales de los compuestos anteriores. Por último, en la fracción ácida aparecen los ácidos

blakesleicos A y B (**64** y **65**), los trispoxanos A y B (**70a** y **70b**) y los isómeros de los ácidos trispóricos E y C (**1a**, **1b**, **3a** y **3b**).

13.- En una comparativa entre cultivos mixtos a dos y cinco días, se observaron diferencias significativas en relación a la cuantificación de metabolitos. A dos días, se observan apotrientriol C (**74**), apotrispotrientetrol (**XIII**) y apotrisporina E (**2**) mientras que a cinco días aumenta la cantidad de **2**, disminuye la de **74** y aparecen los trispoxanos A y B (**70a** y **70b**). En cuanto a las fracciones ácidas, se observan los ácidos blakesleicos A y B (**64** y **65**) disminuyendo este último su proporción a cinco días transformándose en el díacido **109** y los ácidos trispóricos E y C (**1** y **3**) aumentando acusadamente la proporción de este último a cinco días.

1. We have carried out a comprehensive literature review about the presence of apocarotenoids in *Phycomyces blakesleeanus* and *Blakeslea trispora*. We describe therein their structures, properties, chemical synthesis and biosynthesis.
2. We have isolated 12 apocarotenoids in mated cultures of F986 (+) and F921 (-) strains of *Blakeslea trispora* by preparative chromatographic techniques. Their structures have been elucidated particularly through spectroscopic techniques, mainly NMR. Six of them are new natural products and two had never before been found in *Blakeslea trispora*. Are also includes two C18 trisporoids, 9*E*- and 9*Z*-methyl trisporate C, (**8a** and **8b**); three C15 cyclofarnesoids (**57**, **58a** and **59a**); five C7 2-methylhexanoids, **61-63**, blakesleic acid A and B (**64** and **65**); one C15 heterocyclic compound (**60**) and a small amount of a C13 metabolite (**6a**). From the first three groups, we have found equimolecular quantities after a semiquantitative analysis by NMR.
3. We have successfully completed the chemical synthesis of several metabolites (**61-63**) of *Blakeslea trispora*. The synthesis of diol **61** has been carried out in 8 steps with an overall yield of 35%, whereas those of the hydroxyaldehyde derivatives (**62-63**) have required 12 and 14 steps with overall yields of 26 and 18%, respectively.
4. Bearing in mind that the families of C18, C15 and C7 apocarotenoids have been found in cultures of *Blakeslea* in about equimolecular quantities, we have

proposed, as initial step in the biosynthesis of apocarotenoids a double asymmetrical cleavage of β -carotene through $\Delta^{13,14}$ and $\Delta^{11',12'}$ double bonds. This mechanism had already been described in *Phycomyces*, so it is apparently extensible to other species of Mucorales.

5. By means of isolation and structural elucidation we have identified 13 apocarotenoids in *Phycomyces blakesleeanus* both in mated and single cultures of A56 (+) and NRL1555 (-) strains. Seven of them belong to the apocarotenoids C18 family, trisporic acid E (**1**), (9E)-trisporic acid C (**3a**), (9Z)-trisporic acid C (**3b**), (9Z)-methyl trisporate C (**8b**), trisporin B (**46**), (9Z)-trisporic acid D (**72a**) and **73**; four are C15, apotrisporin E (**2**), **70**, trispoxane A (**71a**) and trispoxane B (**71b**); and two C7, blakesleic acid A and B (**64** and **65**) ones.

6. We have proved the existence of a structural diversity between the apocarotenoids of single and mated cultures of *P. blakesleeanus*. Eight apocarotenoids have been found in both kind of cultures, of which six of them were very abundant (four 1,6-cyclofarnesoids and two methylhexanoids) and the other two were minority (**73** and unknown). Their quantities are always higher in mated cultures. Two minor compounds have only been found in single cultures (-) (**46** and unknown). Four trisporic acids and methylester **8b** have been only found in mated cultures, being trisporic acid E (**1**) the most abundant compound.

7. We have proposed a biosynthetic pathway for apocarotenoids in *Phycomyces blakesleeanus* where the three new compounds: trispoxane A and apotrietriols A and B (**70a**, **71a** and **71b**, respectively) are biosynthesized through the trihydroxylated intermediate apotrietriol C (**74**). The heterocyclic compound **70** could be formed by hydroxylation of C-14 and concurrent heterocyclization of the hydroxyl group in the ring via S_N2' , whereas the apotrietriols A and B (**71a** and **71b**) could be formed by an enzymatic attack of water in C-10 with elimination of -OH group in the ring also via S_N2' .

8. We have designed a pathway of biomimetic cyclization for the enantioselective synthesis of apocarotenoids with functionalization at C-2 and C-

4, using either radical or cationic strategies, by using Cp_2TiCl and ZrCl_4 , respectively. To test the viability of method, we have completed the first enantioselective synthesis of (+)-apotrissporine E (**2**) and (+)-apotrientriols A and B (**71a** and **71b**) in 12 steps with an overall yield of 3 and 2%, respectively, thus confirming the absolute configuration *S* at C-2 of the natural products. Furthermore, with the same radical methodology of Ti^{III} it is possible to access the epimers of trisporols and trisporic acids.

9. The possibility to obtaining enough quantities of these metabolites by synthesis, could allow to access not only to the confirmation of the structure and absolute configuration *S* at C-2 but also to perform some test on bioactivity, carotenogenesis and biotransformations in further works.

10. An analytical method has been developed to study apocarotenoids in *Phycomyces blakesleeanus* based on HPLC-MS/DAD obtaining a general chromatography profile in single and mated cultures in different days-old incubation and simple processing.

11. Apotrientriol C (**74**), apotrispotrientetrol (**XIII**) and apotrissporin E (**2**) have been identified in single neutral two days-old cultures by HPLC-MS/DAD. The two first ones are new natural products and they could be the precursors of metabolites apotrientrioles A and B (**71a** and **71b**) and trispoxane A and B (**70a** and **70b**), respectively. In the acid portions, we have identified the blakesleic acids A and B (**64** and **65**), and small proportions of the trispoxanes A and B (**70a** and **70b**) and apotrientriols (**71a** and **71b**) but their precursors have not been identified.

12. There had been no qualitative differences in the analysis of lyophilized and no lyophilized samples by HPLC-MS/DAD. In the neutral portion, we have identified apotrissporin E (**2**), trispoxane A and B (**70a** and **70b**), apotrientriols A and B (**71a** and **71b**) and some positional isomers of previous compounds. Finally, blakesleic acids A and B (**64** and **65**), trispoxanes A and B (**70a** and **70b**) and

isomers of trisporic acids E and C (**1a**, **1b**, **3a** and **3b**) have been identified in the acidic portion.

13. In a comparative study between mated two days-old and five days-old cultures by HPLC-MS/DAD, we have shown significant differences in relation to the quantification of metabolites. In two days-old cultures, substantial proportions of apotrietriol C (**74**), apotrispotrientetrol (**XIII**) and apotrisporin E (**2**) have been found whereas in five days-old incubation, amount of **2** is increased, **74** is decreased and trispoxanes A and B (**70a** and **70b**) are identified. In the acidic portions, we have identified the blakesleic acids A and B (**64** and **65**) decreasing the proportion of the last one in five days-old cultures to become the diacid **109**, and trisporic acids E and C (**1** and **3**) sharply increasing the proportion of this last one in five days-old incubation.

ANEXO 1

Supporting Information

New apocarotenoids and β -carotene cleavage in *Blakeslea trispora*.

Alejandro F. Barrero,^{*a} M. Mar Herrador,^a Pilar Arteaga,^a Jesús Gil,^a Jose-Antonio González,^a
.Eugenio Alcalde,^b Enrique Cerdá-Olmedo^{*b}

^aDepartment of Organic Chemistry, Institute of Biotechnology, University of Granada, Avda. Fuente Nueva, s/n, 18071 Granada, Spain and ^bDepartment of Genetic, Faculty of Biology, University of Sevilla, Reina Mercedes, s/n, 41071 Sevilla, Spain

afbarre@ugr.es; eco@us.es.

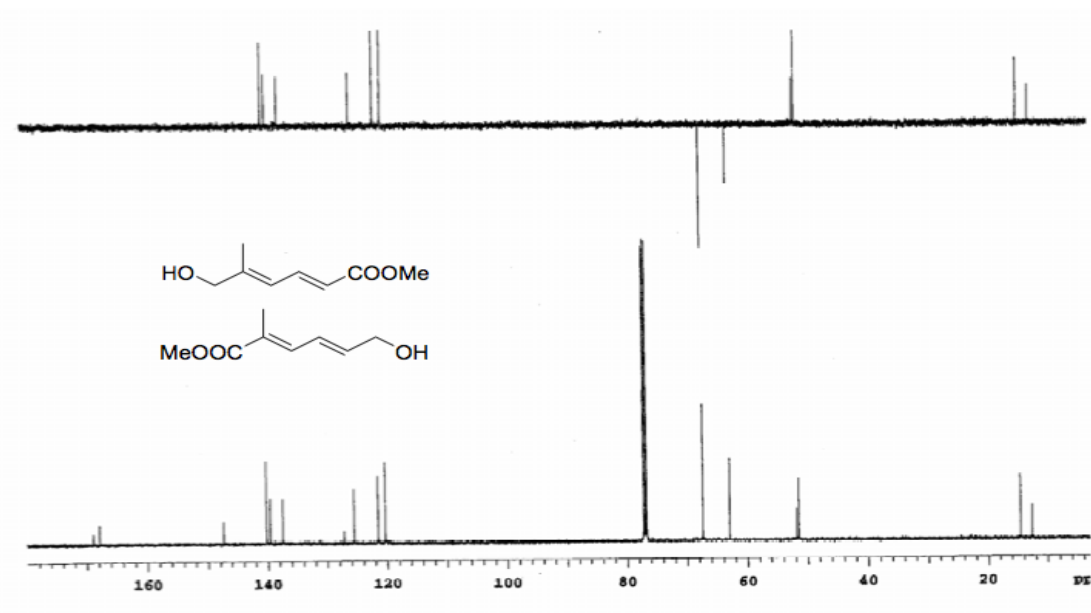
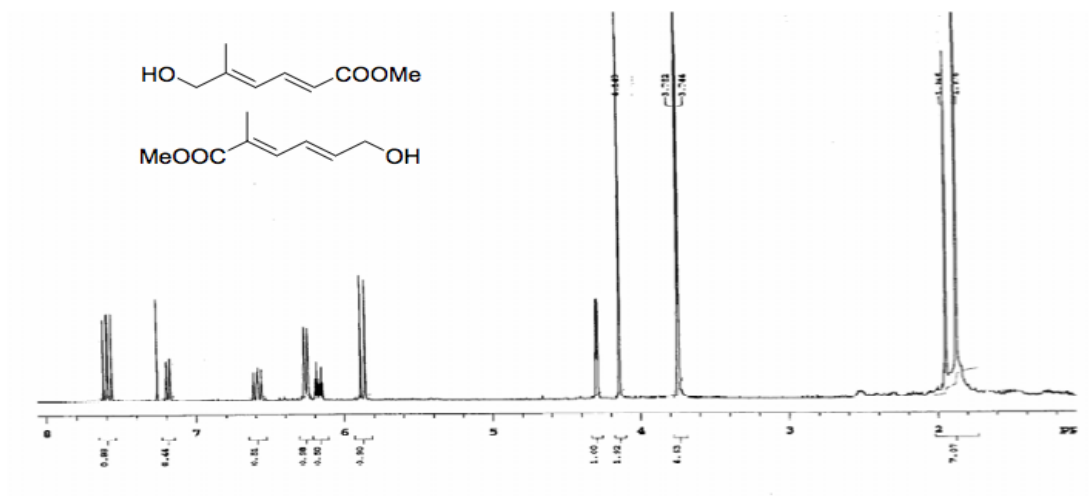
Table of contents	Page
Spectra	S2

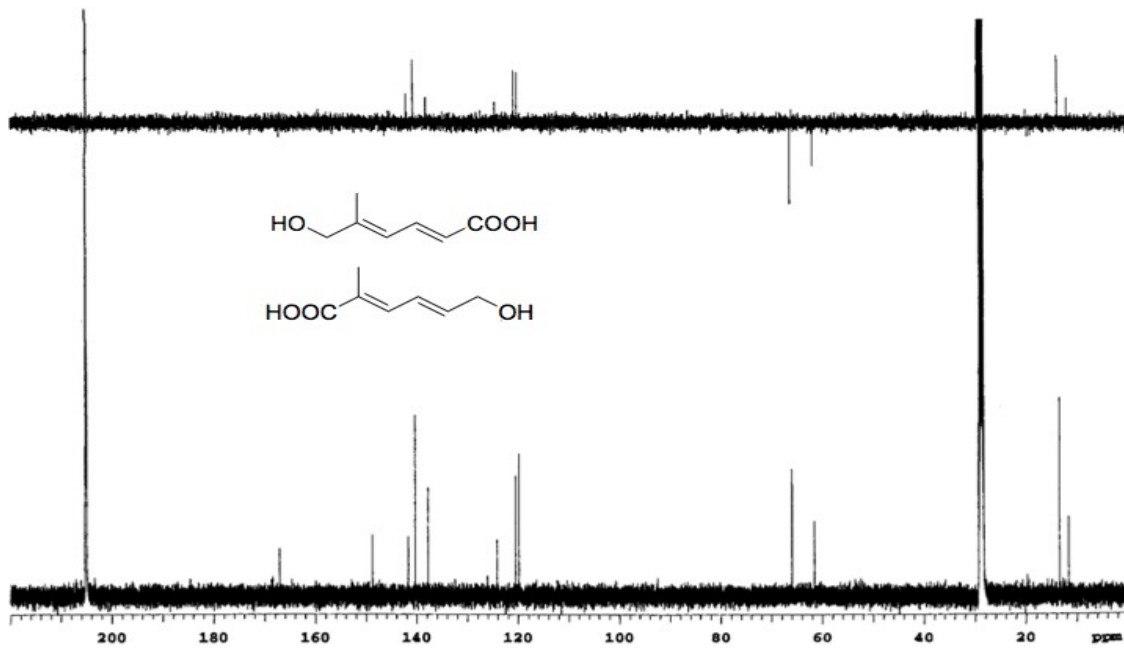
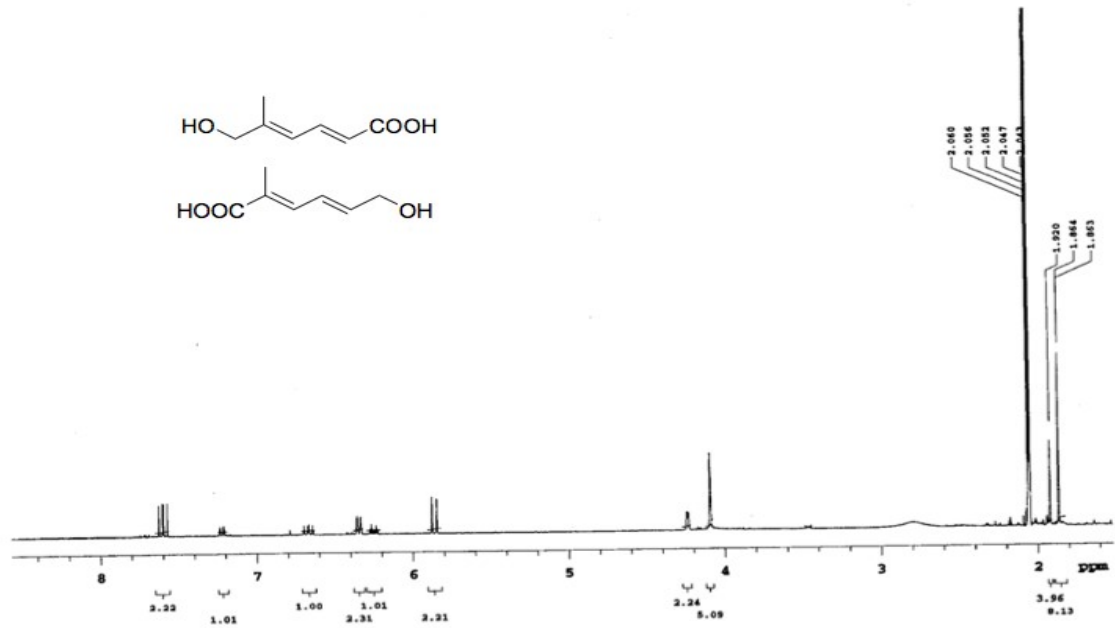
Preparación del medio de cultivo y extracción de trisporoides en ***Blakeslea trispora*:**

Se cultivó esporas de las especies silvestres de *Blakeslea trispora* F986 (+) y F921 (-). Antes de preparar el medio de cultivo líquido (1 litro) es necesario hacer una disolución de 0.7 g. de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 250 ml de agua destilada y añadir unas gotas de cloroformo para posteriormente esterilizar en un autoclave y guardar a temperatura ambiente; y otra disolución acuosa de 25 mg de tiamina, 50 mg de ácido cítrico monohidratado, 37.5 mg de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, 25 mg de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 7.5 mg de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1.25 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y 1.25 mg de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 250 ml de agua destilada. Se vuelve a añadir unas gotas de cloroformo y guardar la botella en un lugar protegido de la luz solar a temperatura ambiente.

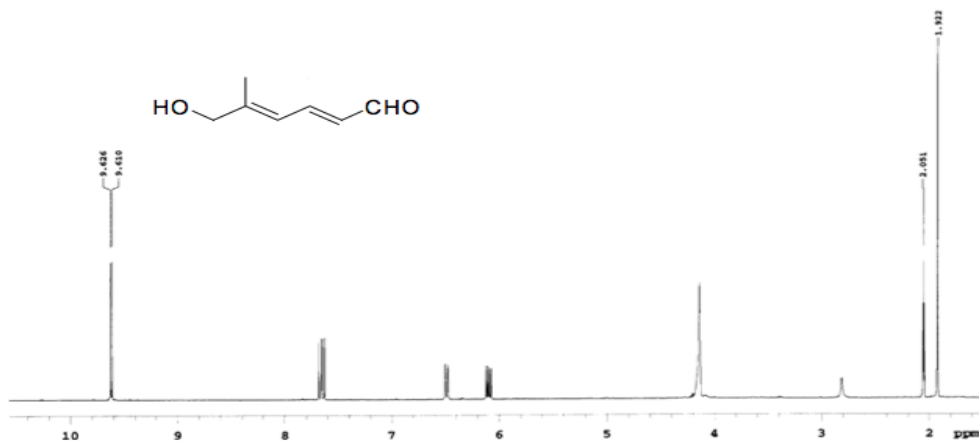
Para hacer el medio de cultivo, se hacen dos disoluciones por separado; una de ellas debe contener 20 g. de glucosa, 1 g. de extracto de levadura y 500 ml de agua destilada en un matraz de 1 litro; y por otra parte, 2 g. de L-asparagina, 5 g. de KH_2PO_4 , 0.5 g. de $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 ml de cada disolución preparada anteriormente y 480 ml de agua destilada en un matraz de 500 ml. Finalmente, se esterilizan en un autoclave las dos disoluciones por separado y se mezclan ambas.

A continuación, se siembran 5×10^3 esporas/ml de cada sexo para el cultivo mixto y 10^4 esporas/ml para los cultivos individuales en matraces de 250 ml con 25 ml de medio líquido cada uno. Se incuban los matraces durante 3 días, con agitación, en oscuridad y a 30 °C. Pasados esos días, se extraen con acetato de etilo en dos pasos, a pH 8 y a pH 2 para separar los metabolitos neutros y ácidos respectivamente. Primeramente, se satura la disolución con NaCl y se ajusta el pH a 8 con NaOH 1M extrayéndose en un embudo de decantación la fase orgánica y repitiendo el proceso cuatro veces. Seguidamente, se hace lo mismo esta vez llevando las aguas madres hasta pH 2 con HCl 1M y extrayendo cuatro veces. Se evaporan ambas fracciones y se analizan tanto por RMN como por HPLC semipreparativo y analítico. Para evitar que se queden retenidos los metabolitos ácidos en la columna de HPLC, esta fracción se metila con trimetilsilildiazometano (TMSCHN_2) previamente.

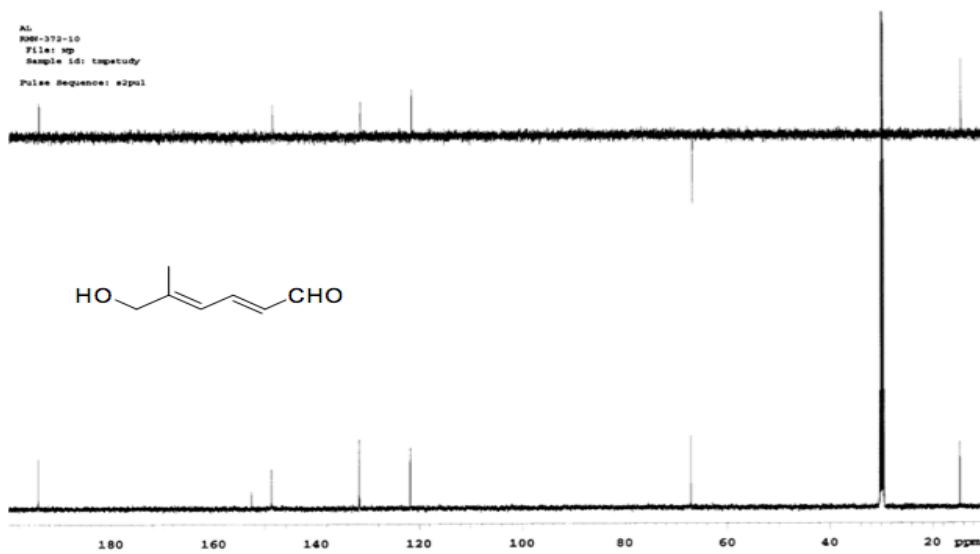


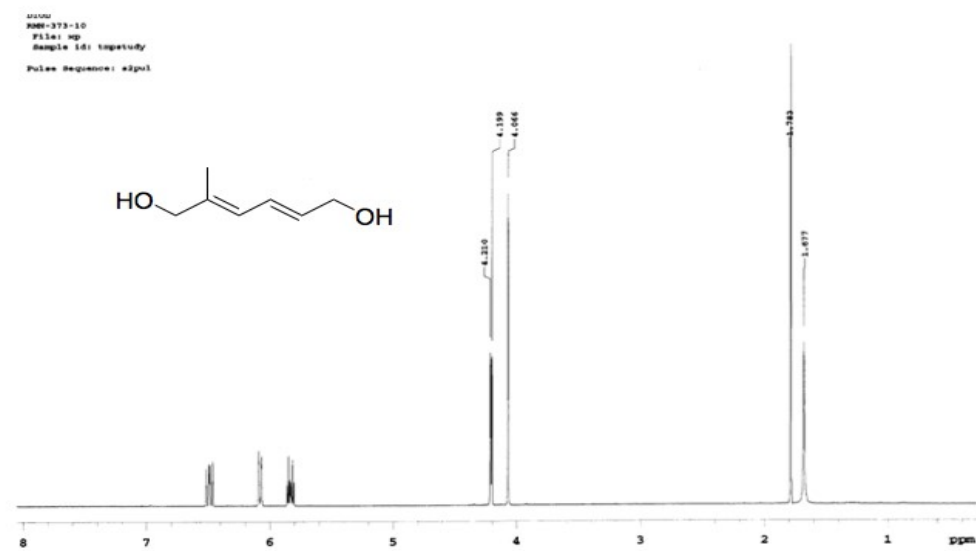
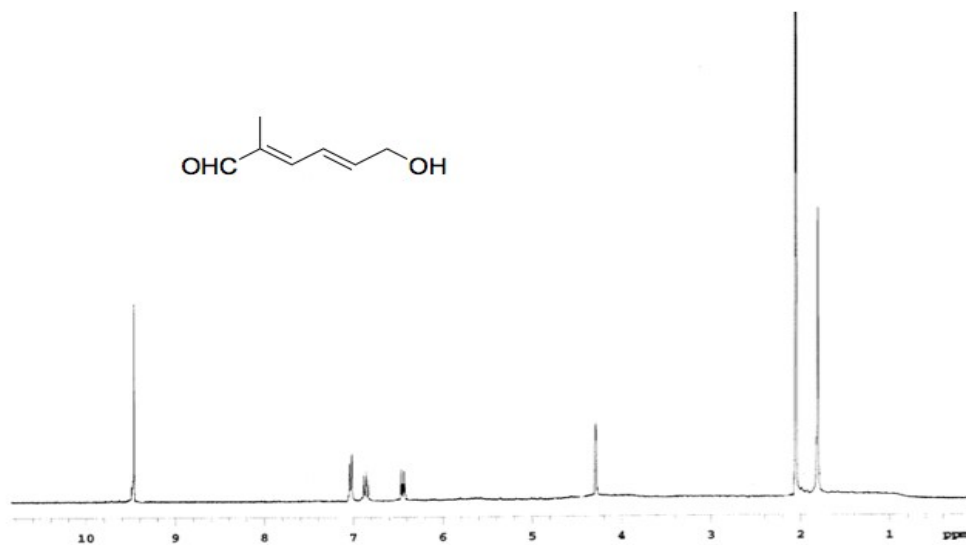


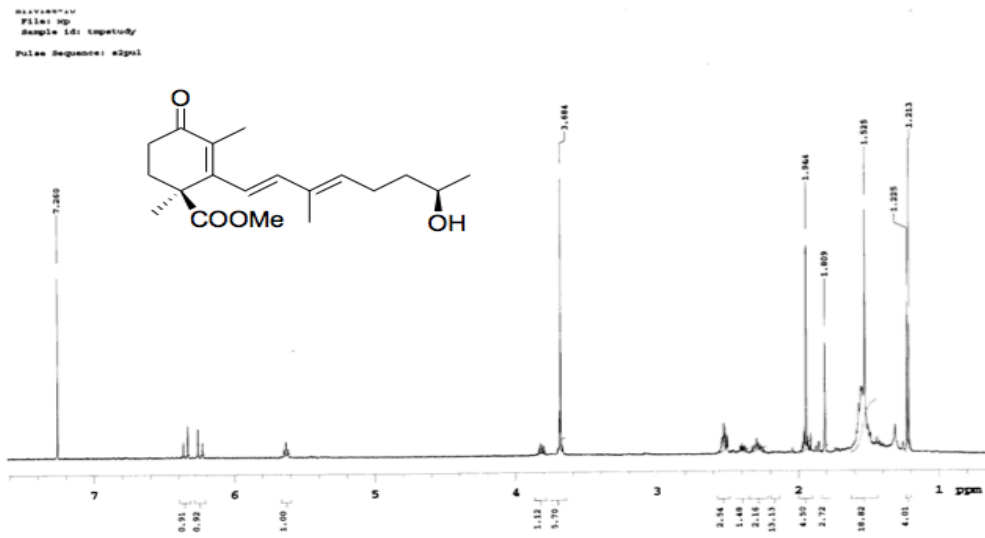
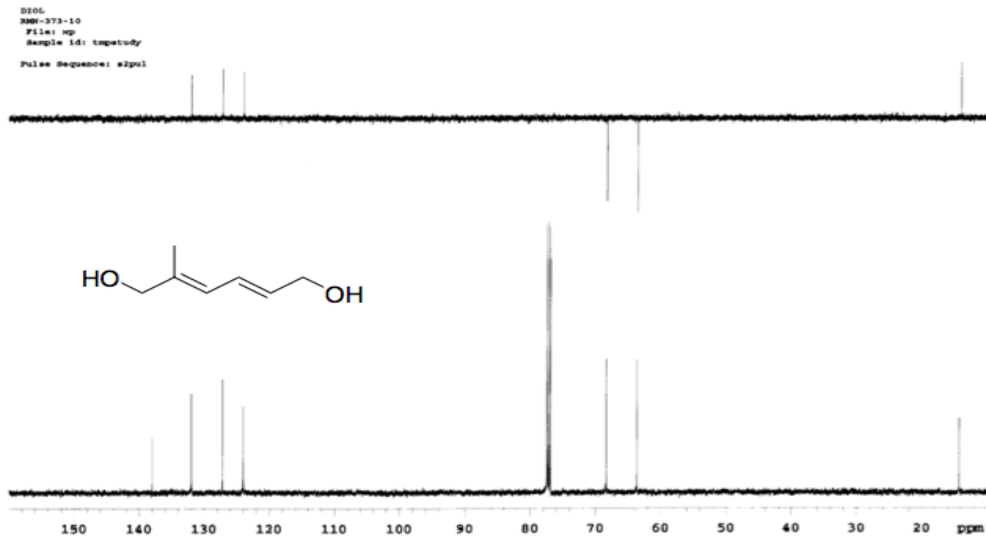
RM-373-10
File: mp
Sample ID: tmpstudy
Pulse Sequence: s2pul

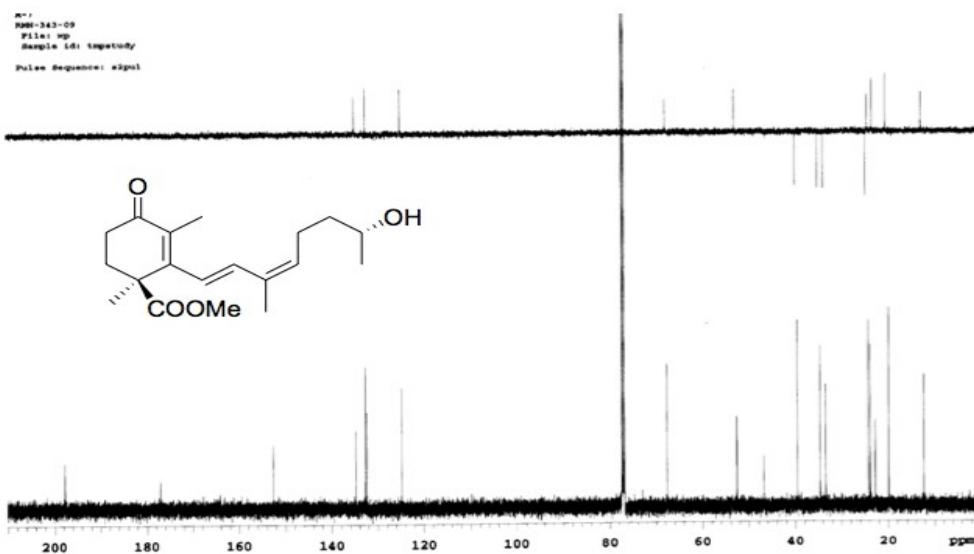
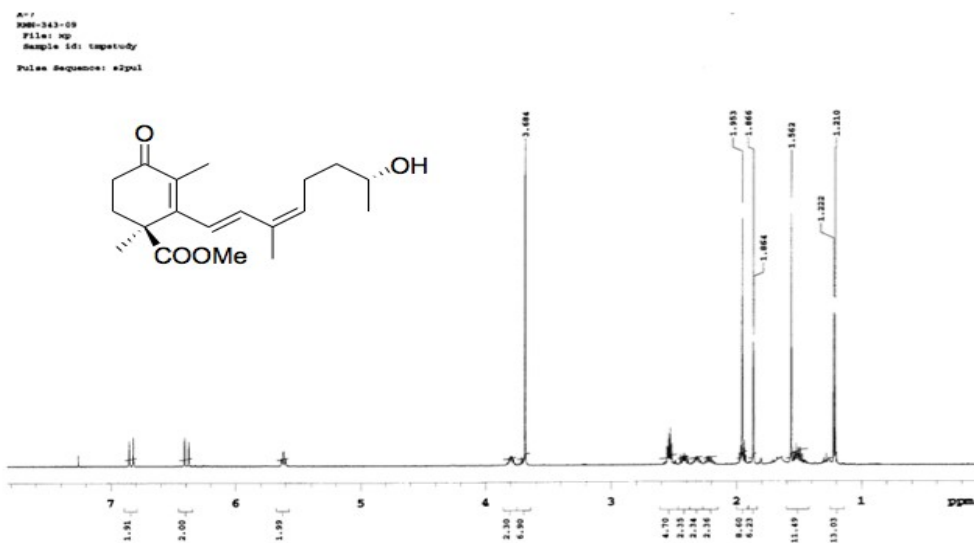


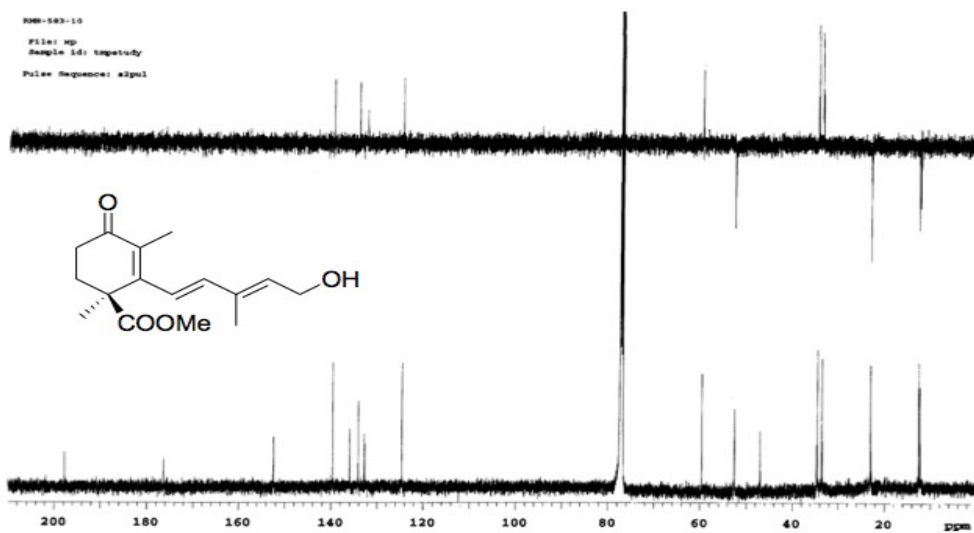
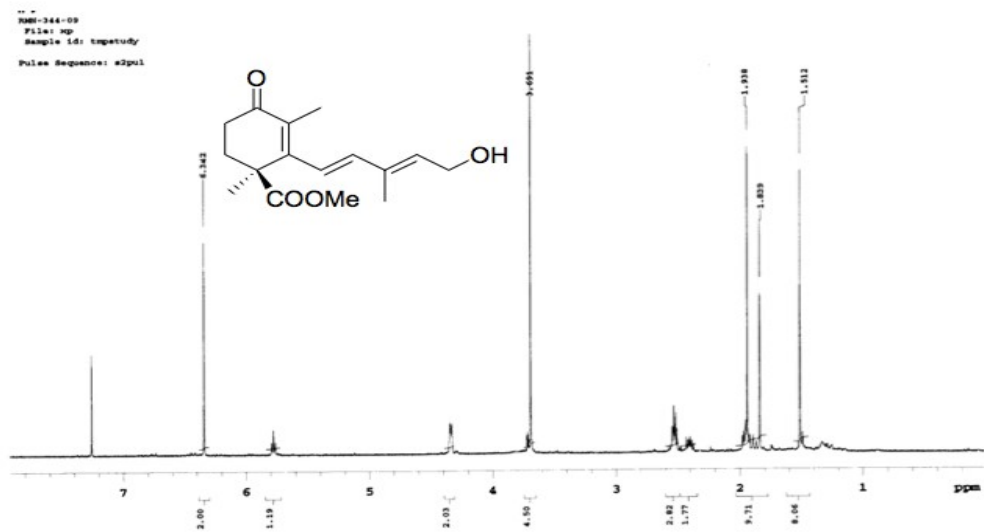
AL
RM-373-10
File: mp
Sample ID: tmpstudy
Pulse Sequence: s2pul

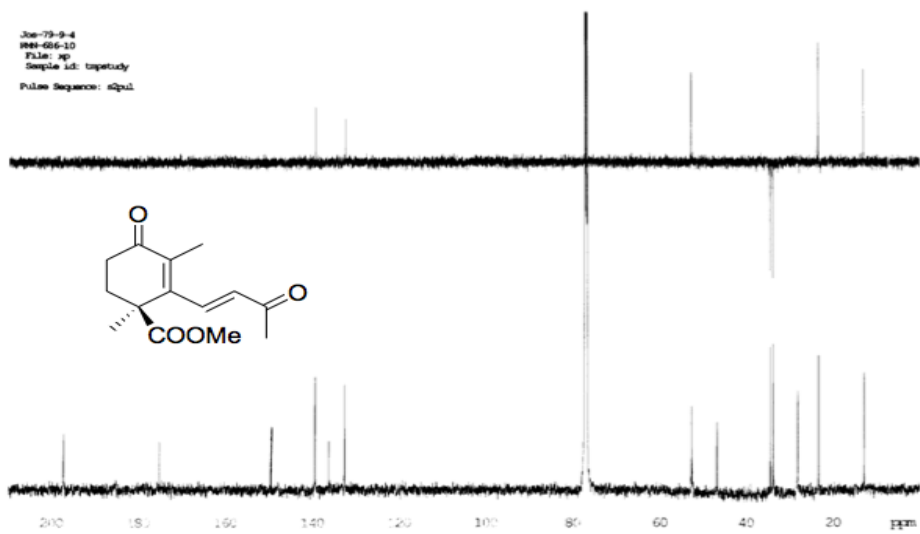
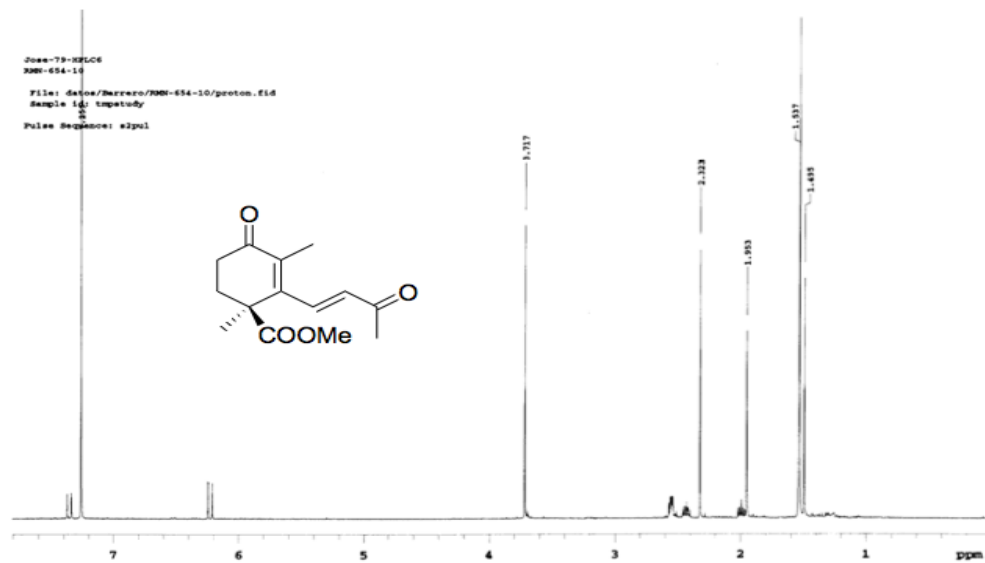


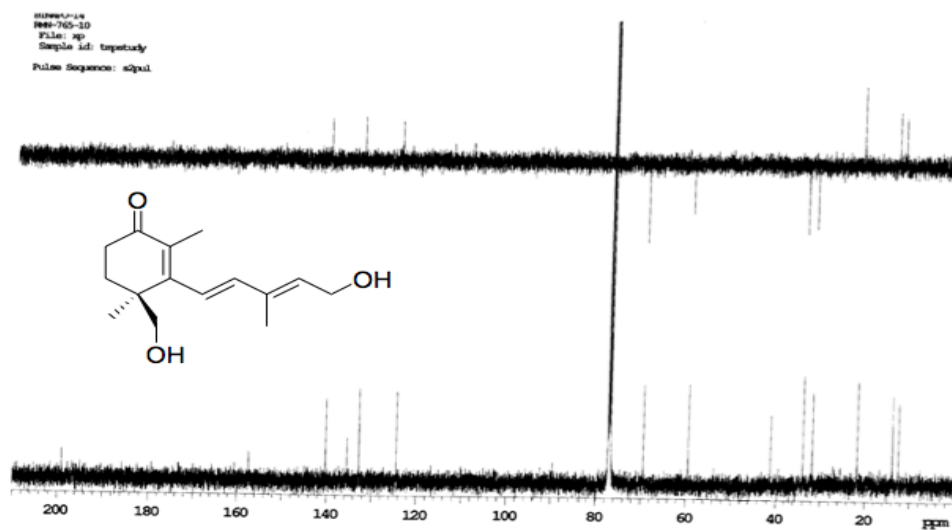
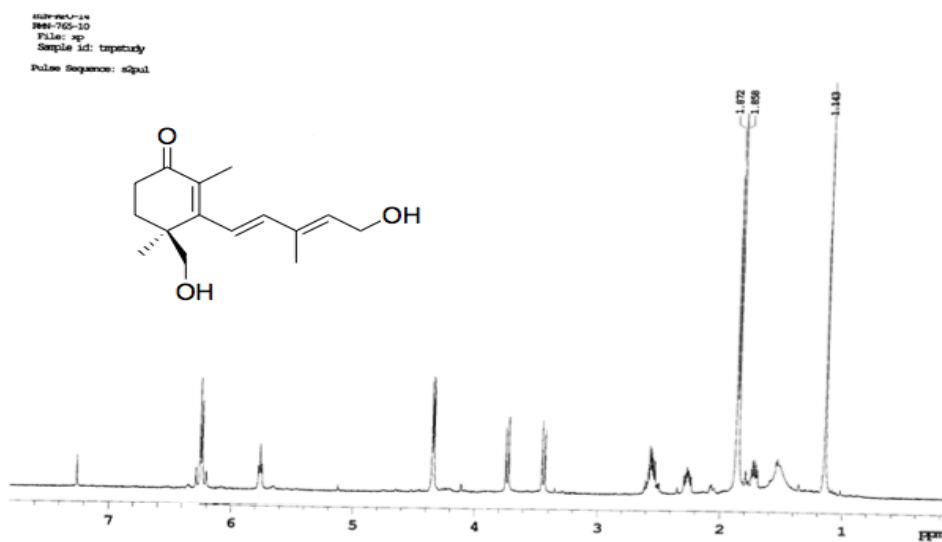


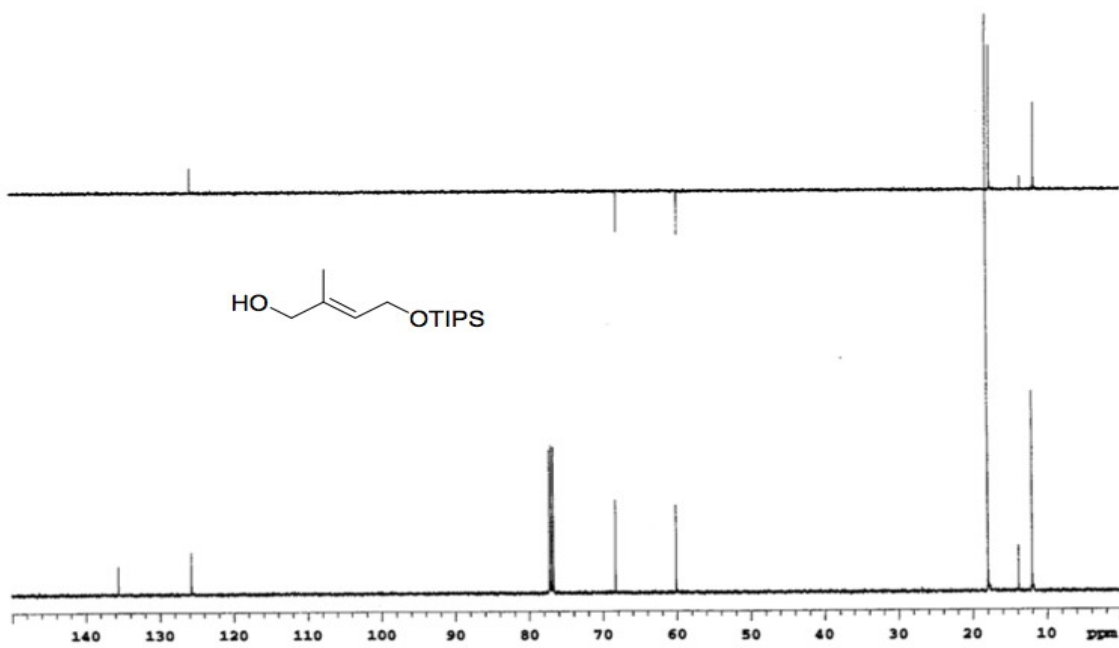
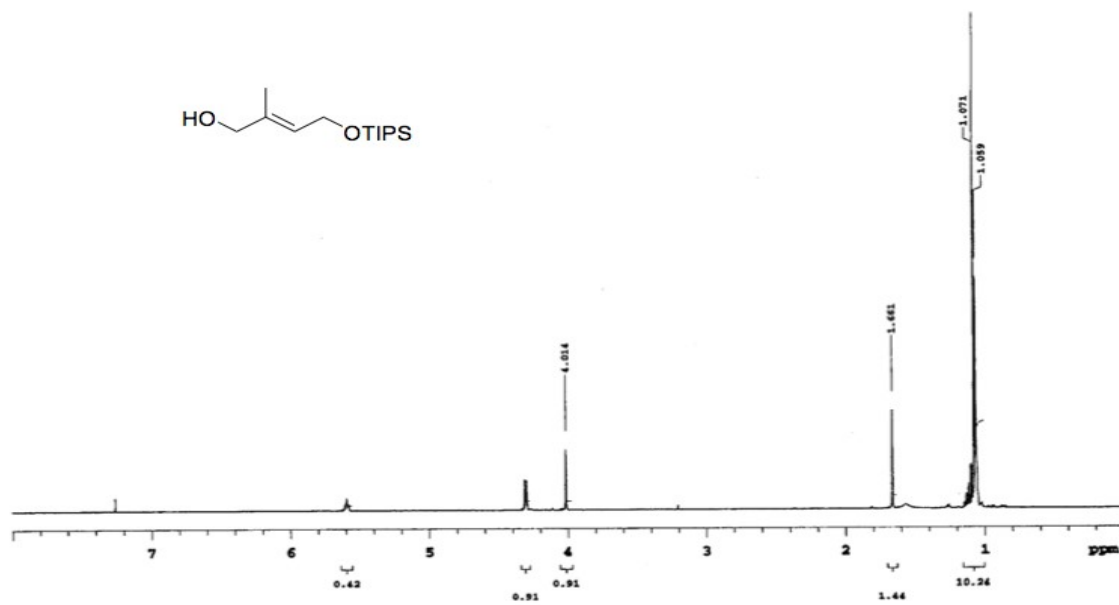




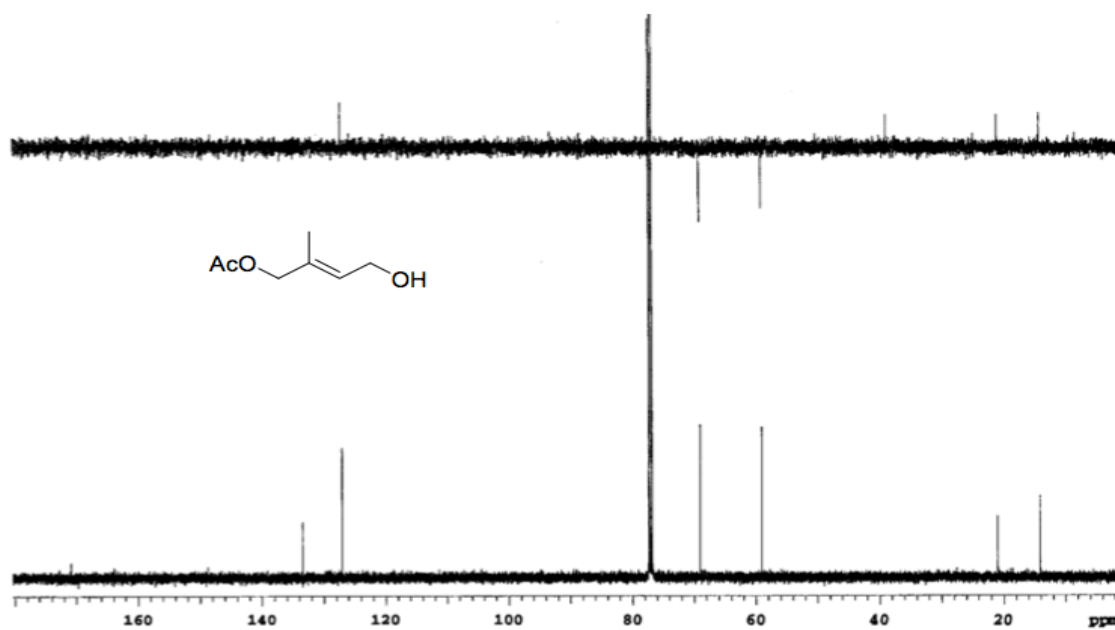
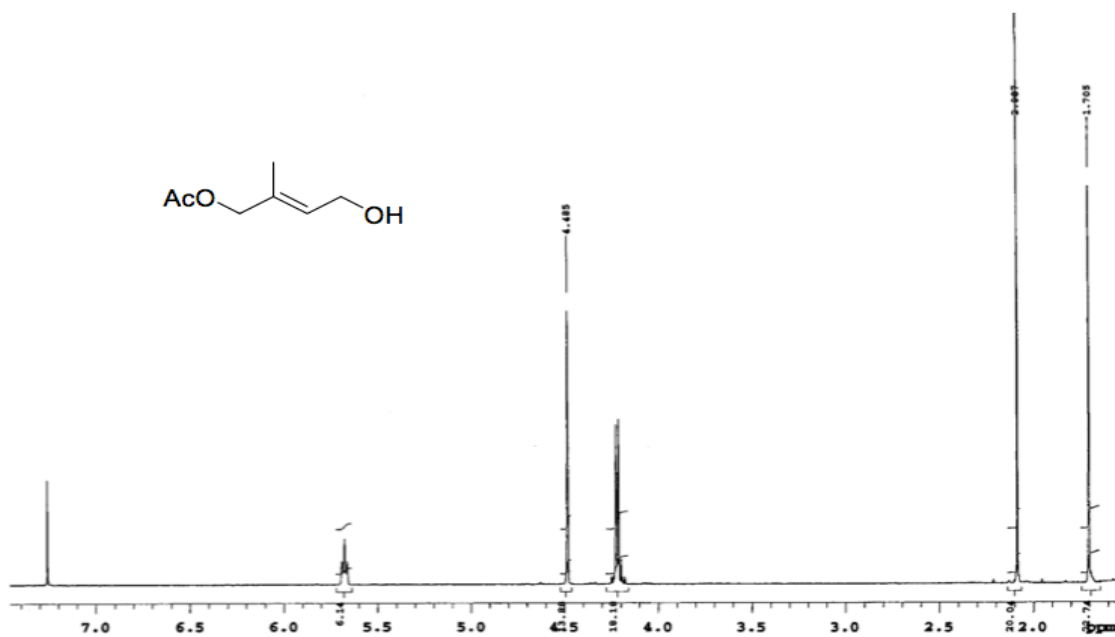




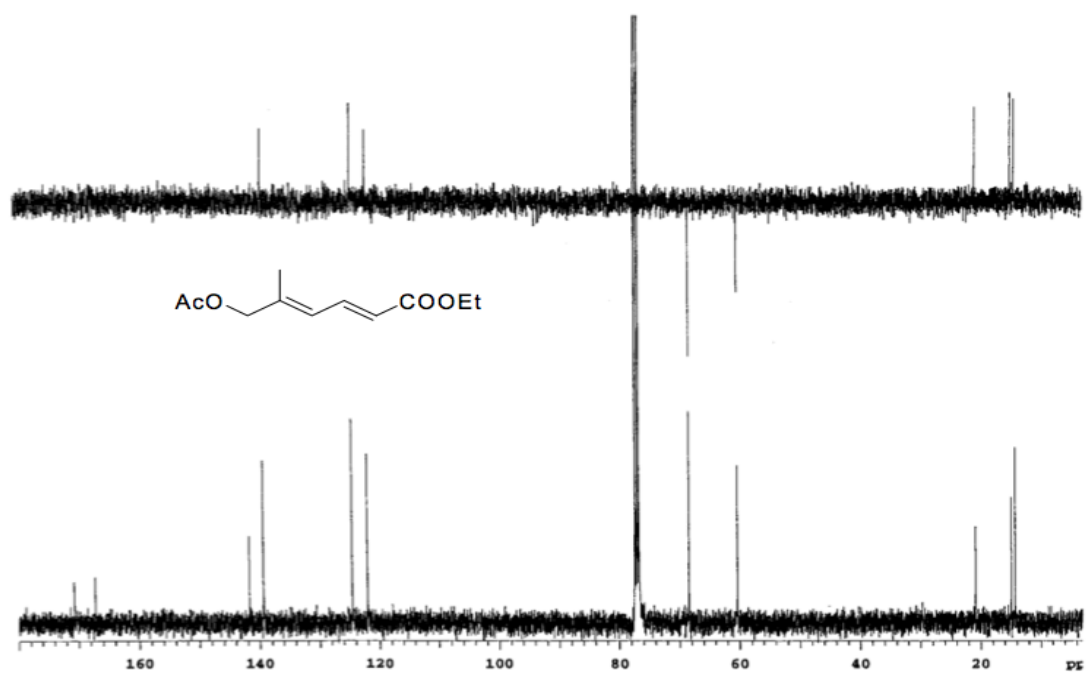
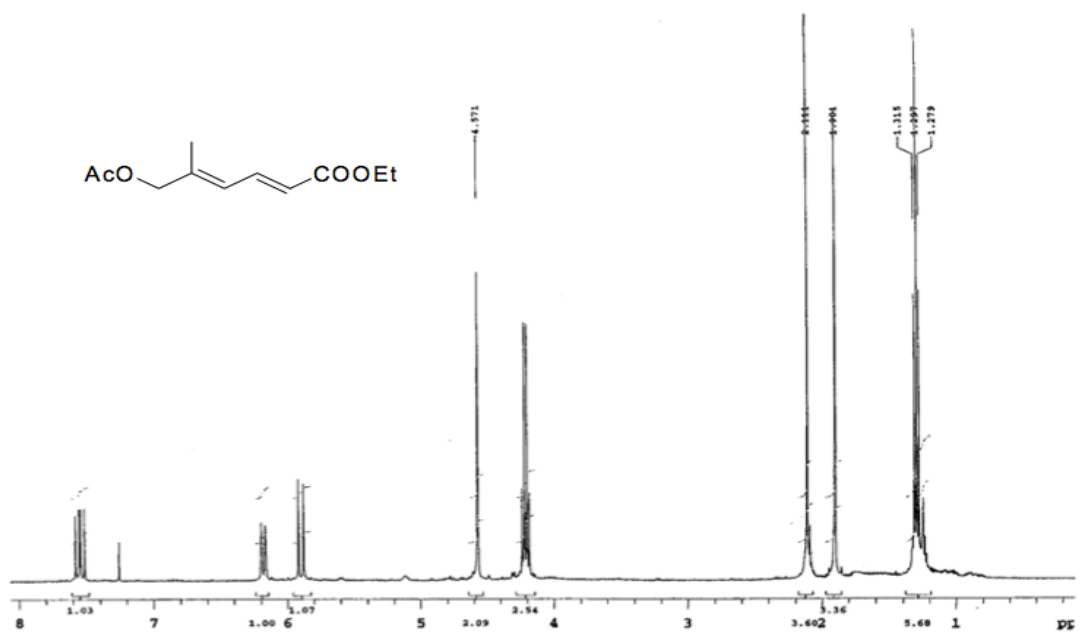


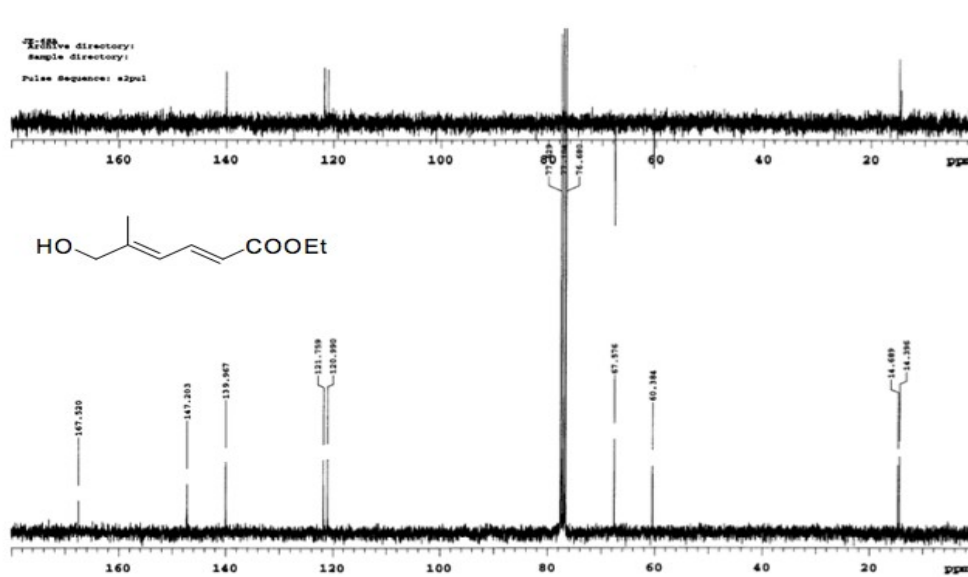
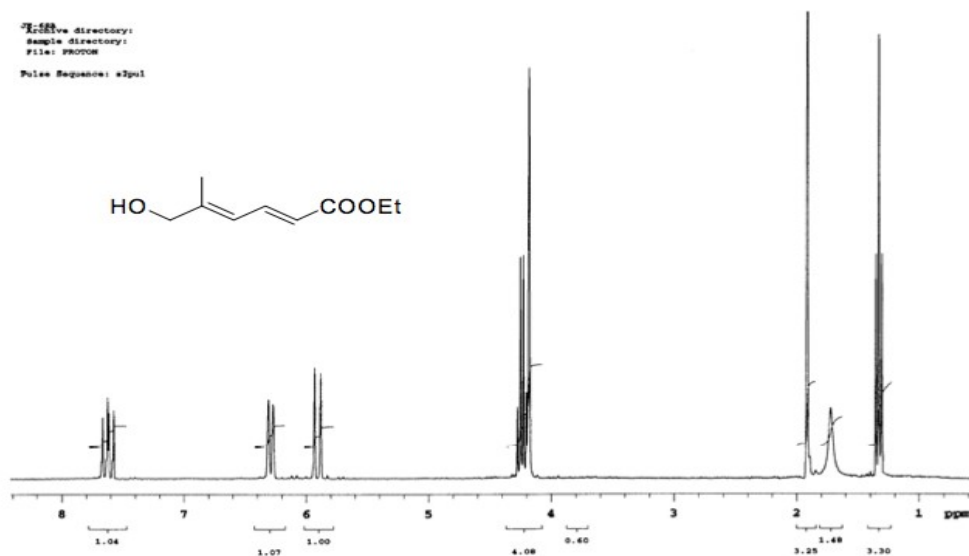


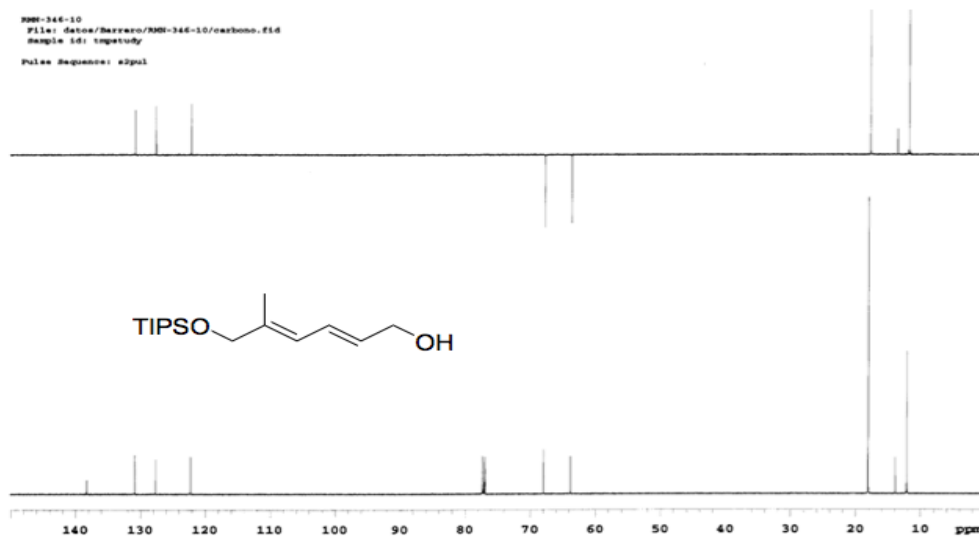
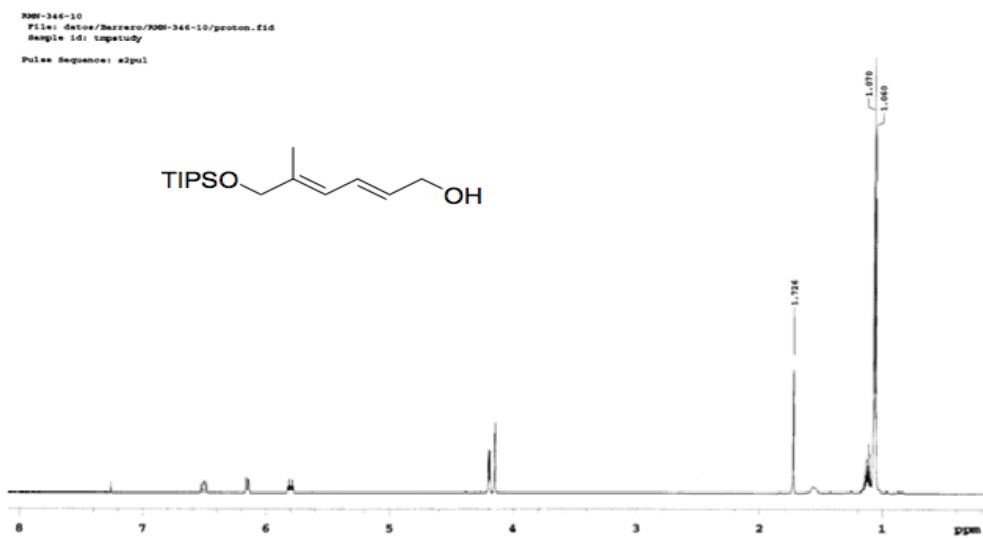
S12

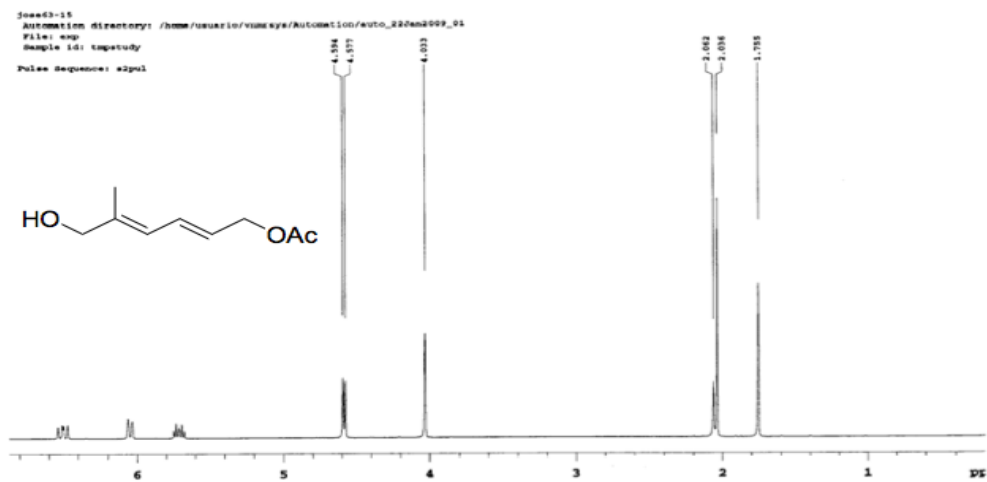


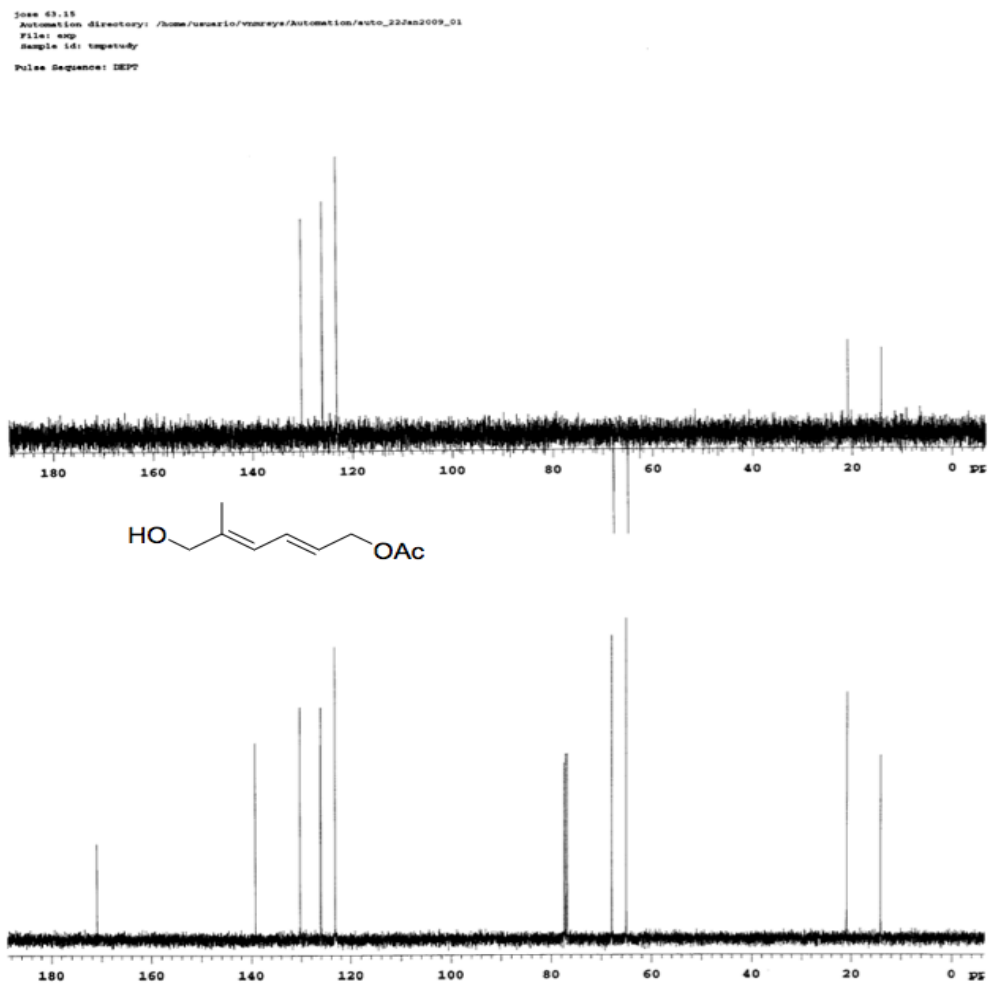
S13











ANEXO 2

Preparación del medio de cultivo y extracción de trisporoides en *Phycomyces blakesleeanus*.

Se cultivó esporas de las especies silvestres de *Blakeslea trispora* A56 (+) y NRRL1555 (-). Antes de preparar el medio de cultivo líquido (1 litro) es necesario hacer una disolución de 0.7 g. de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 250 ml de agua destilada y añadir unas gotas de cloroformo para posteriormente esterilizar en un autoclave y guardar a temperatura ambiente; y otra disolución acuosa de 25 mg de tiamina, 50 mg de ácido cítrico monohidratado, 37.5 mg de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, 25 mg de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 7.5 mg de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1.25 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y 1.25 mg de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 250 ml de agua destilada. Se vuelve a añadir unas gotas de cloroformo y guardar la botella en un lugar protegido de la luz solar a temperatura ambiente.

Para hacer el medio de cultivo, se hacen dos disoluciones por separado; una de ellas debe contener 20 g. de glucosa, 1 g. de extracto de levadura y 500 ml de agua destilada en un matraz de 1 litro; y por otra parte, 2 g. de L-asparagina, 5 g. de KH_2PO_4 , 0.5 g. de $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 ml de cada disolución preparada anteriormente y 480 ml de agua destilada en un matraz de 500 ml. Finalmente, se esterilizan en un autoclave las dos disoluciones por separado y se mezclan ambas.

A continuación, se siembran 5×10^3 esporas/ml de cada sexo para el cultivo mixto y 10^4 esporas/ml para los cultivos individuales en matraces de 250 ml con 25 ml de medio líquido cada uno. Se incuban los matraces durante 5 días, con agitación, en oscuridad y a 22 °C. Pasados esos días, se extraen con acetato de etilo en dos pasos, a pH 8 y a pH 2 para separar los metabolitos neutros y ácidos respectivamente. Primeramente, se satura la disolución con NaCl y se ajusta el pH a 8 con NaOH 1M extrayéndose en un embudo de decantación la fase orgánica y repitiendo el proceso cuatro veces. Seguidamente, se hace lo mismo esta vez llevando las aguas madres hasta pH 2 con HCl 1M y extrayendo cuatro veces. Se evaporan ambas fracciones y se analizan tanto por RMN como por HPLC semipreparativo y analítico. Para evitar que se queden retenidos los metabolitos

ácidos en la columna de HPLC, esta fracción se metila con trimetilsilildiazometano (TMSCHN₂) previamente.

Supporting Information

Apocarotenoids in the sexual interaction of *Phycomyces*

Silvia Polaino,^a Jose A. Gonzalez-Delgado,^b Pilar Arteaga,^b M. Mar Herrador,^b Alejandro F. Barrero*^b and Enrique Cerdá-Olmedo*^c

^a*Division of Cell Biology and Biophysics, School of Biological Sciences, University of Missouri-Kansas City, MO 64110, USA,* ^b*Department of Organic Chemistry, Institute of Biotechnology, University of Granada, Avda. Fuente Nueva, s/n, 18071 Granada, Spain,* and ^c*Department of Genetics, Faculty of Biology, University of Sevilla, Reina Mercedes, s/n, 41071 Sevilla, Spain,*

afbarre@ugr.es; eco@us.es.

List of Contents for Experimental Section

A simple estimate of the apocarotenoid content	1S
Figure S1	2S
Figure S2	3S
Figure S3	4S
Figure S4	5S
¹ H and ¹³ C NMR Spectra	6S

A simple estimate of the apocarotenoid content

A simple estimate, C , of the increased apocarotenoid content was calculated as $C = B - kA$, where B is the absorbance at 328 nm in mated cultures, A is their maximum absorption near 260 nm, and k is the quotient between the respective values, B' and A' , in single cultures (Figure S1). The k values were 0.048 ± 0.005 for cultures on minimal agar and 0.071 ± 0.007 for cultures on enriched agar (mean and

standard deviation of the distribution in 8 independent experiments with the wild-type cultures in each case). This difference reflected the differences in the composition of agar media.

The C value was 0.37 ± 0.03 in 12 mated cultures of the wild types and 0.011 ± 0.003 in 19 mated cultures of the *carB* mutant strains (means and standard error). These values were independent of the media (minimal or enriched agar) and the strains (NRRL1555, NRRL1554, and A56).

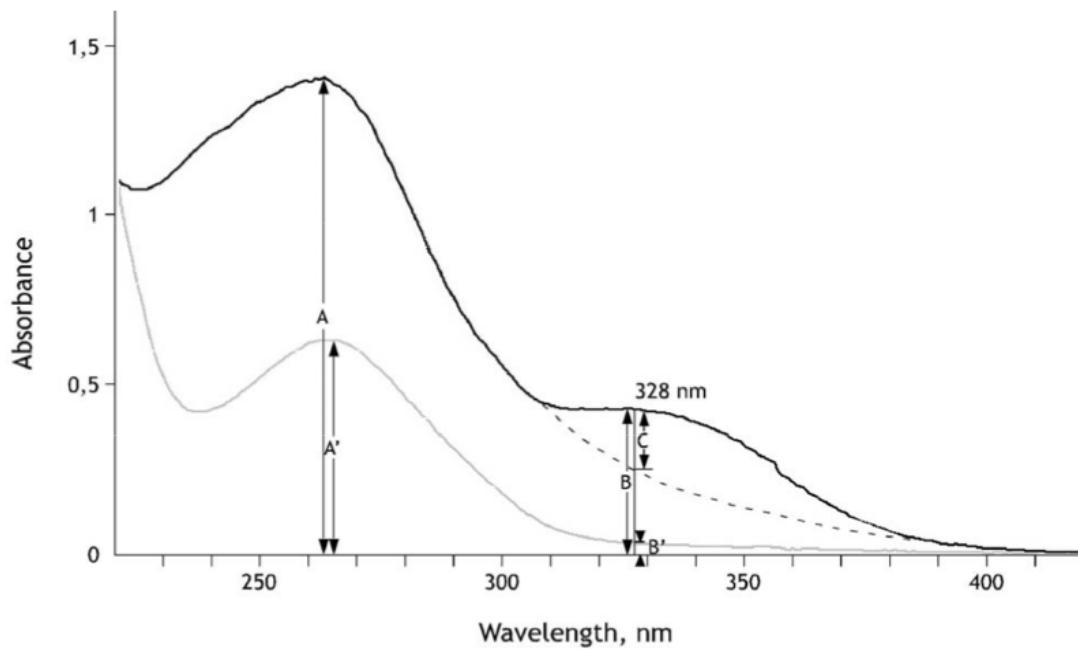


Figure S1. Absorption spectra of culture media of wild-type strains A56 and NRRL1555 grown together for five days on minimal agar (mated culture, thick line), and NRRL1555 was grown alone in the same way (single culture, thin line). A and A' are the maximum absorbances (at about 260 nm); B and B' are the absorbances at 328 nm.

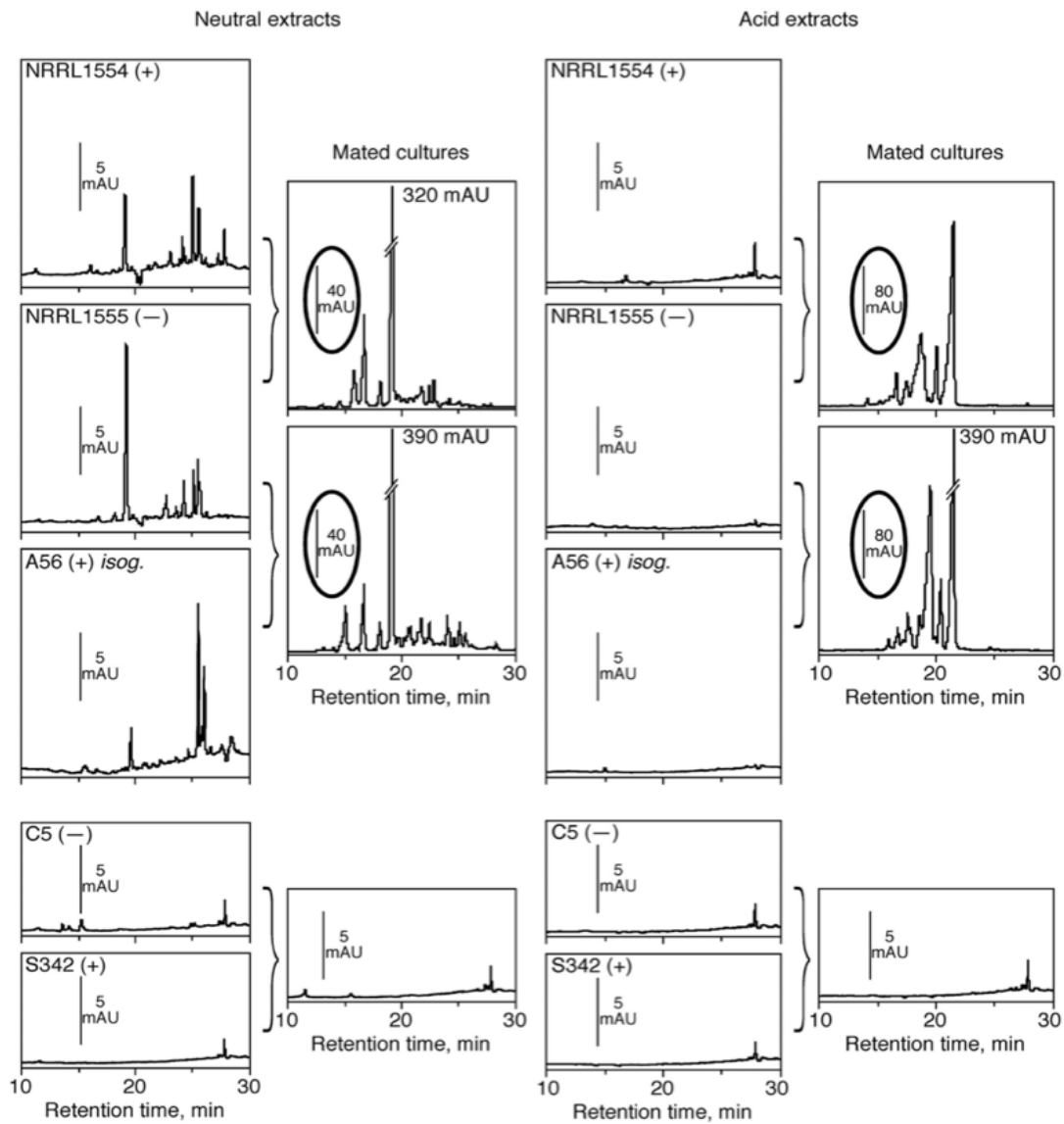


Figure S2. Chromatograms of neutral and acid extracts of single and mated cultures of the wild types NRRL1554, NRRL1555 and A56 and the *carB* mutants C5 and S342, unable to produce β -carotene. The ordinates represent the absorbance at 328 nm in milliunits. Note the changes of scale. The sex, (+) or (-), is indicated for each strain.

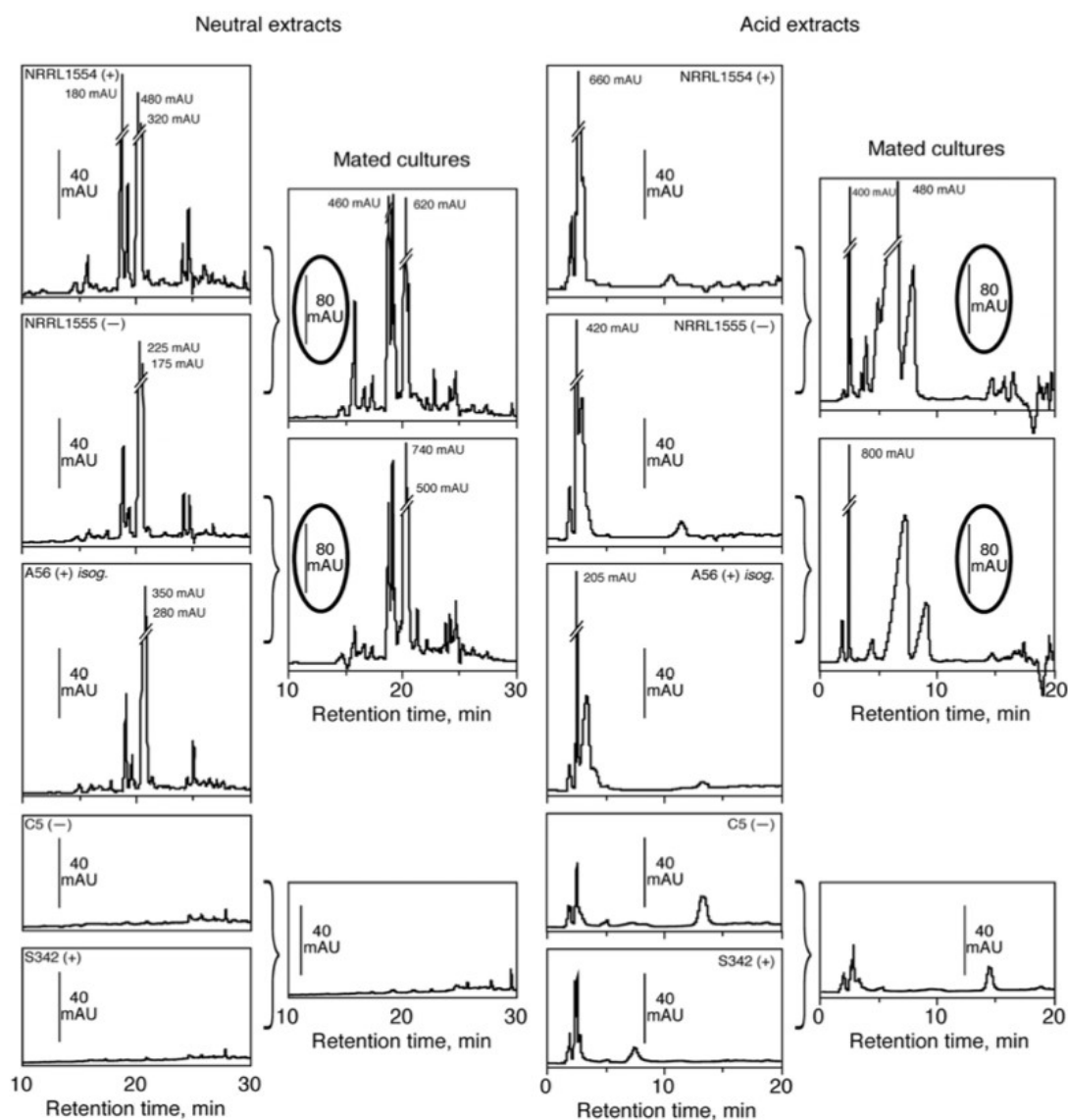


Figure S3. Chromatograms of neutral and acid extracts of single and mated cultures of the wild-types NRRL1554, NRRL1555 and A56 and the *carB* mutants C5 and S342, unable to produce β -carotene. The ordinates represent the absorbance at 280 nm in milliunits. Note the changes of scale. The sex, (+) or (-), is indicated for each strain.

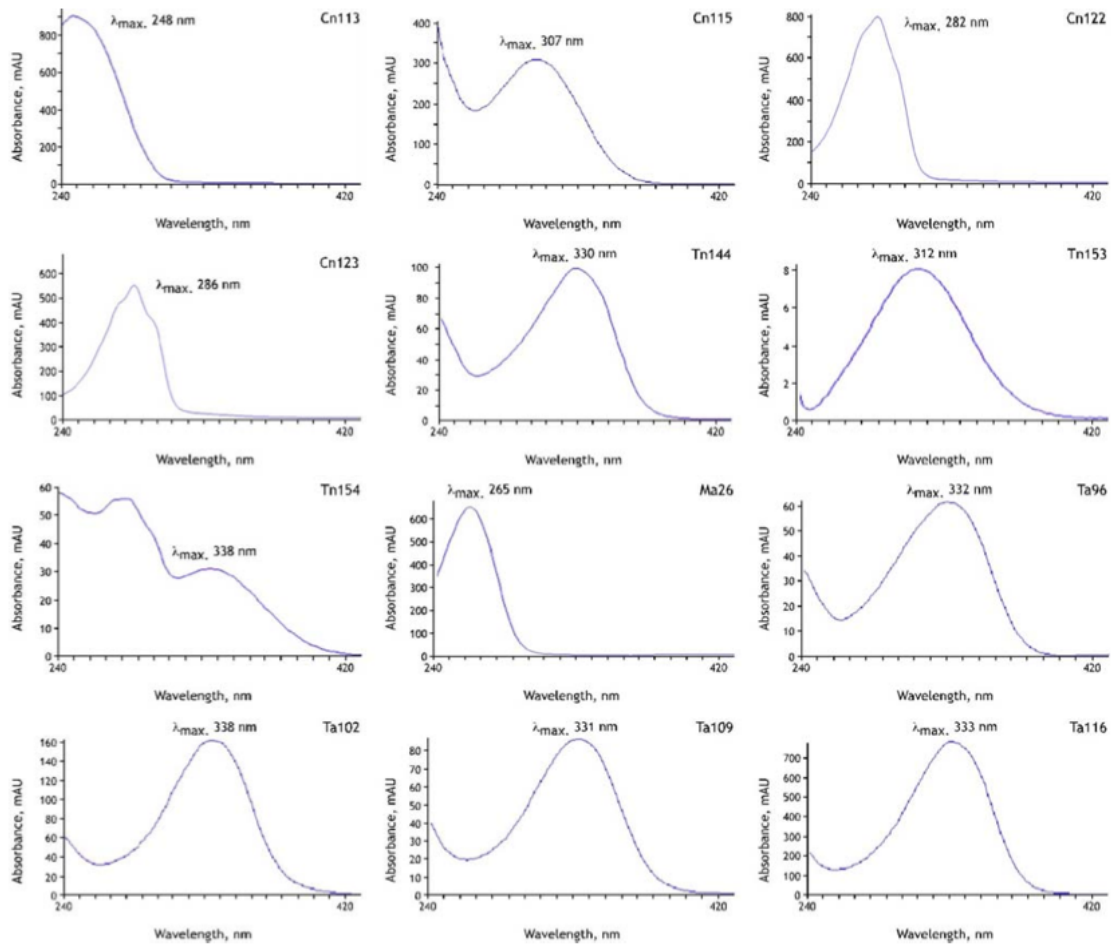
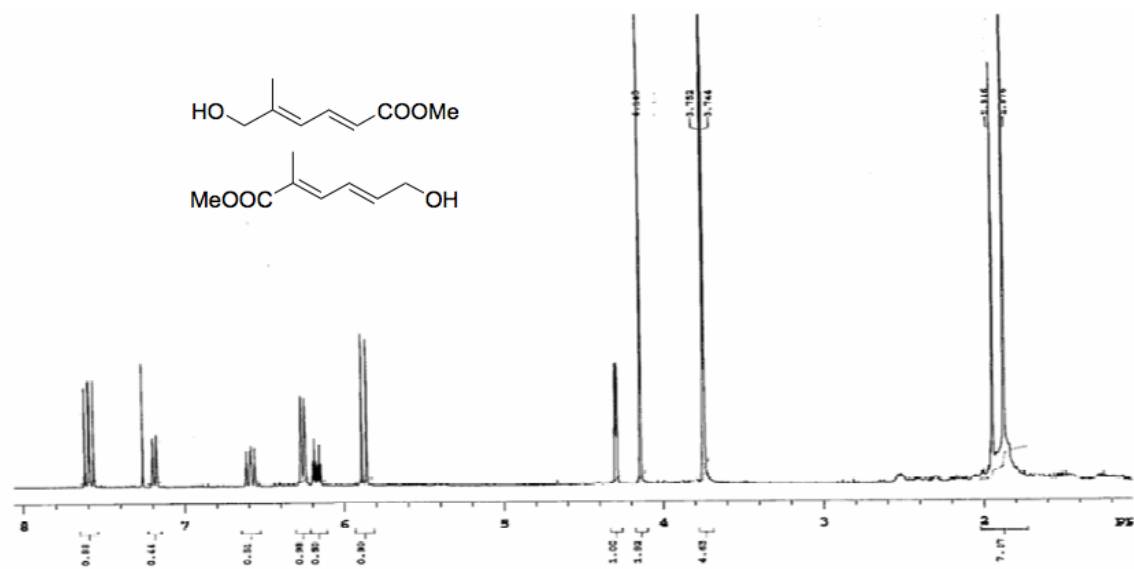
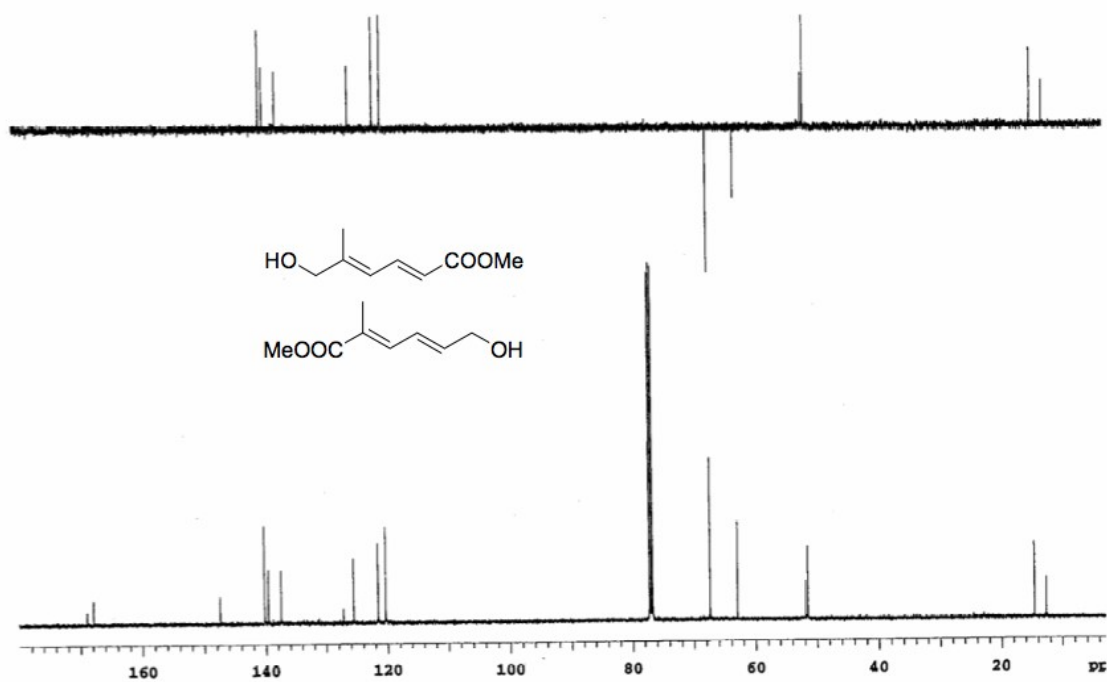
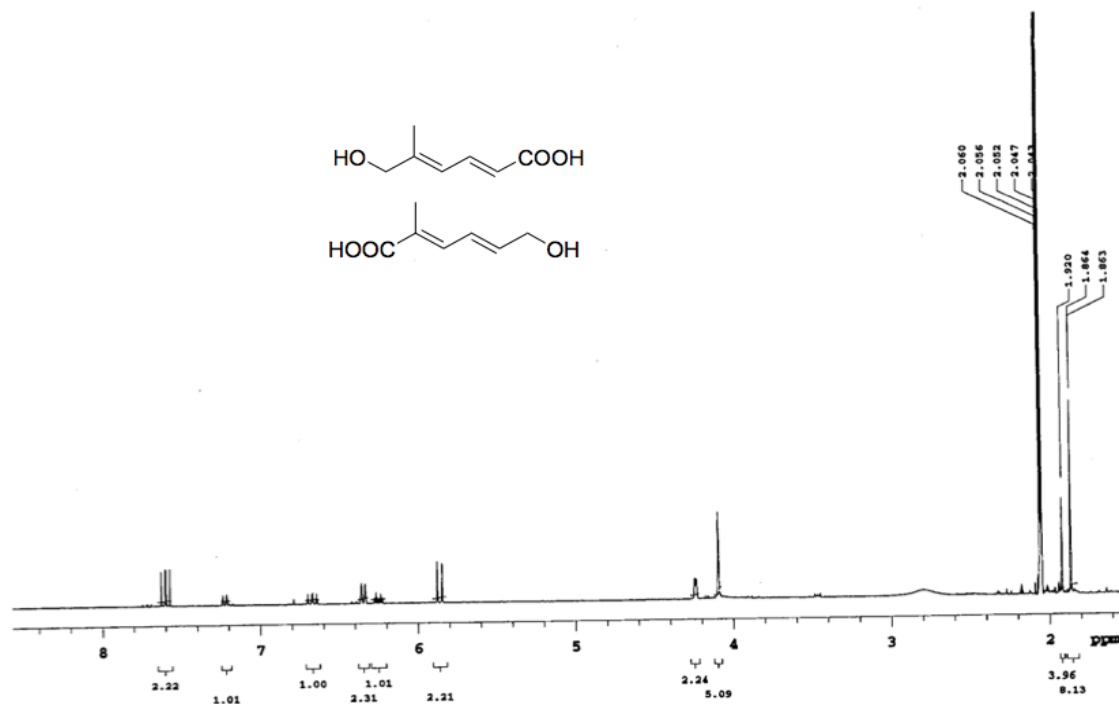


Figure S4. Absorption spectra of the apocarotenoids as eluted from the HPLC column.

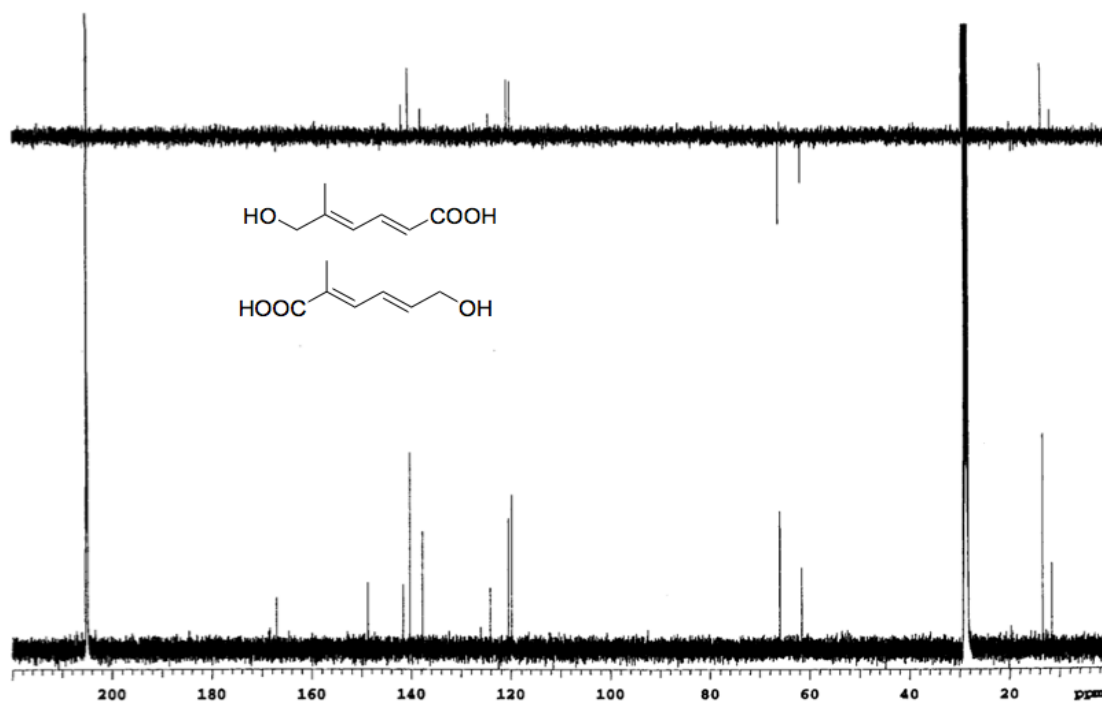


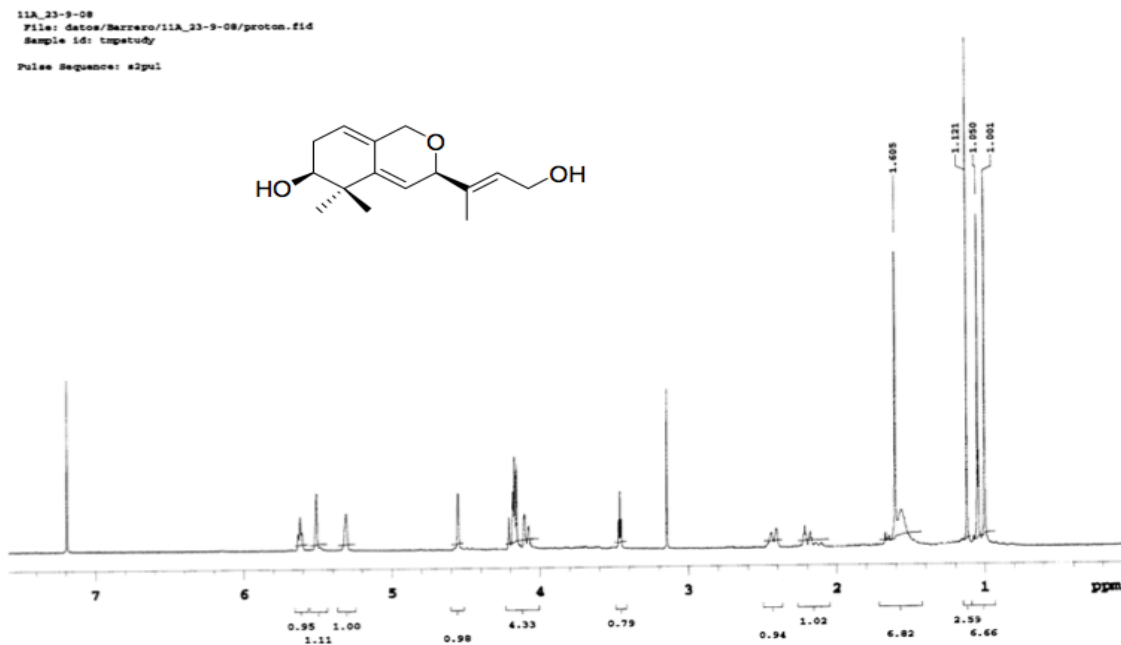
Spectrum ^1H NMR of 4a + 5a

Spectrum ^{13}C NMR of **4a** + **5a**

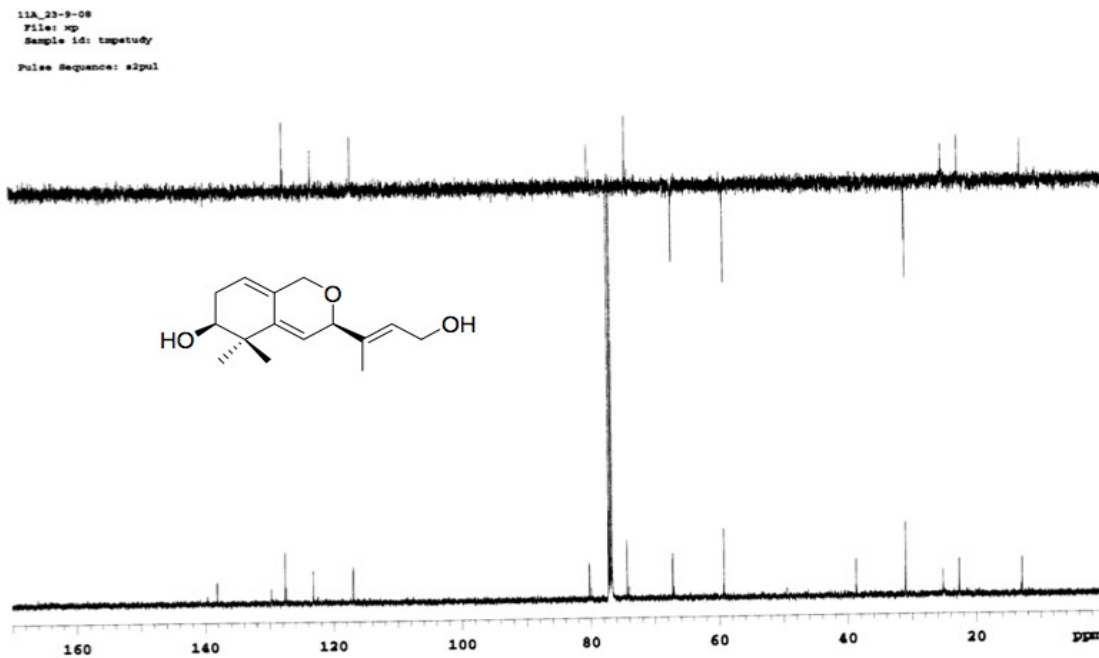


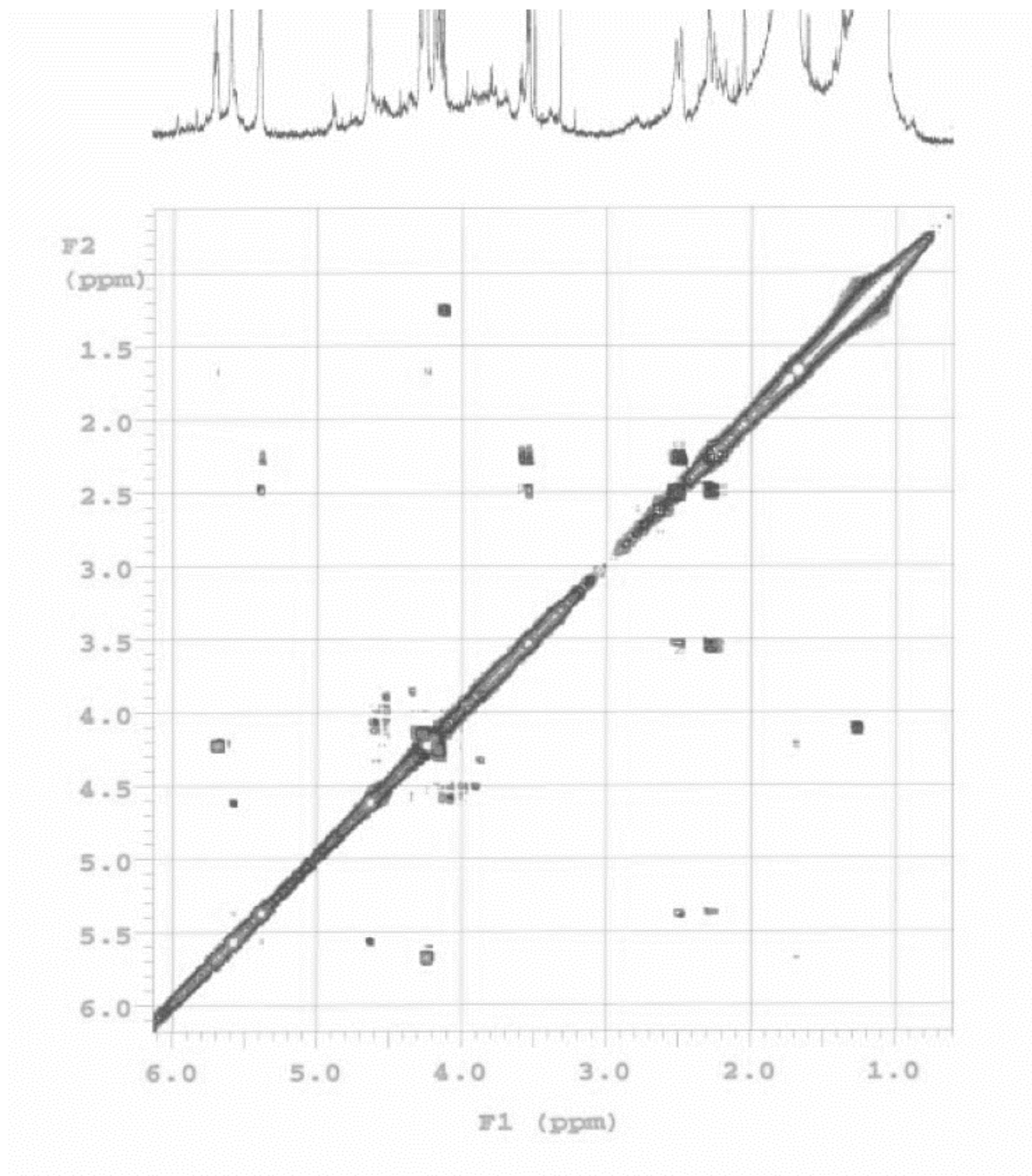
Spectrum $^1\text{H NMR}$ of 4 + 5

Spectrum ¹³C NMR of 4 + 5

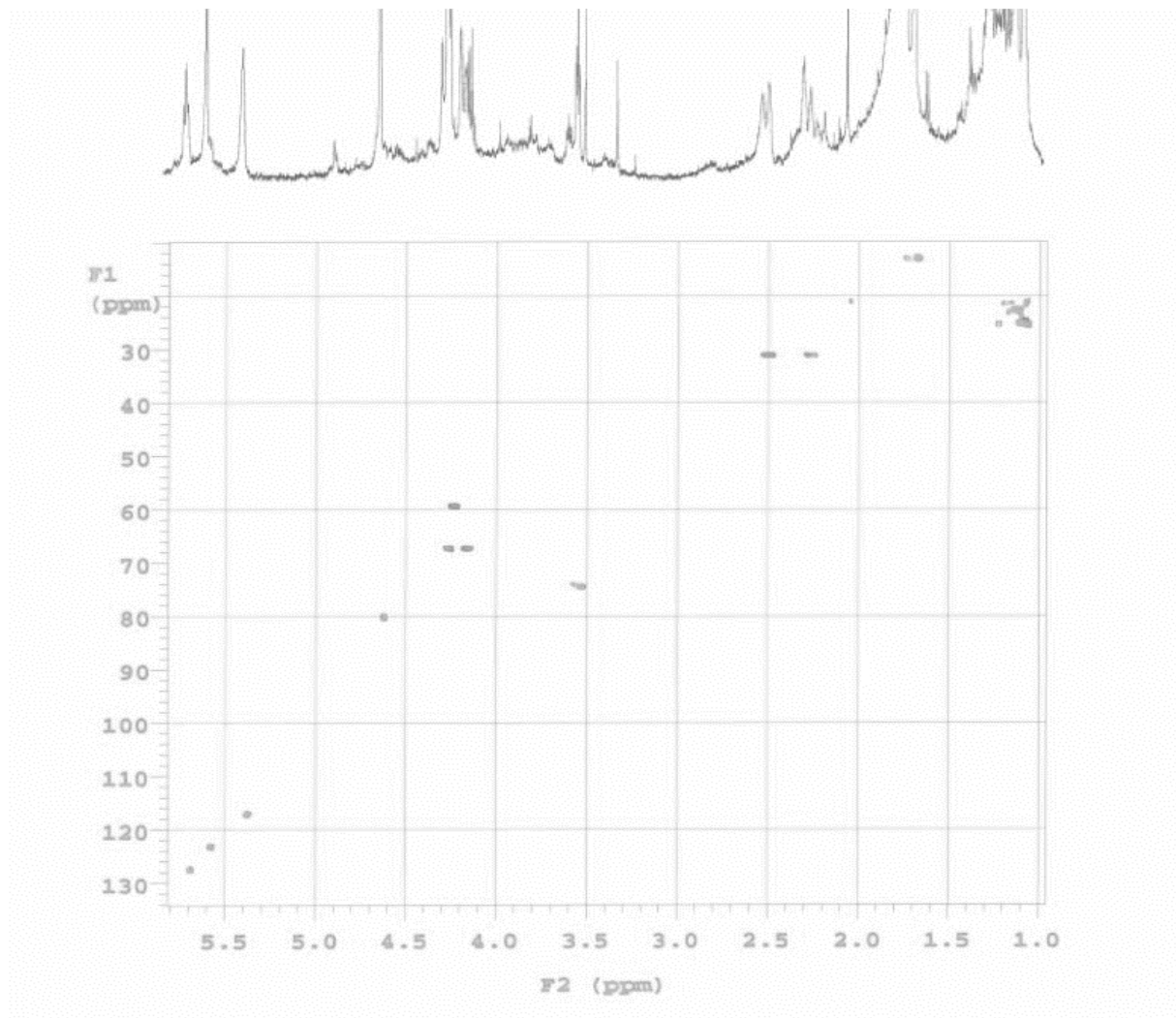


Spectrum ^1H NMR of 6

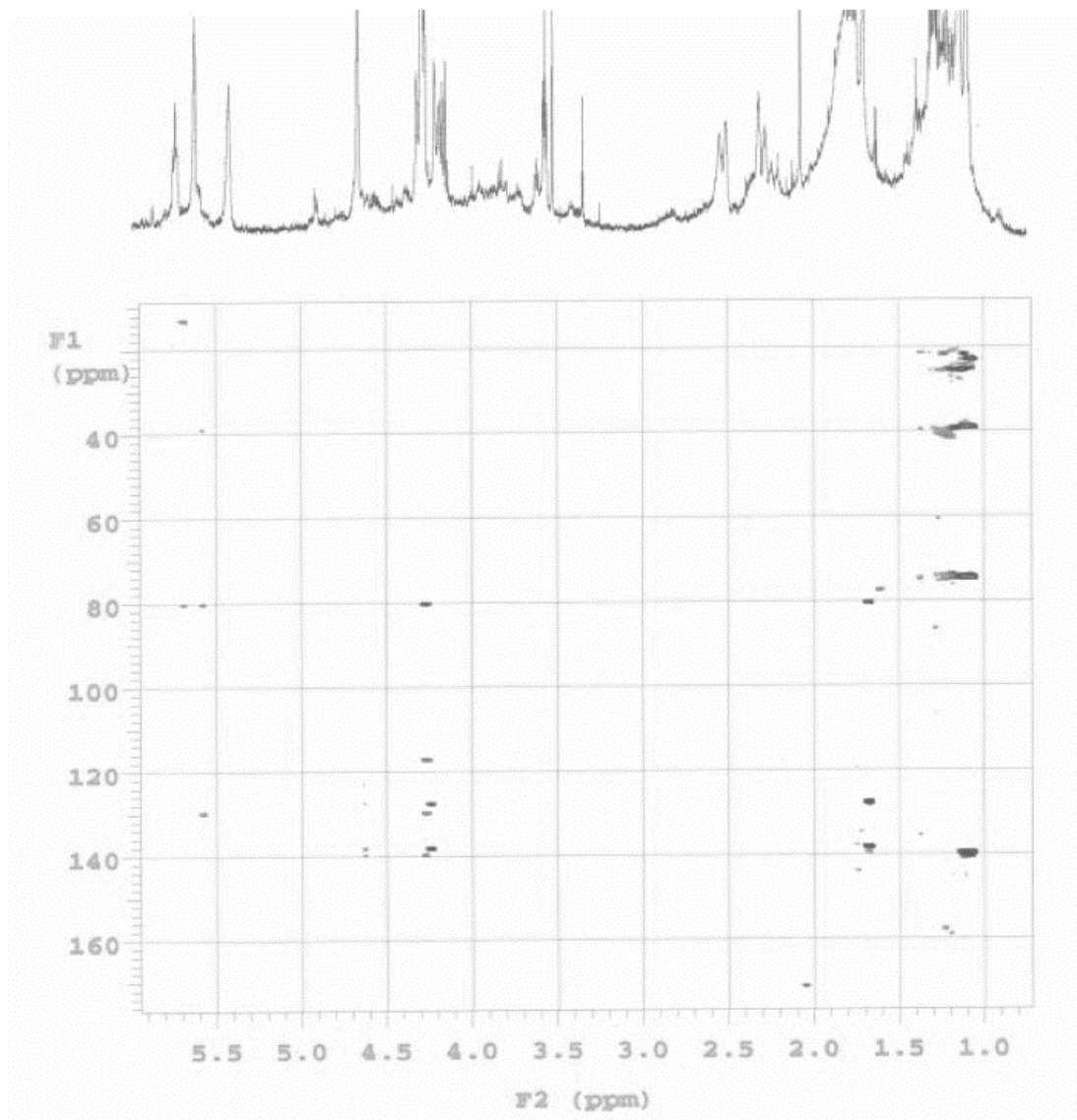
Spectrum ¹³C NMR of 6



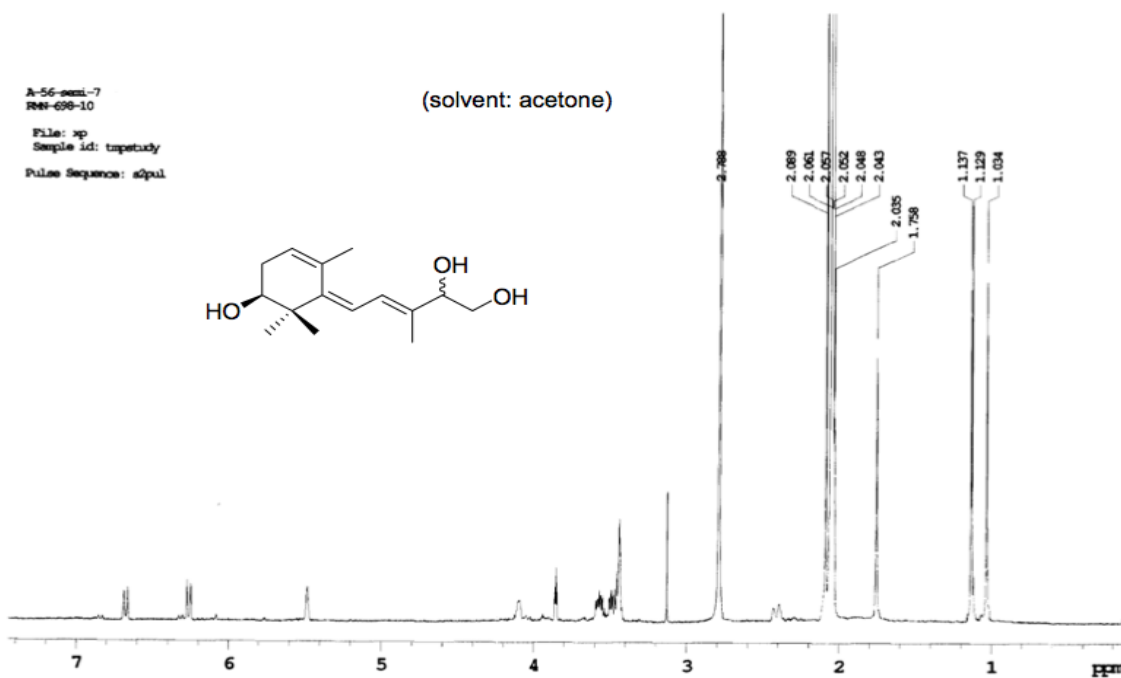
Spectrum COSY of 6

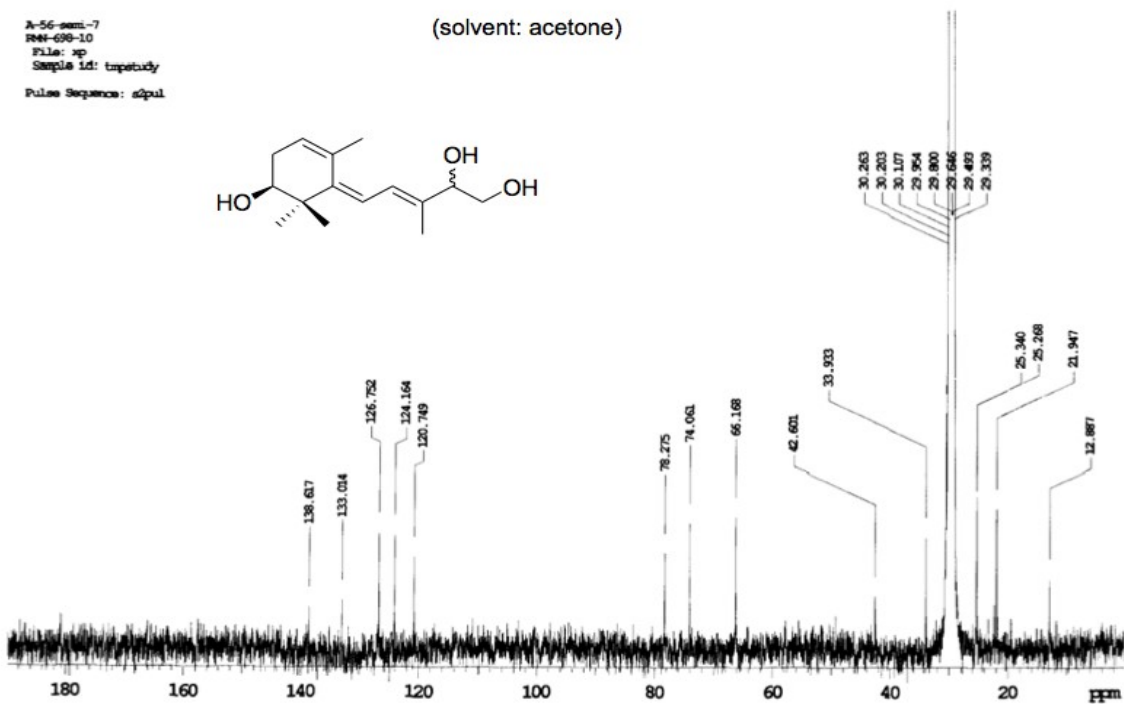


Spectrum HSQC of 6



Spectrum HMBC of 6

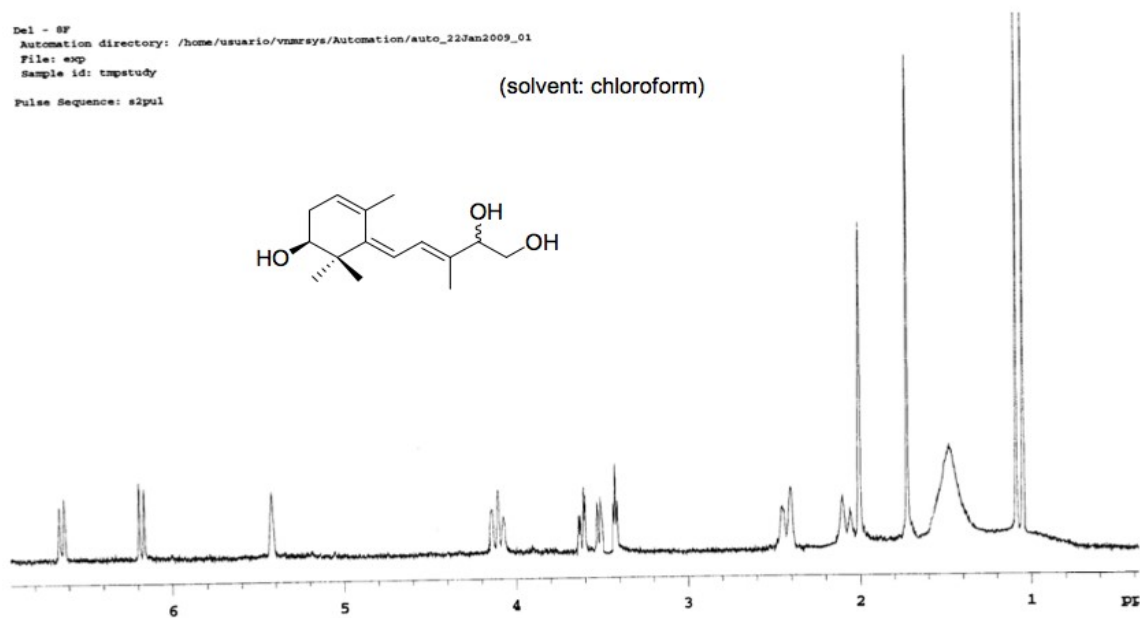
Spectrum ^1H NMR of 7



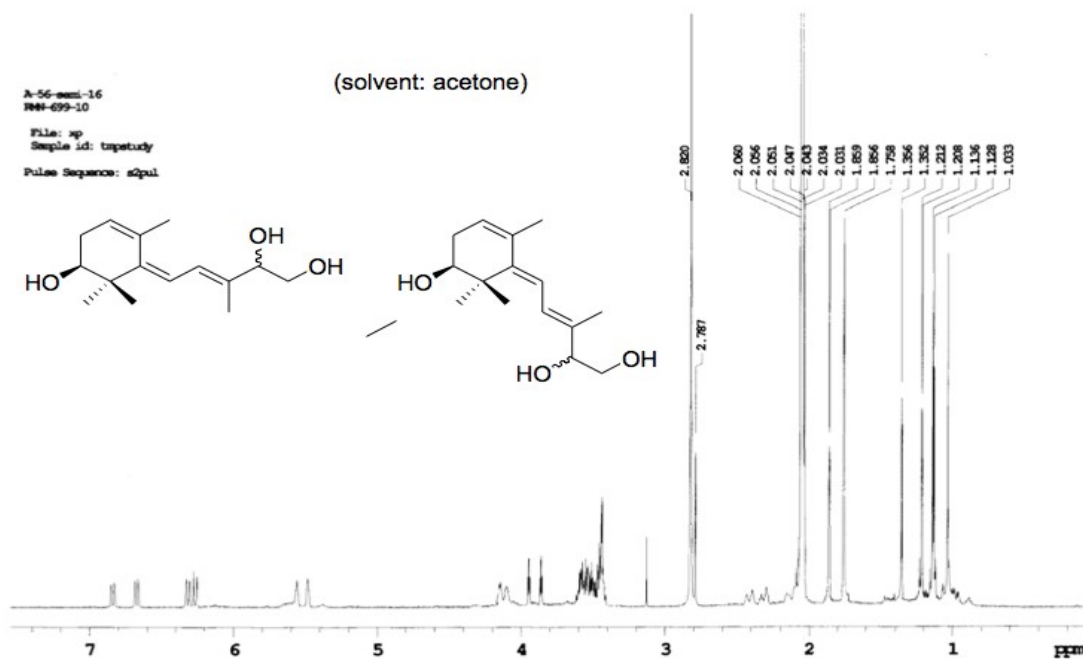
Spectrum ^{13}C NMR of 7

Del - SF
Automation directory: /home/usuario/vnmrsys/Automation/auto_22Jan2009_01
File: exp
Sample id: tmpstudy
Pulse Sequence: s2pul

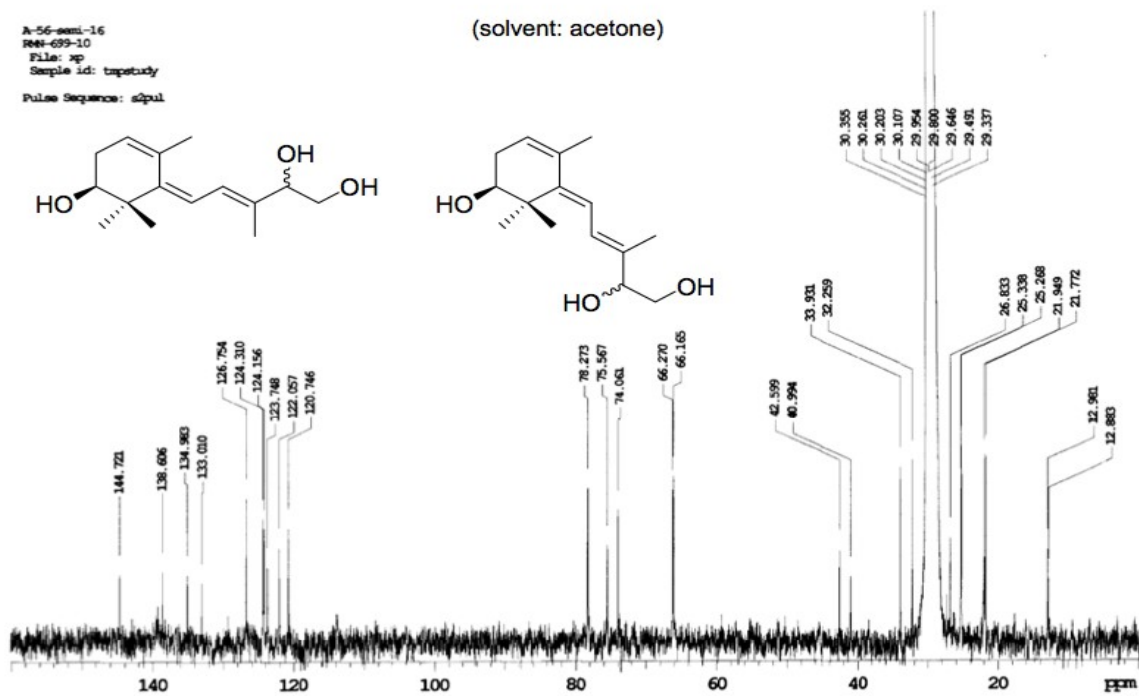
(solvent: chloroform)



Spectrum ¹H NMR of 7

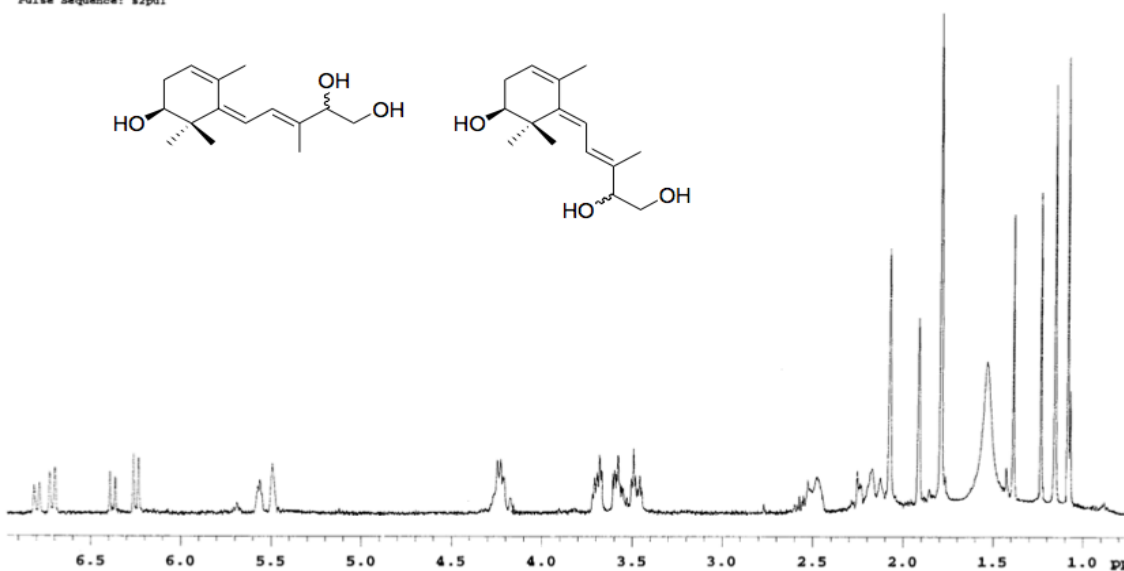


Spectrum ^1H NMR of 7 + 8

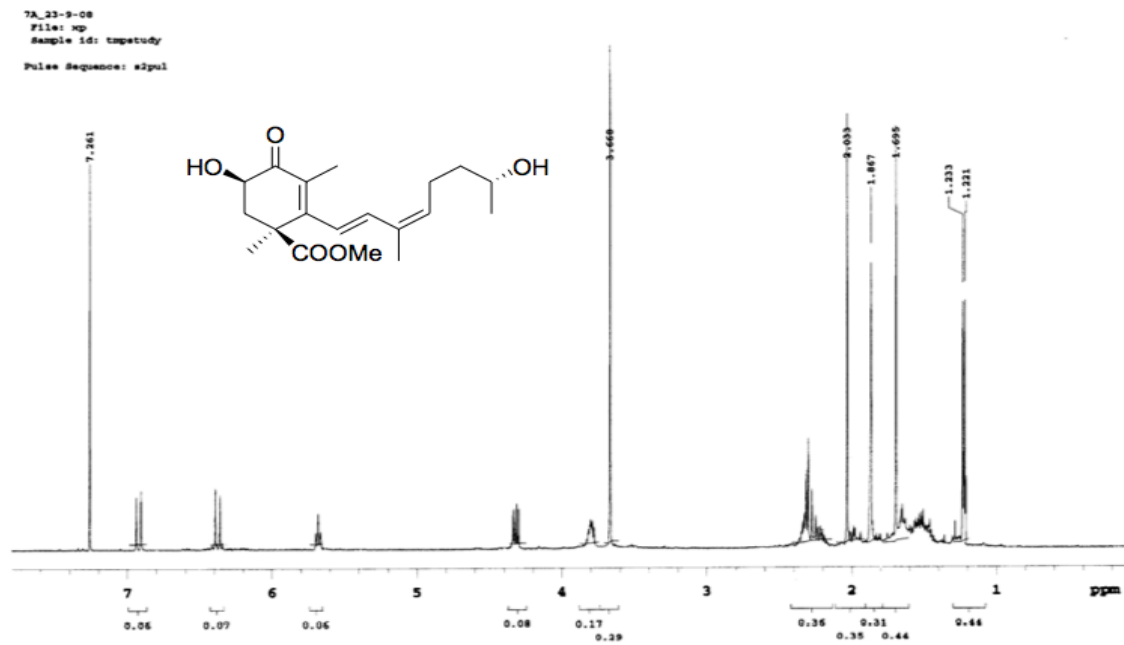
Spectrum ^{13}C NMR of 7 + 8

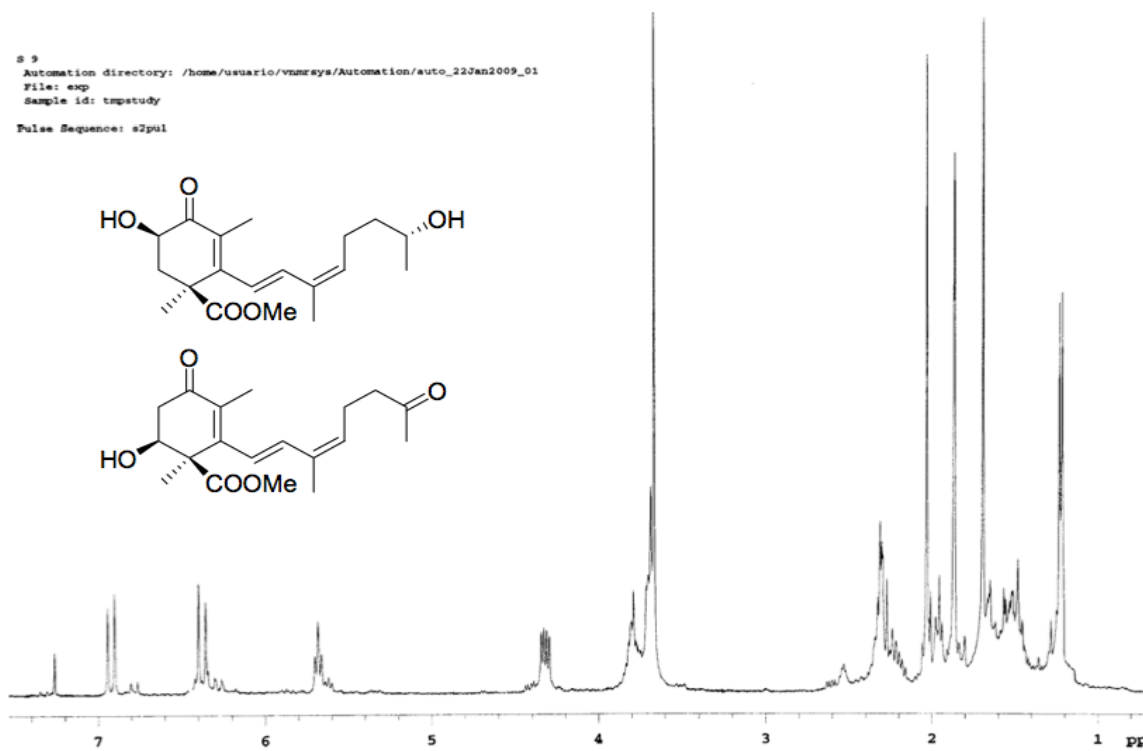
Del (-) Fraction 9
Automation directory: /home/usuario/vnmrsvs/Automation/auto_22Jan2009_01
File: exp
Sample id: tmptstudy
Pulse Sequence: s2pul

(solvent: chloroform)

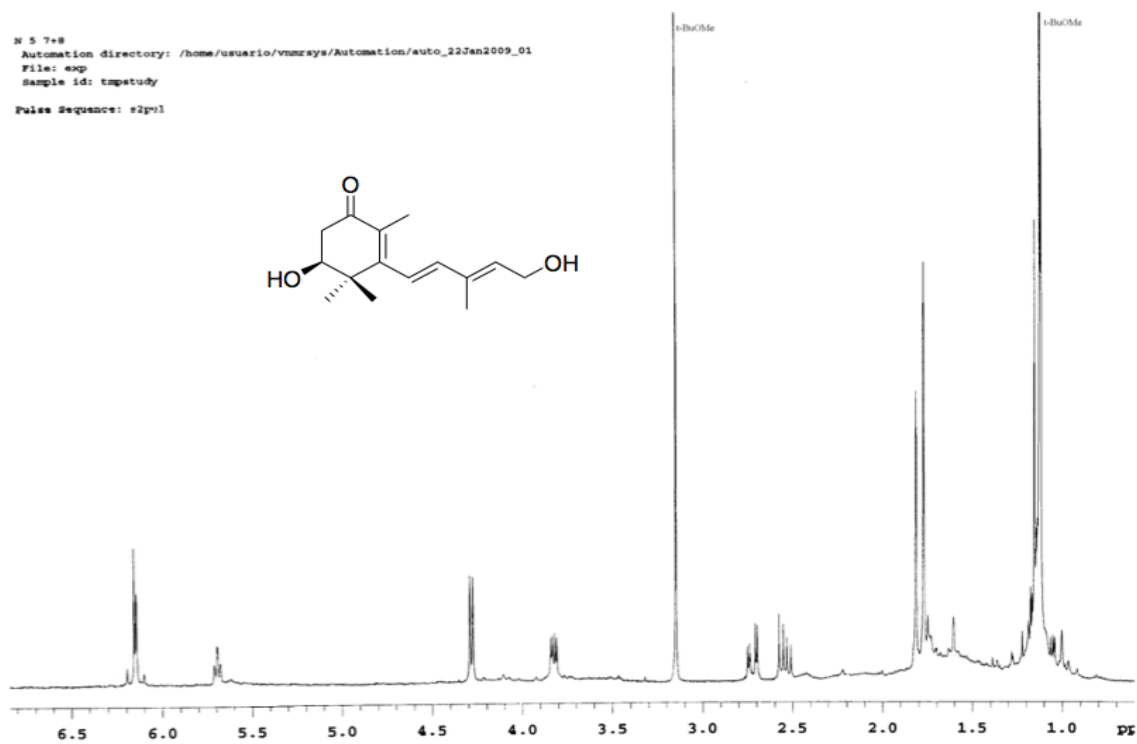


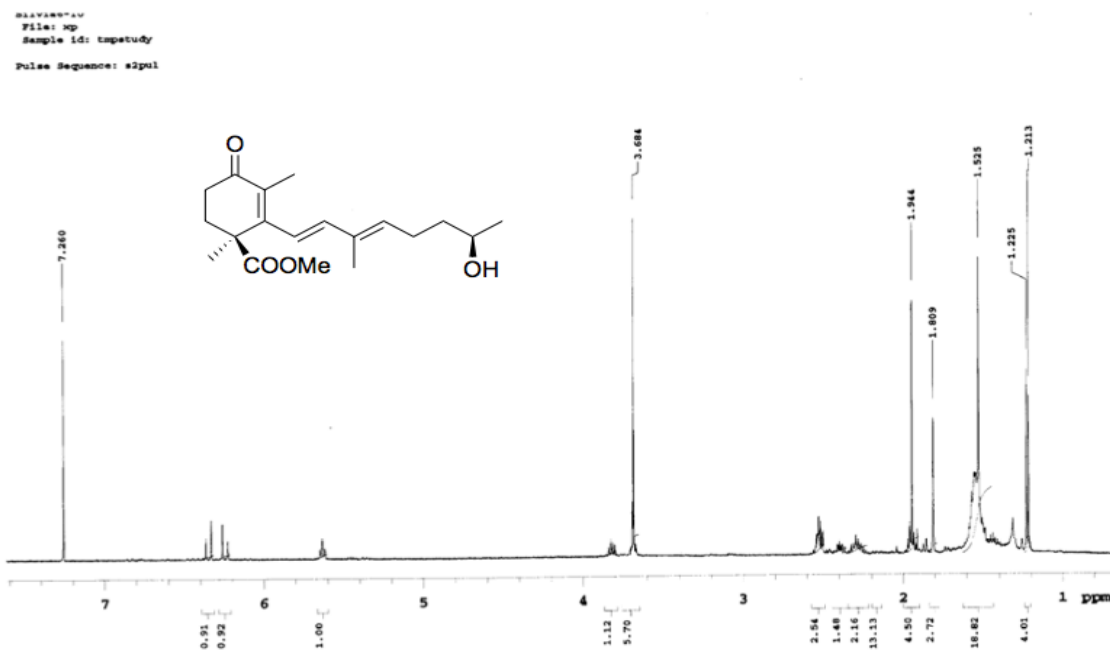
Spectrum ¹H NMR of 7 + 8

Spectrum ^1H NMR of **2**



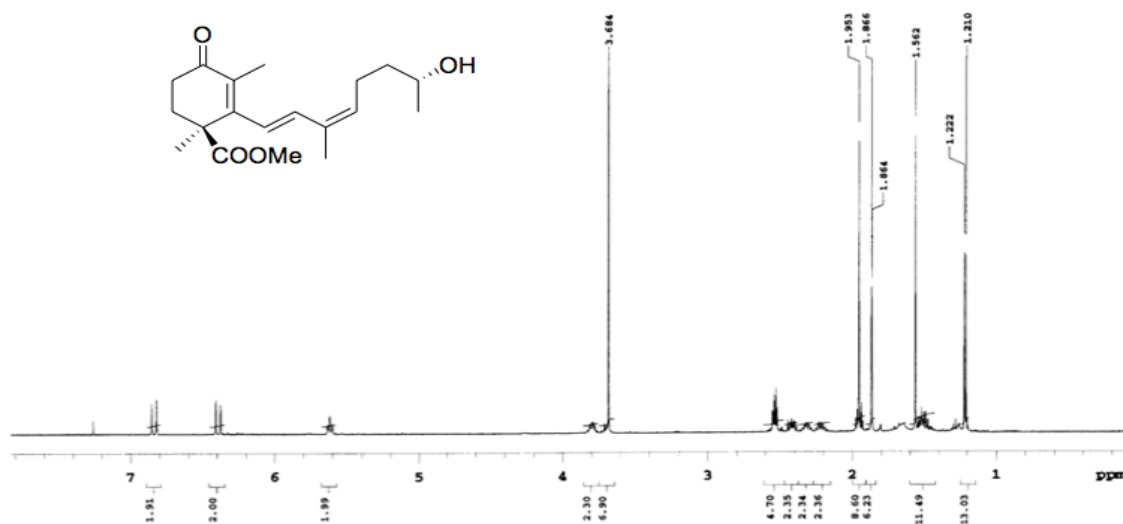
Spectrum ^1H NMR of 2 + 12

Spectrum ^1H NMR of **3**

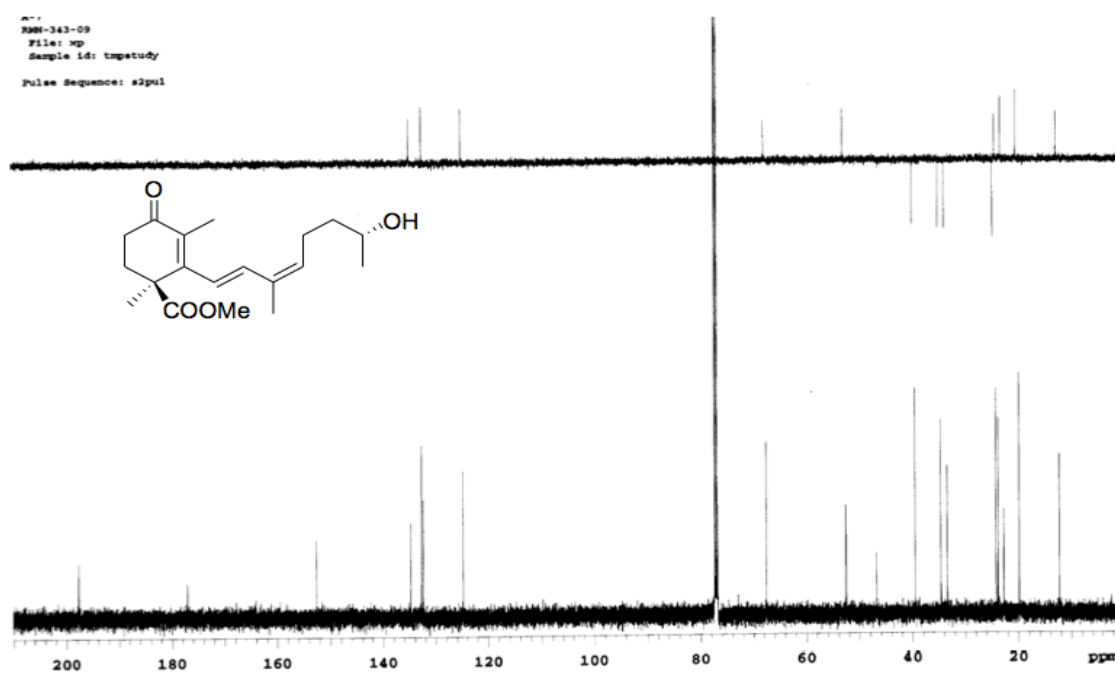


Spectrum ^1H NMR of **11a** (9E)

A:7
NAME: 343-09
File: xp
Sample id: tapetudy
Pulse Sequence: e2pul



Spectrum ^1H NMR of 9a and 10 (9Z)



Spectrum ¹³C NMR of **9a** and **10** (9Z)

ANEXO 3

Supporting Information

Figure S1. Spectrum $^1\text{H-NMR}$ of **2**.

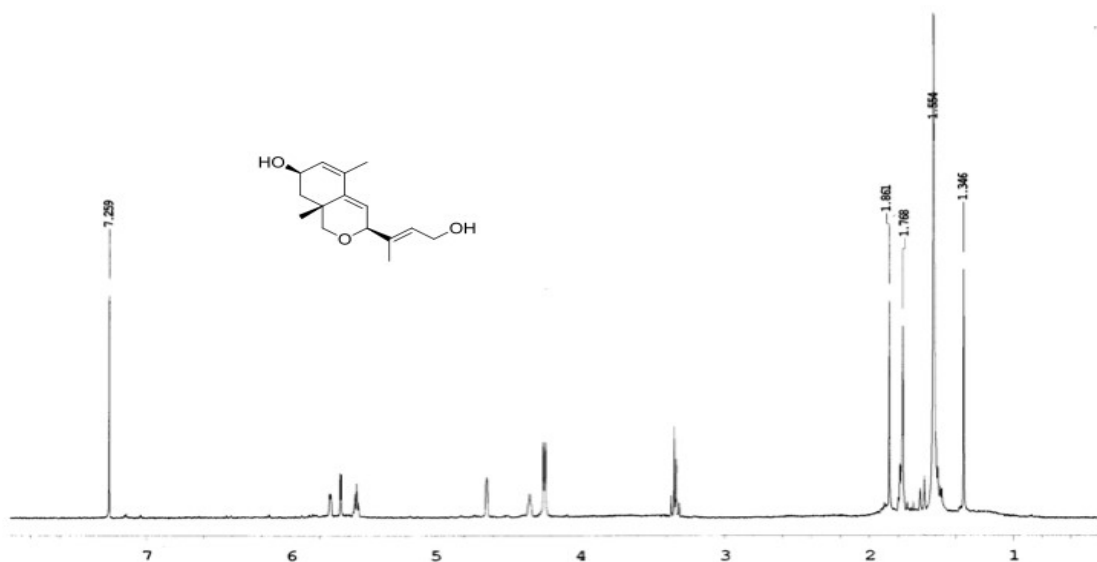
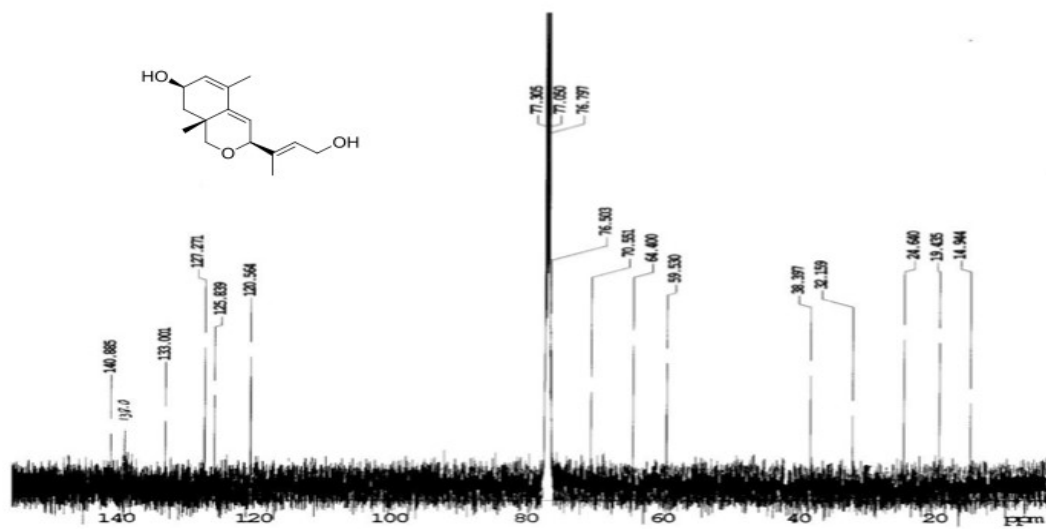


Figure S2. Spectrum $^{13}\text{C-NMR}$ of **2**.



ANEXO 4

First Total Synthesis of (+)-Apotrisporin E and (+)-Apotrietriols A-B: A Cyclization Approach to Apocarotenoids

José A. González-Delgado,^{a,b} Jesús F. Arteaga,^{*b} M. Mar Herrador^a and Alejandro F. Barrero^{*a}

^aDepartment of Organic Chemistry, and Institute of Biotechnology, University of Granada, Avda Fuentenueva 18071 Granada, Spain. ^bDepartment of Chemical Engineering, Physical Chemistry and Organic Chemistry, and CIQSO – Center for Research in Sustainable Chemistry. University of Huelva, Avda 3 Marzo s/n 21071 Huelva. Spain.

* jesus.fernandez@diq.uhu.es; afbarre@ugr.es;

Supporting Information

TABLE OF CONTENTS

General Experimental Section	S-3
Experimental Procedures	S-4
Spectra:	
¹ H and ¹³ C NMR spectra of 9 :	S-18
¹ H and ¹³ C NMR spectra of 11 :	S-19
¹ H and ¹³ C NMR spectra of 7 :	S-20
¹ H and ¹³ C NMR spectra of 6b :	S-21
NOE experiments of 6b	S-22
¹ H and ¹³ C NMR spectra of 6 :	S-23
¹ H and ¹³ C NMR spectra of 12 :	S-24
¹ H and ¹³ C NMR spectra of 13 :	S-25

^1H and ^{13}C NMR spectra of 14 :	S-26
^1H and ^{13}C NMR spectra of 5 :	S-27
^1H and ^{13}C NMR spectra of 15 :	S-28
^1H and ^{13}C NMR spectra of 4 :	S-29
^1H and ^{13}C NMR spectra of 16 :	S-30
^1H and ^{13}C NMR spectra of 17 :	S-31
^1H and ^{13}C NMR spectra of 18 :	S-32
^1H and ^{13}C NMR spectra of 19 :	S-33
^1H and ^{13}C NMR spectra of 20 :	S-34
^1H and ^{13}C NMR spectra of 2 :	S-35
^1H and ^{13}C NMR spectra of 2–3 :	S-36
^1H and ^{13}C NMR spectra of 1 :	S-37

General Experimental section:

All NMR spectra (δ values, ppm) were recorded with a Varian Direct-Drive 600 (^1H 500 MHz/ ^{13}C 150 MHz), Varian Direct-Drive 500 (^1H 500 MHz/ ^{13}C 125 MHz), Varian Direct-Drive 400 (^1H 400 MHz/ ^{13}C 100 MHz) and Varian Inova Unity 300 (^1H 300 MHz/ ^{13}C 75 MHz) spectrometers. Tetramethylsilane (TMS) was used as an external reference for recording ^1H (of residual proton; $\delta = 7.26$ ppm) and ^{13}C ($\delta = 77.0$ ppm) spectra in CDCl_3 . Chemical shift multiplicities are reported as s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, m = multiplet and br = broad. The accurate mass determination was carried out with a mass spectrometer equipped with a TOF, system Triwave[®] WATERS model SYNAP G2 and an AutoSpec-Q mass spectrometer arranged in an EBE geometry (Micromass Instrument, Manchester, UK) and equipped with a FAB (LSIMS) source. The instrument was operated at 8 KV of accelerating voltage and Cs^+ were used as primary ions. Optical rotations were measured on a Perkin-Elmer 141 polarimeter, using CH_2Cl_2 as the solvent. Reactions were monitored by thin layer chromatography (TLC) carried out on 0.25 mm E. Merck silica gel plates (60F-254) using UV light as the visualizing agent and a solution of phosphomolybdic acid in ethanol and heat as developing agent. Silica gel SDS 60 (35-70 mm) was used for flash column chromatography. HPLC with UV and RI detection was used. Semi-preparative HPLC separations were carried out on a column (5 μm Silica, 10 x 250 mm) at a flow rate of 2.0 mL/min in an Agilent Series 1100 instrument. All air- and water-sensitive reactions were performed in flasks flame-dried under a positive flow of argon and conducted under an argon atmosphere. The solvents used were purified according to standard literature techniques and stored under argon. THF and toluene were freshly distilled immediately prior to use from sodium/benzophenone and strictly deoxygenated for 30 min under argon for each of the $\text{Cp}_2\text{TiCl}_2/\text{Mn}$ or Zn reactions. Reagents were purchased at the higher commercial quality and used without further purification, unless otherwise stated.

Experimental Procedures

Strains and culture conditions: Strains of *Phycomyces blakesleeanus* Bgff: Strain NRRL1555, sexually (–), is the standard wild-type; Strain NRRL1554, (+) is a different natural isolate. Strain A56 is a (+) wild type derived from ten successive backcrosses into NRRL1555, and therefore largely consanguineous with this strain.¹ Standard culture media and handling were used.² Plates containing 25.0 mL minimal agar were inoculated with 10^4 heat-activated spores each and incubated in the dark at 22 °C for five days. Growth on the same agar enriched with yeast extract (1.0 g/L) did not sensibly modify the results. Mated cultures were incubated with 5×10^3 spores of each sex.³

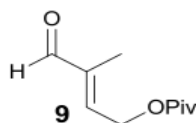
Extraction and isolation of natural compounds: For extraction and isolation of natural (+)-apotriscporin E and natural (+)-apotrietriols A-B see our previous works.⁴ Starting from an extract (1.0 L) of mated cultures A56 × NRRL1555 (80 minimal agar plates) yielded 302 mg dry neutral and 258 mg dry acid extract. The neutral extract was fractionated by semi-preparative HPLC. (+)-Apotriscporin E was present in the fraction $21.9 < t_R < 23.5$ min (5.5 mg). $[\alpha]_D^{20} +7.8$ (c 0.1, CH₂Cl₂). (+)-Apotrietriol A was present in the fraction $24.9 < t_R < 26.7$ min (3.4 mg). $[\alpha]_D^{20} = +5.9$ (c 0.12, CH₂Cl₂) and (+)-apotrietriols A-B in the fraction $26.7 < t_R < 29.3$ min (7.8 mg). $[\alpha]_D^{20} = +4.3$ (c 0.35, CH₂Cl₂)

¹ M. I. Alvarez and A. P. Eslava, *Genetics*, 1983, **105**, 873–879.

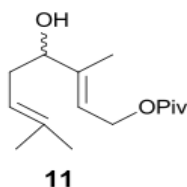
² E. Cerdá-Olmedo, in *Phycomyces*, ed. E. Cerdá-Olmedo and E. D. Lipson, Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, New York, USA, 1987, pp 337–339.

³ E. Cerdá-Olmedo and A. Hüttermann, *Angew. Botan.*, 1986, **60**, 59–70.

⁴ (a) S. Polaino, M. M. Herrador, E. Cerdá-Olmedo and A. F. Barrero, *Org. Biomol. Chem.*, 2010, **8**, 4229–4231; (b) S. Polaino, J. A. González-Delgado, P. Arteaga, M. M. Herrador, A. F. Barrero and E. Cerdá-Olmedo, *Org. Biomol. Chem.*, 2012, **10**, 3002–3009.



(E)-3-methyl-4-oxobut-2-en-1-yl pivalate (9): A mixture of SeO_2 (1080 mg, 9.70 mmol), *t*-BuOOH (5.0–6.0 M in decane, 3.6 mL) and CH_2Cl_2 (21 mL) was stirred at 0 °C for 7 hours, then prenyl pivalate⁵ (5000 mg, 29.37 mmol) was added and the complete mixture stirred at the same temperature (TLC monitoring). The reaction was quenched by addition of CH_2Cl_2 , washed with H_2O , dried over anhyd Na_2SO_4 and concd under reduced pressure. The resulting crude was purified by column chromatography (hexane/*t*-BuOMe, 90:10) on silica gel to yield 61% of aldehyde **9** as a colorless oil.⁶ TLC (hexane/*t*-BuOMe, 70:30) R_f : 0.18; ^1H NMR: δ_{H} (500 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si) 5.48 (t, 1H, $J = 5.5$ Hz), 4.51 (d, 2H, $J = 6.8$ Hz), 3.90 (s, 2H), 1.60 (s, 3H), 1.08 (s, 9H); ^{13}C NMR: δ_{C} (125 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si) 178.7, 140.5, 118.7, 67.3, 61.0, 38.8, 27.2 (3C), 13.8 ppm.



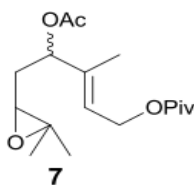
(E)-4-hydroxy-3,7-dimethylocta-2,6-dien-1-yl pivalate (11): *Method A:* To a -78 °C solution of aldehyde **9** (3300 mg, 17.92 mmol) and prenyl stannane **10b** (12.8 mL, 38.2 mmol) in CH_2Cl_2 (150 mL) was added, rapidly, BCl_3 (1.0 M in CH_2Cl_2 , 1.58 mL).⁷ After 10 minutes, the reaction was poured into saturated aq NaHCO_3 and extracted with CH_2Cl_2 . The combined organics layers were washed with saturated aq KF, dried over Na_2SO_4 , filtered, concd and

⁵ B. M. Smith, E. J. Skellam, S. J. Oxley and A. E. Graham, *Org. Biomol. Chem.*, 2007, **5**, 1979–1982.

⁶ A. F. Barrero, J. F. Quilez del Moral, M. M. Herrador, E. M. Sánchez and J. F. Arteaga, *J. Mex. Chem. Soc.*, 2006, **50**, 149–156.

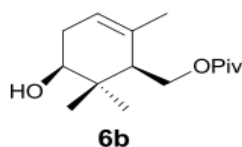
⁷ E. Schöttner, K. Simon, M. Friedel, P. G. Jones and T. Lindel, *Tetrahedron Lett.*, 2008, **49**, 5580–5582.

purified by silica gel column chromatography (hexane/*t*-BuOMe, 80:20) to yield 24% of α,α' product (790 mg, 4.30 mmol). *Method B*: A mixture of Cp_2TiCl_2 (1227 mg, 4.53 mmol) and Mn dust (865 mg, 15.75 mmol) in strictly deoxygenated THF (45 mL) was stirred at rt until the red solution turned green. Then, a solution of the aldehyde **9** (363 mg, 1.97 mmol) and prenyl bromide **10a** (0.45 mL, 3.94 mmol) in strictly deoxygenated THF (50 mL) was added to the solution of Cp_2TiCl_2 . The reaction mixture was stirred until consumption of the starting material (20 min). The mixture was diluted with *t*-BuOMe, filtered through a Buchner, and washed with 2.0 N HCl and brine, and the resultant organic phase was dried over anhyd Na_2SO_4 and concd under reduced pressure. The resulting crude was purified by column chromatography (hexane/*t*-BuOMe, 80:20) on silica gel to afford 180 mg (0.71 mmol, 36% overall yield) of **11** as a colorless oil. TLC (hexane/*t*-BuOMe, 70:30) R_f : 0.25; ^1H NMR: δ_{H} (500 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si) 5.57 (t, 1H, $J = 6.7$ Hz), 5.08 (t, 1H, $J = 8.9$ Hz), 4.61 (d, 1H, $J = 6.5$ Hz), 4.02 (t, 2H, $J = 6.5$ Hz), 2.26 (t, 2H, $J = 6.6$ Hz), 1.72 (s, 3H), 1.70 (s, 3H), 1.19 (s, 9H); ^{13}C NMR: δ_{C} (125 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si) 178.6, 142.4, 135.9, 119.9, 119.7, 76.3, 61.1, 38.9, 34.2, 27.3 (3C), 26.0, 18.1, 12.5 ppm; HRFABMS: calcd. for $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}_3\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 277.1780, found: 277.1783.

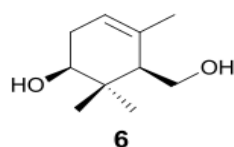


(E)-4-acetoxy-5-(3,3-dimethyloxiran-2-yl)-3-methylpent-2-en-1-yl pivalate (7): 3-Chloroperoxybenzoic acid (802 mg, 4.66 mmol) in anhyd CH_2Cl_2 (7 mL) was added to a solution of acetylated derivate of **11** (1000 mg, 3.38 mmol) in anhyd CH_2Cl_2 (6 mL) under an argon atmosphere at 0 °C, and the mixture was stirred for 3 hours. Then, CH_2Cl_2 (25 mL) was added and was successively washed with saturated aq NaHCO_3 solution and brine, dried with anhyd Na_2SO_4 , filtered, and evaporated to give a crude residue which yielded 855 mg (2.74

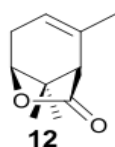
mmol, 59% yield) of **7** after chromatography (hexane/*t*-BuOMe, 60:40) as a colorless oil. TLC (hexane/*t*-BuOMe, 50:50) R_f : 0.53; $^1\text{H NMR}$: δ_{H} (400 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si) 5.63 (t, 1H, $J = 6.3$ Hz), 5.33 (m, 1H), 4.61 (d, 2H, $J = 6.3$ Hz), 2.72 (dt, 1H, $J = 10.4, 6.2$ Hz), 2.07 (s, 3H), 1.88 (t, 2H, $J = 6.8$ Hz), 1.73 (s, 3H), 1.29 (s, 3H), 1.26 (s, 3H), 1.19 (s, 9H); $^{13}\text{C NMR}$: δ_{C} (100 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si) 178.5, 170.1, 138.3, 122.3, 75.9, 60.9, 60.7, 58.1, 38.9, 32.8, 27.3 (3C), 24.8, 21.3, 19.1, 13.0 ppm; TOFESMS: calcd. for $\text{C}_{17}\text{H}_{29}\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 313.2015, found: 313.2008.



((1R,5S)-5-hydroxy-2,6,6-trimethylcyclohex-2-en-1-yl)methyl pivalate (6b): Strictly deoxygenated THF (7.0 mL) was added to a mixture of Cp_2TiCl_2 (1920 mg, 7.69 mmol) and Mn dust (1130 mg, 20.50 mmol) under an Ar atmosphere and the suspension was stirred at rt until it turned green. Then, a solution of epoxide (800 mg, 2.56 mmol) in THF (7.0 mL) was added and the solution was stirred for 6 hours at 40 °C. The reaction was then quenched with saturated aq NaHCO_3 and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine and dried over Na_2SO_4 and the solvent was removed. Product was purified by flash chromatography on silica gel (hexane/*t*-BuOMe, 65:35) to yield 436 mg (1.72 mmol, 67% yield) of monocycle **6b** as a colorless solid. TLC (hexane/*t*-BuOMe, 50:50) R_f : 0.43; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +23.1$ (c 1.40, CH_2Cl_2); $^1\text{H NMR}$: δ_{H} (500 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si) 5.39 (br t, 1H), 4.46 (dd, 1H, $J = 4.4$ Hz), 4.11 (dd, 1H, $J = 3.9$ Hz), 3.46 (t, 1H, $J = 6.3$ Hz), 2.31 (m, 1H), 2.07 (m, 1H), 2.00 (br t, 1H), 1.70 (s, 3H), 1.55 (br s, 1H), 1.19 (s, 9H), 1.03 (s, 3H), 0.95 (s, 3H); $^{13}\text{C NMR}$: δ_{C} (125 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si) 178.5, 132.9, 120.5, 73.9, 63.2, 48.6, 38.9, 37.3, 31.9, 27.3 (3C), 26.5, 22.3, 18.9 ppm; HRFABMS: calcd. for $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}_3\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 277.1780, found: 277.1783.



(1S,5R)-5-(Hydroxymethyl)-4,6,6-trimethylcyclohex-3-enol (6): Solid ZrCl₄ (4920 mg, 21.15 mmol) was added to a solution of (*S*)-epoxygeraniol (**8**)⁸ (1200 mg, 7.05 mmol) in freshly distilled CH₂Cl₂ (1000 mL) at rt. The resulting whitish suspension was stirred for 10 min, then 1.0 M HCl (150 mL) was added and the two layers were separated. The aq layer was extracted with CH₂Cl₂ (3 x 150 mL) and the combined organic layers were washed with saturated aq NaHCO₃ and brine, dried over Na₂SO₄, and concd under reduced pressure. The residue was purified by silica gel flash chromatography (hexane/*t*-BuOMe, 40:60) to yield 706 mg of **6** (4.16 mmol, 59% yield) as a colorless solid.^{14b} TLC (*t*-BuOMe) *R*_f: 0.4; [α]_D²⁰ +54.1 (c 1.63, CH₂Cl₂), lit. [α]_D²⁰ +57.8 (c 2.00, CH₂Cl₂);⁹ ¹H NMR: δ_H (400 MHz; CDCl₃; Me₄Si) 5.42 (bs, 1H), 4.65 (bs, 2H), 3.72 (s, 2H), 3.35 (d, 2H, *J* = 4.5 Hz), 2.34 (br dt, 1H, *J* = 2.3, 18.6 Hz), 2.10 (br dd, 1H, *J* = 18.5 Hz), 1.73 (s, 3H), 1.08 (s, 3H), 0.92 (s, 3H); ¹³C NMR: δ_C (100 MHz; CDCl₃; Me₄Si) 131.6, 120.4, 71.3, 58.7, 51.1, 37.1, 32.2, 28.6, 24.4, 22.6 ppm; TOFESMS: calcd. for C₁₀H₁₉O₂ [M+H]⁺ 171.1307, found: 171.1310.

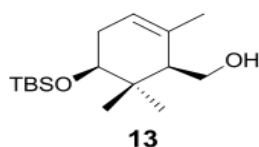


(1R,5S)-2,8,8-trimethyl-6-oxabicyclo[3.2.1]oct-2-en-7-one (12): A solution of diol **6** (170 mg, 1.00 mmol), TEMPO (15.6 mg, 0.10 mmol) and TBACl (27.7 mg, 0.10 mmol) in 10 mL of CH₂Cl₂ and 10 mL of an aq solution of NaHCO₃ (0.5 M) and K₂CO₃ (0.05 M) were vigorously stirred at rt. Solid *N*-Chlorosuccinimide (200 mg, 1.50 mmol) was then added. Stirring was

⁸ M. Bovolenta, F. Castronovo, A. Vadalá, G. Zanoni and G. Vidari, *J. Org. Chem.*, 2004, **69**, 8959–8962.

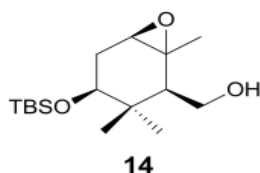
⁹ S. Serra, F. G. Gatti and C. Fuganti, *Tetrahedron Asymm.*, 2009, **20**, 1319–1329.

maintained and the reaction monitored by TLC. After 1 hour the organic layer was separated, and the aq phase was extracted with CH_2Cl_2 (2 x 10 mL). The dichloromethane extracts were washed with brine (2 x 10 mL), dried, and evaporated. The residue was purified by silica gel flash chromatography (hexane/*t*-BuOMe, 50:50) to yield 123 mg of lactone **12** (0.74 mmol, 74% yield) as a colorless solid. TLC (*t*-BuOMe) R_f : 0.5; $[\alpha]_D^{20}$ +46.3 (c 1.30, CH_2Cl_2); ^1H NMR: δ_{H} (400 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si) 5.41 (bs, 1H), 4.15 (bs, 1H), 2.41 (s, 1H), 2.34 (m, 2H), 1.82 (s, 3H), 1.17 (s, 3H), 1.05 (s, 3H); ^{13}C NMR: δ_{C} (100 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si) 176.4, 132.5, 119.4, 83.1, 54.5, 39.5, 29.6, 25.1, 22.9, 17.9 ppm; HRFABMS: calcd. for $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_2\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 189.0886, found: 189.0891.



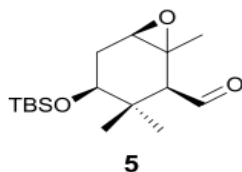
((1R,5S)-5-((tert-butyldimethylsilyl)oxy)-2,6,6-trimethylcyclohex-2-en-1-yl)methanol (13): Benzoylated derivated of **13** (1200 mg, 3.09 mmol) was added to a solution of NaOH (865 mg, 21.60 mmol) in MeOH (129 ml) and the resulting mixture was stirred at rt overnight. After evaporation of MeOH under reduced pressure and addition of water, the resulting solid crude was extracted with *t*-BuOMe. The organic extract was washed with water, dried over Na_2SO_4 and the solvent was removed. The residue was purified by silica gel flash chromatography (hexane/*t*-BuOMe, 85:15) to yield 598 mg of alcohol **13** (2.10 mmol, 68% yield) as a colorless oil. TLC (hexane/*t*-BuOMe, 65:35) R_f : 0.48; $[\alpha]_D^{20}$ +34.1 (c 1.03, CH_2Cl_2); ^1H NMR: δ_{H} (600 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si) 5.39 (bs, 1H), 4.26 (d, 1H, $J = 10.0$ Hz), 3.75 (dd, 2H, $J = 13.0, 1.2$ Hz), 3.68 (td, 1H, $J = 11.7, 11.0, 3.8$ Hz), 3.47 (d, 1H, $J = 4.8$ Hz), 2.35 (ddq, 1H, $J = 18.5, 4.9, 2.4$ Hz), 2.07 (m, 1H), 1.76 (s, 3H), 1.05 (s, 3H), 0.95 (s, 3H), 0.91 (s, 9H), 0.12 (s, 3H), 0.11 (s, 3H); ^{13}C NMR: δ_{C} (150 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si) 132.5, 118.9, 73.8, 59.0, 51.4, 37.6, 31.9, 28.7

(3C), 26.0, 24.9, 22.7, 18.3, -4.4, -4.7 ppm; TOFESMS: calcd. for C₁₆H₃₅O₂Si [M+H]⁺ 285.2247, found: 285.2250.

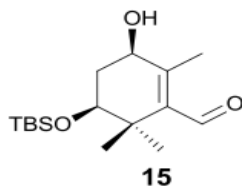


((1S,2R,4S,6R)-4-((tert-butyldimethylsilyl)oxy)-1,3,3-trimethyl-7-oxabicyclo[4.1.0]heptan-2-yl) methanol (14): 3-Chloroperoxybenzoic acid (435 mg, 2.52 mmol) in anhyd CH₂Cl₂ (14 mL) was added to a solution of **13** (598 mg, 2.10 mmol) in anhyd CH₂Cl₂ (9 mL) under an argon atmosphere at rt, and the mixture was stirred for 3 hours. Then, CH₂Cl₂ (50 mL) was added and was successively washed with saturated aq NaHCO₃ solution and brine, dried over anhyd Na₂SO₄, filtered, and evaporated to give a crude which yielded 537 mg of **14** after silica gel chromatography (hexane/*t*-BuOMe, 60:40) as a colorless oil.¹⁰ (hexane/*t*-BuOMe, 50:50) *R*_f: 0.25; [α]_D²⁰ +14.1 (c 0.96, CH₂Cl₂); ¹H NMR: δ_H (400 MHz; CDCl₃; Me₄Si) 4.04 (dd, 1H, *J* = 11.1, 5.8 Hz), 3.93 (dd, 1H, *J* = 11.1, 3.4 Hz), 3.30 (t, 1H, *J* = 5.2 Hz), 2.91 (d, 1H, *J* = 3.3 Hz), 2.03 (m, 2H), 1.67 (t, 1H, *J* = 4.1 Hz), 1.41 (s, 3H), 0.95 (s, 3H), 0.92 (s, 3H), 0.89 (s, 9H), 0.06 (s, 3H), 0.02 (s, 3H); ¹³C NMR: δ_C (100 MHz; CDCl₃; Me₄Si) 73.9, 61.2, 58.5, 57.8, 49.2, 36.9, 30.3, 28.5, 25.9 (3C), 24.8, 21.1, 18.1, -4.2, -4.8 ppm; HRFABMS: calcd. for C₁₆H₃₂O₃SiNa [M+Na]⁺ 300.2121, found: 300.2119.

¹⁰ L. Alcaraz, J. J. Harnett, C. Mioskowski, T. Le Gall, S. Dong-Soo and J. R. Falck, *J. Org. Chem.*, 1995, **60**, 7209–7214

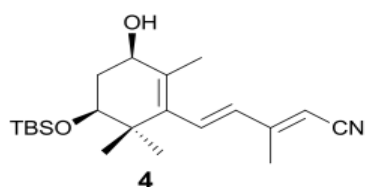


(1S,2S,4S,6R)-4-((tert-butyldimethylsilyl)oxy)-1,3,3-trimethyl-7-oxabicyclo[4.1.0]heptane-2-carbaldehyde (5): Dess-Martin periodinane (938 mg, 2.21 mmol) was added to a solution of alcohol **14** (537 mg, 1.79 mmol) in anhyd CH₂Cl₂ (10 mL) at rt. After 15 min of stirring at rt, the reaction was quenched by addition of a saturated aq 1:1 mixture of NaHCO₃ and Na₂S₂O₃ and stirring was continued until two clear layers were obtained (10 min). The aq phase was extracted with CH₂Cl₂ (3 x 15 mL) and the combined organic layers were washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concd under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel flash chromatography (hexane/*t*-BuOMe, 60:40) to yield 453 mg of epoxyaldehyde **5** (1.88 mmol, 85% yield) as a white solid.³ TLC (hexane/*t*-BuOMe, 50:50) *R_f*: 0.63; [α]_D²⁰ -40.4 (c 0.73, CH₂Cl₂); ¹H NMR: δ_H (400 MHz; CDCl₃; Me₄Si) 9.90 (d, *J* = 4.3 Hz, 1H), 3.35 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 3.01 (dd, *J* = 3.3, 1.8 Hz, 1H), 2.17 (d, *J* = 4.2 Hz, 1H), 2.09 (m, 2H), 1.31 (s, 3H), 0.98 (s, 3H), 0.93 (s, 3H), 0.88 (s, 9H), 0.07 (s, 3H), 0.02 (s, 3H); ¹³C NMR: δ_C (100 MHz; CDCl₃; Me₄Si) 205.4, 73.0, 60.2, 56.5, 56.4, 38.0, 30.3, 27.1, 25.9 (3C), 24.3, 20.5, 18.1, -4.1, -4.8 ppm.



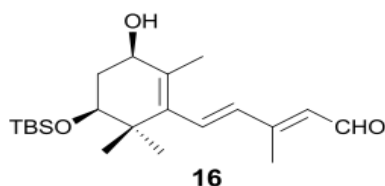
(3R,5S)-5-((tert-butyldimethylsilyl)oxy)-3-hydroxy-2,6,6-trimethylcyclohex-1-enecarbaldehyde (15): To a solution of **5** (453 mg, 1.52 mmol) in Et₂O (91 mL) was added freshly distilled pyrrolidine (0.28 mL, 3.37 mmol) at rt, and the reaction was stirred overnight.

Once the reaction was finished (TLC monitoring), water (25 mL) was added. The mixture was extracted with *t*-BuOMe (3 x 20 mL), the organic layer washed successively with brine, dried over Na₂SO₄, concd in vacuo, and purified by silica gel column chromatography (hexane/*t*-BuOMe, 75:25) to give 408 mg of **15** (1.37 mmol, 90% yield) as a white solid.¹⁶ TLC (hexane/*t*-BuOMe, 50:50) *R*_f: 0.3; [α]_D²⁰ +27.7 (c 1.11, CH₂Cl₂); ¹H NMR: δ_H (400 MHz; CDCl₃; Me₄Si) 10.2, (s, 1H), 3.90 (m, 1H), 3.64 (t, 1H, *J* = 2.7 Hz), 2.24 (s, 3H), 2.06 (q, 2H, *J* = 4.2 Hz), 1.24 (s, 3H), 1.14 (s, 3H), 0.90 (s, 9H), 0.16 (s, 3H), 0.11 (s, 3H); ¹³C NMR: δ_C (100 MHz; CDCl₃; Me₄Si) 193.8, 152.5, 137.7, 77.3, 70.0, 38.9, 33.1, 26.5, 26.1 (3C), 23.4, 18.2, 16.5, -4.0, -4.6 ppm.

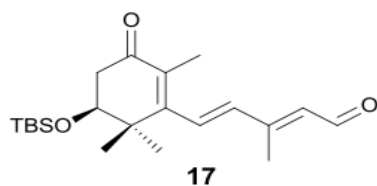


(2E,4E)-5-((3R,5S)-5-((tert-butyl dimethylsilyl)oxy)-3-hydroxy-2,6,6-trimethylcyclohex-1-en-1-yl)-3-methylpenta-2,4-dienitrile (4): In a flame-dried flask, *n*-BuLi (1.6 M in hexane, 0.30 mL) was added to a solution of diethyl (cyanomethylallyl)phosphonate (367 mg, 1.69 mmol) in dry THF (7.0 mL), and the mixture stirred at rt for 30 min. The solution was then cooled to 0 °C and **15** (408 mg, 1.37 mmol) in dry THF (10.0 mL) was added dropwise. After 2 hours of stirring at rt, the reaction was quenched by adding saturated aq NH₄Cl and the mixture was extracted with *t*-BuOMe (3 x 25 mL). The combined organic layers were washed with brine, dried with Na₂SO₄ and concd in vacuo. After purification on a silica gel column (hexane/*t*-BuOMe, 80:20), **4** (286 mg, 0.79 mmol, 58% yield) was obtained as a colorless oil. TLC (hexane/*t*-BuOMe, 50:50) *R*_f: 0.35; [α]_D²⁰ +49.8 (c 0.66, CH₂Cl₂); ¹H NMR: δ_H (400 MHz; CDCl₃; Me₄Si) 6.48 (d, 1H, *J* = 16.1 Hz), 6.15 (d, 1H, *J* = 16.1 Hz), 5.20 (s, 1H), 3.90 (t, 1H, *J* = 4.4 Hz), 3.68 (dd, 1H, *J* = 6.0, 2.2 Hz), 2.21 (s, 3H), 2.06 (m, 1H), 2.00 (m, 1H), 1.82 (s, 3H),

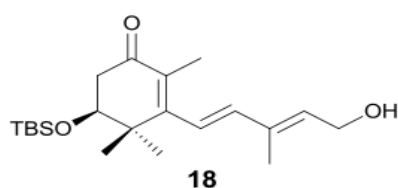
1.01 (s, 3H), 0.98 (s, 3H), 0.90 (s, 9H), 0.13 (s, 3H), 0.08 (s, 3H); ^{13}C NMR: δ_{C} (100 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si) 156.8, 136.4, 135.0, 134.2, 132.5, 117.8, 97.5, 75.9, 69.5, 40.2, 34.3, 27.1, 26.1 (3C), 24.5, 18.7, 18.2, 16.7, -4.0 , -4.7 ppm; HRFABMS: calcd. for $\text{C}_{21}\text{H}_{35}\text{NO}_2\text{SiNa}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 384.2344, found: 384.2335.



(2E,4E)-5-((3R,5S)-5-((tert-butyldimethylsilyl)oxy)-3-hydroxy-2,6,6-trimethylcyclohex-1-en-1-yl)-3-methylpenta-2,4-dienal (16): A solution of **4** (286 mg, 0.79 mmol) in dry toluene (6.0 mL) was cooled to -20 °C and DIBALH (1.82 mL, 1.82 mmol) was added. The solution was allowed to warm to rt and stirred for 6 h (TLC monitoring). The reaction was then quenched by adding H_2O and the mixture was extracted with CH_2Cl_2 (3 x 25 mL). The combined organic layers were washed with saturated aq NaCl, dried over Na_2SO_4 and concd in vacuo. After purification on a silica gel column (hexane/*t*-BuOMe, 30:70), 205 mg of **16** (0.56 mmol, 71% yield) were obtained as a colorless oil. TLC (hexane/*t*-BuOMe, 50:50) R_f : 0.30; $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ $+21.1$ (c 0.70, CH_2Cl_2); ^1H NMR: δ_{H} (400 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si) 10.14 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz), 6.65 (d, 1H, $J = 16.2$ Hz), 6.22 (d, 1H, $J = 16.1$ Hz), 5.96 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz), 3.92 (t, 1H, $J = 4.3$ Hz), 3.70 (dd, 1H, $J = 5.9, 2.2$ Hz), 2.32 (s, 3H), 2.00 (m, 2H), 1.85 (s, 3H), 1.04 (s, 3H), 1.00 (s, 3H), 0.91 (s, 9H), 0.14 (s, 3H), 0.09 (s, 3H); ^{13}C NMR: δ_{C} (100 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si) 191.5, 154.3, 137.2, 136.7, 134.9, 132.5, 129.5, 76.0, 69.5, 40.3, 34.3, 27.2, 26.1 (3C), 24.5, 18.7, 18.2, 13.1, -4.0 , -4.7 ppm; TOFESMS: calcd. for $\text{C}_{21}\text{H}_{37}\text{O}_3\text{Si}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 365.2526, found: 365.2512.

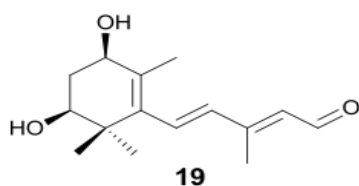


(2E,4E)-5-((S)-5-((tert-butyl dimethylsilyl)oxy)-2,6,6-trimethyl-3-oxocyclohex-1-en-1-yl)-3-methylpenta-2,4-dienal (17): Dess-Martin periodinane (295 mg, 0.70 mmol) was added to a solution of **16** (205 mg, 0.56 mmol) in anhyd CH_2Cl_2 (3.3 mL) and stirred at rt for 15 min. At this point, the reaction was quenched by addition of a saturated aq 1:1 mixture of NaHCO_3 and $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ and stirring was continued until two clear layers were obtained (10 min). The aq phase was extracted with CH_2Cl_2 (3 x 15 mL) and the combined organic layers were washed with brine, dried over Na_2SO_4 , and concd under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel flash chromatography (hexane/*t*-BuOMe, 70:30) to yield 171 mg of **17** (0.47 mmol, 84% yield) as a colorless oil. TLC (hexane/*t*-BuOMe, 35:65) R_f : 0.59; $[\alpha]_D^{20}$ +24.6 (c 0.58, CH_2Cl_2); ^1H NMR: δ_{H} (400 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si) 10.17 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 6.74 (d, 1H, $J = 16.3$ Hz), 6.29 (d, 1H, $J = 16.3$ Hz), 6.01 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz), 3.84 (m, 1H), 2.63 (m, 2H), 2.35 (s, 3H), 1.81 (s, 3H), 1.16 (s, 3H), 1.14 (s, 3H), 0.89 (s, 9H), 0.08 (s, 3H), 0.06 (s, 3H); ^{13}C NMR: δ_{C} (100 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si) 197.8, 191.3, 159.7, 152.9, 138.4, 132.8, 131.3, 130.9, 74.2, 43.5, 42.0, 30.3, 29.8 (2C), 25.9 (3C), 13.7, 13.1, -4.0, -4.8 ppm; TOFESMS: calcd. for $\text{C}_{21}\text{H}_{35}\text{O}_3\text{Si}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 363.2355, found: 363.2362.



(S)-5-((tert-butyl dimethylsilyl)oxy)-3-((1E,3E)-5-hydroxy-3-methylpenta-1,3-dien-1-yl)-2,4,4-trimethylcyclohex-2-enone (18): A solution of **17** (171 mg, 0.47 mmol) and zinc

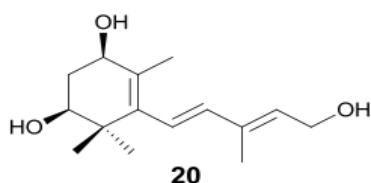
borohydride (45 mg, 0.47 mmol, prepared from sodium borohydride and zinc chloride),¹¹ in THF (5.0 mL) was stirred at $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 2 h. The reaction was then quenched by careful dropwise addition of water. The THF layer was separated and the aq phase was extracted with *t*-BuOMe (3 x 20 mL). The combined THF and ether extract was washed with brine, dried over Na_2SO_4 and concd under reduced pressure. The resulting crude was purified by silica gel flash chromatography (hexane/*t*-BuOMe, 30:70) to yield 139 mg of **18** (0.38 mmol, 81% yield) as a colorless oil. TLC (hexane/*t*-BuOMe, 35:65) R_f : 0.35; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +11.2$ (c 0.50, CH_2Cl_2); $^1\text{H NMR}$: δ_{H} (500 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si) 6.20 (s, 2H), 5.75 (t, 1H, $J = 6.8$ Hz), 4.34 (d, 2H, $J = 6.9$ Hz), 3.82 (dd, 1H, $J = 10.4, 4.6$ Hz), 2.60 (m, 2H), 1.88 (s, 3H), 1.82 (s, 3H), 1.14 (s, 3H), 1.12 (s, 3H), 0.89 (s, 9H), 0.07 (s, 3H), 0.05 (s, 3H); $^{13}\text{C NMR}$: δ_{C} (125 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si) 198.2, 160.5, 140.0, 135.8, 132.4, 130.3, 125.0, 74.2, 59.6, 43.6, 42.1, 25.9 (3C), 25.6, 21.1, 18.2, 13.8, 12.6, $-3.9, -4.8$ ppm; TOFESMS: calcd. for $\text{C}_{21}\text{H}_{37}\text{O}_3\text{Si}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 365.2497, found: 365.2512.



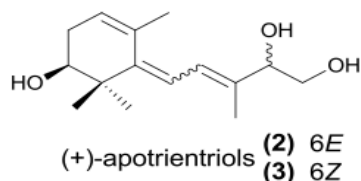
(2E,4E)-5-((3R,5S)-3,5-dihydroxy-2,6,6-trimethylcyclohex-1-en-1-yl)-3-methylpenta-2,4-dienal (19): To a solution of **16** (90 mg, 0.25 mmol) in anhyd THF (3.4 mL) at rt, was added 1.0 M TBAF in THF (0.12 mL, 0.12 mmol) and the mixture stirred for 30 min at the same temperature. Solvent was then removed under reduced pressure and the crude extracted with EtOAc. Organic extracts were washed with brine, dried over anhyd Na_2SO_4 and concd under reduced pressure. The resulting crude was purified by column chromatography (hexane/*t*-BuOMe, 5:95) on silica gel yielding 46 mg of **19** (0.19 mmol, 74% yield) as a colorless oil. TLC (EtOAc) R_f : 0.35; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +10.1$ (c 0.52, CH_2Cl_2); $^1\text{H NMR}$: δ_{H} (500 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si) 10.14

¹¹ S. Narasimhan and R. Balakumar, *Aldrichimica Acta*, 1998, **31**, 19–26.

(d, 1H, $J = 8.1$ Hz), 6.66 (d, 1H, $J = 16.2$ Hz), 6.25 (d, 1H, $J = 16.2$ Hz), 5.96 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 4.01 (t, 1H, $J = 3.6$ Hz), 3.73 (m, 1H), 2.33 (s, 3H), 2.17–2.04 (m, 2H), 1.88 (s, 3H), 1.14 (s, 3H), 1.03 (s, 3H); ^{13}C NMR: δ_{H} (125 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si) 191.5, 154.2, 137.4, 136.7, 134.4, 131.9, 129.6, 75.5, 69.2, 39.8, 33.4, 27.0, 24.3, 19.0, 13.1 ppm; TOFESMS: calcd. for $\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 251.1640, found: 251.1647.

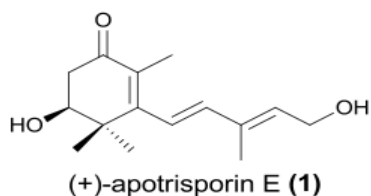


(1*S*,3*R*)-5-((1*E*,3*E*)-5-hydroxy-3-methylpenta-1,3-dien-1-yl)-4,6,6-trimethylcyclohex-4-ene-1,3-diol (20): In a similar DIBALH reduction to the one described earlier, **19** (46 mg, 0.18 mmol) was reduced with DIBALH (0.04 mL, 0.04 mmol) in dry toluene (1.0 mL). After column purification (hexane/EtOAc, 5:95), 38 mg of compound **20** (0.15 mmol, 82% yield) were obtained as a colorless oil. TLC (EtOAc) R_f : 0.23; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +15.7$ (c 0.63, CH_2Cl_2); ^1H NMR: δ_{H} (500 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si) 6.09 (s, 2H), 5.66 (t, 1H, $J = 7.3$ Hz), 4.32 (d, 2H, $J = 6.9$ Hz), 4.00 (t, 1H, $J = 3.8$ Hz), 3.72 (dd, 1H, $J = 4.9, 2.4$ Hz), 2.00 (m, 2H), 1.85 (s, 6H), 1.11 (s, 3H), 1.00 (s, 3H); ^{13}C NMR: δ_{C} (125 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si) 138.5, 137.6, 136.5, 129.8, 129.5, 125.9, 75.7, 69.5, 59.6, 39.8, 33.5, 26.9, 24.2, 18.9, 12.6 ppm; HRFABMS: calcd. for $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_3\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 275.1629, found: 275.1623.

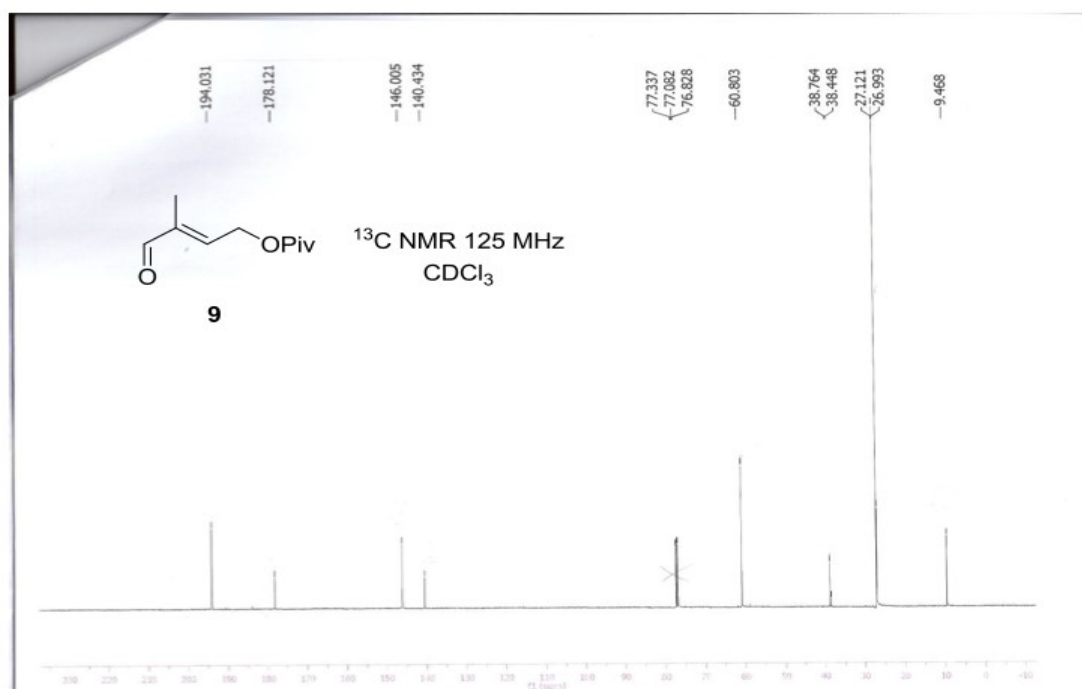
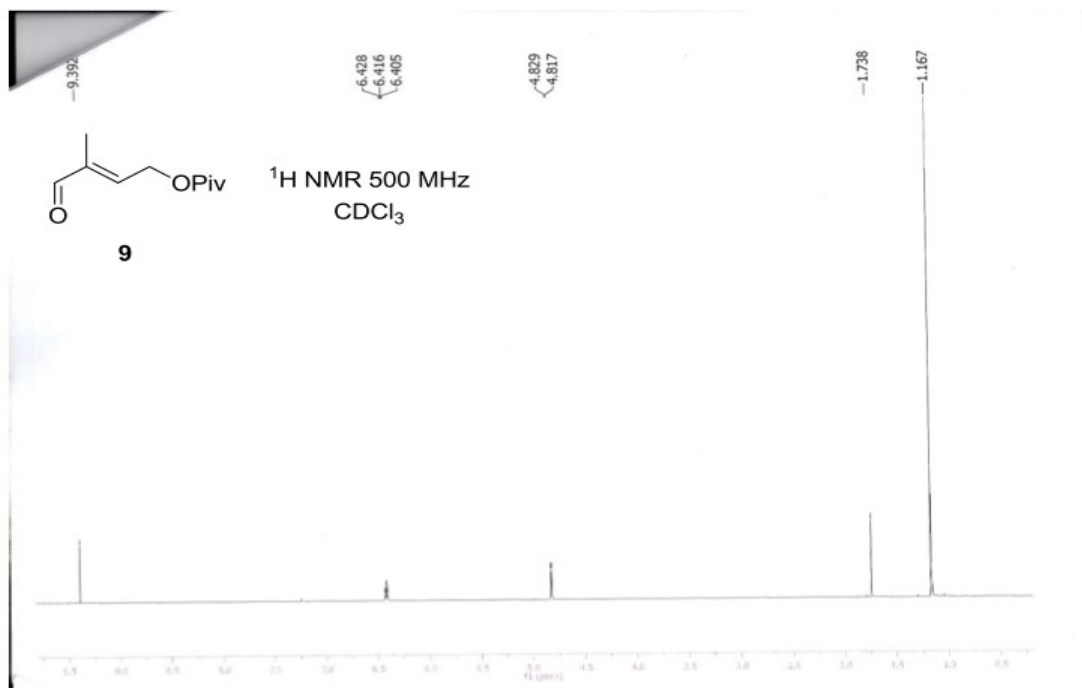


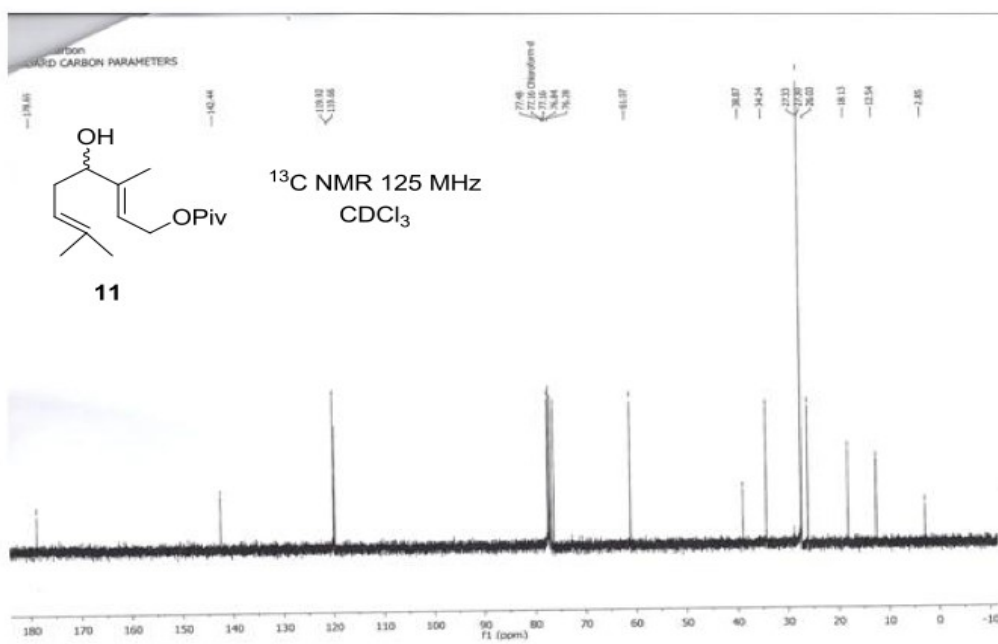
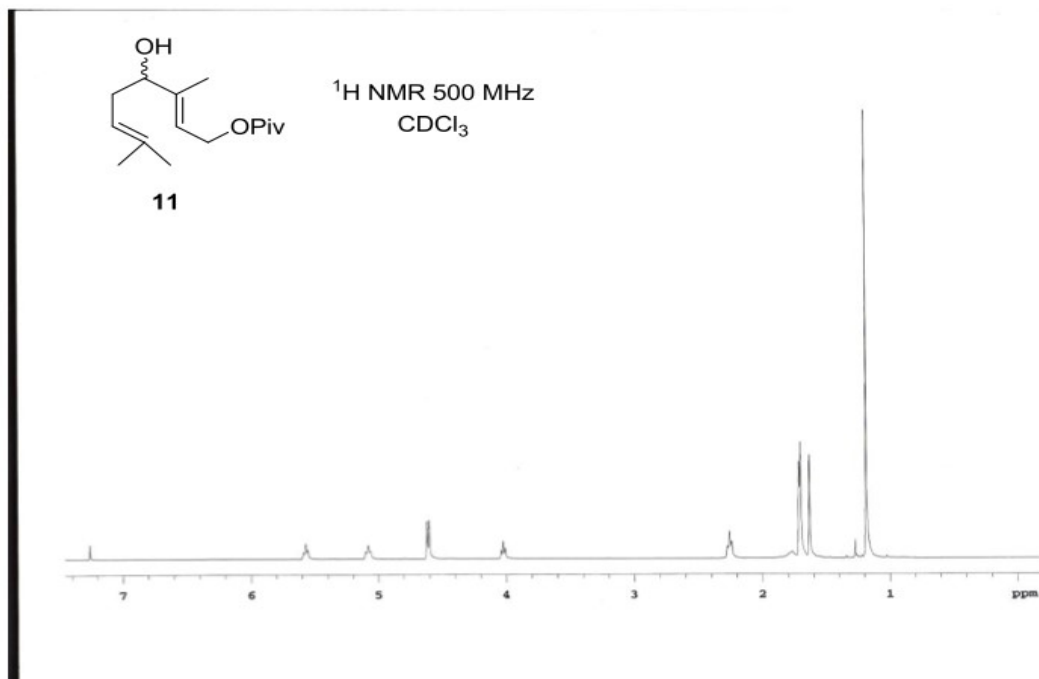
(+)-Apotrientriols A-B (2–3): To a solution of **20** (30 mg, 0.12 mmol) in THF:H₂O (1:1 v/v, 1.0 mL) at rt, was added FSO₃H (0.001 mmol) and the mixture stirred for 3 min at rt, quenched with saturated aq NaHCO₃ and extracted with EtOAc. Organic extracts were washed with brine, dried over anhyd Na₂SO₄ and concd under reduced pressure. The resulting crude was purified by column chromatography (hexane/*t*-BuOMe, 5:95) on silica gel yielding 65% of **2-3** (20 mg, 0.08 mmol) as a colorless syrup. For semi-preparative normal-phase HPLC, aliquots (0.5 mL) of the crude dissolved in *t*-BuOMe were injected into a column (10 by 250 mm, 5 μm silica particles); with a 15 mm refillable guard pre-column filled with the same material in a Series 1100 liquid chromatograph (Agilent). The column was eluted at room temperature at a flow rate of 2 mL min⁻¹ for 25 min with hexane/*t*-BuOMe (5:95, v/v). and monitored with a refractometer. Compound **2** was present in the fraction 25.9 < *t*_R < 27.4 min (3.9 mg) and compounds **2-3** in the fraction 27.4 < *t*_R < 29.0 min (7.8 mg). Compound **2**: TLC (EtOAc) *R*_f: 0.18; [α]_D²⁰ = +5.1 (c 0.09, CH₂Cl₂); ¹H NMR: δ_H (500 MHz; (CD₃)₂CO; Me₄Si) 6.67 (d, 1H, *J* = 11.3 Hz), 6.26 (d, 1H, *J* = 11.3 Hz), 5.48 (br t, 1H), 4.10 (m, 1H), 3.86 (t, 1H, *J* = 3.6 Hz), 3.51-3.43 (m, 2H), 2.75 (s, 2H), 2.43-2.39 (m, 1H), 1.76 (s, 3H), 1.13 (s, 3H), 1.03 (s, 3H); ¹³C NMR: δ_C (125 MHz; (CD₃)₂CO; Me₄Si) 138.8, 133.2, 127.0, 124.4, 121.0, 78.5, 74.3, 66.4, 42.8, 34.2, 25.6, 25.5, 22.2, 13.1 ppm; HRFABMS: calcd. for C₁₅H₂₄O₃Na [M+Na]⁺ 275.1623, found: 275.1625. Compounds **2-3**: TLC (EtOAc) *R*_f: 0.18; [α]_D²⁰ +4.3 (c 0.42, CH₂Cl₂); ¹H NMR (500 MHz, (CD₃)₂CO, Me₄Si): δ 6.84 (d, 1H, *J* = 11.8 Hz), 6.31 (d, 1H, *J* = 11.8 Hz), 5.56 (br t, 1H), 4.15 (m, 1H), 3.94 (t, 1H, *J* = 3.6 Hz), 3.55-3.52 (m, 3H), 2.33-2.29 (m, 1H), 2.03 (s, 3H), 1.86 (s, 3H), 1.35 (s, 3H), 1.21 (s, 3H); ¹³C NMR (125 MHz, (CD₃)₂CO, Me₄Si): δ 144.8, 135.0, 124.5, 124.0, 123.8, 122.3, 75.8, 66.5, 41.2, 32.3, 27.1, 22.0, 13.2 ppm;† HRFABMS: calcd. for C₁₅H₂₄O₃Na [M+Na]⁺ 275.1623, found: 275.1627.

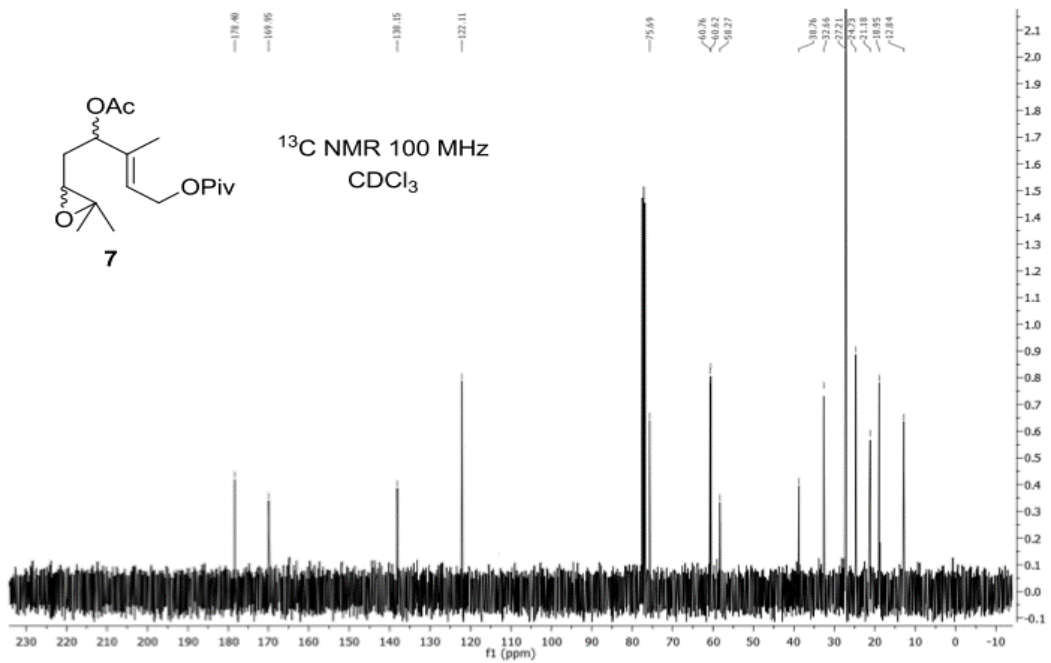
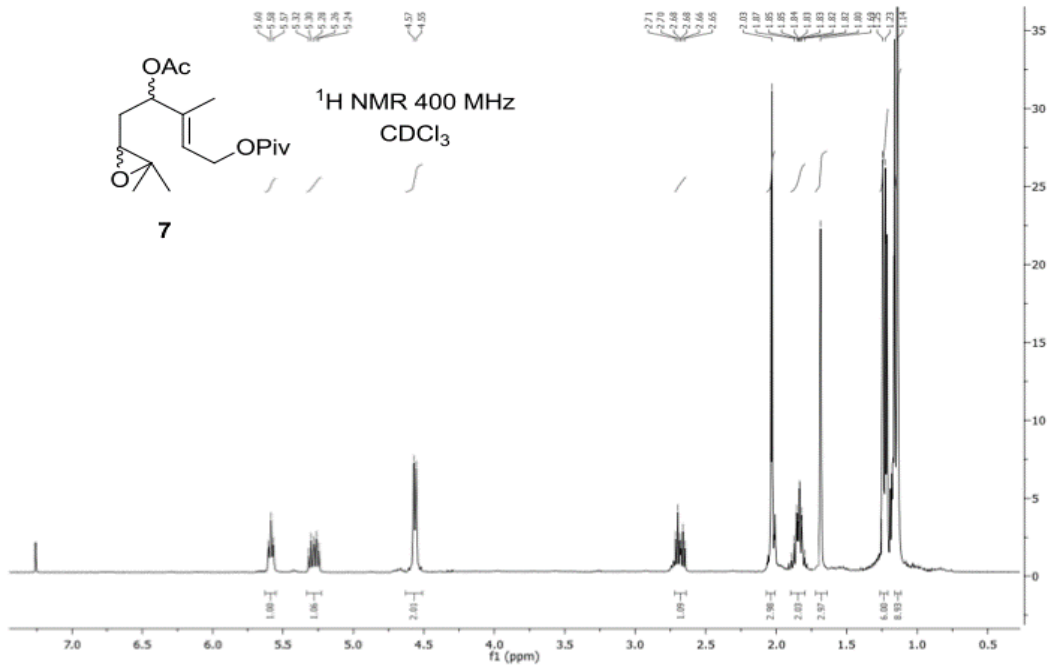
‡ Signals corresponding to compound **2**, † Signals corresponding to compound **3**

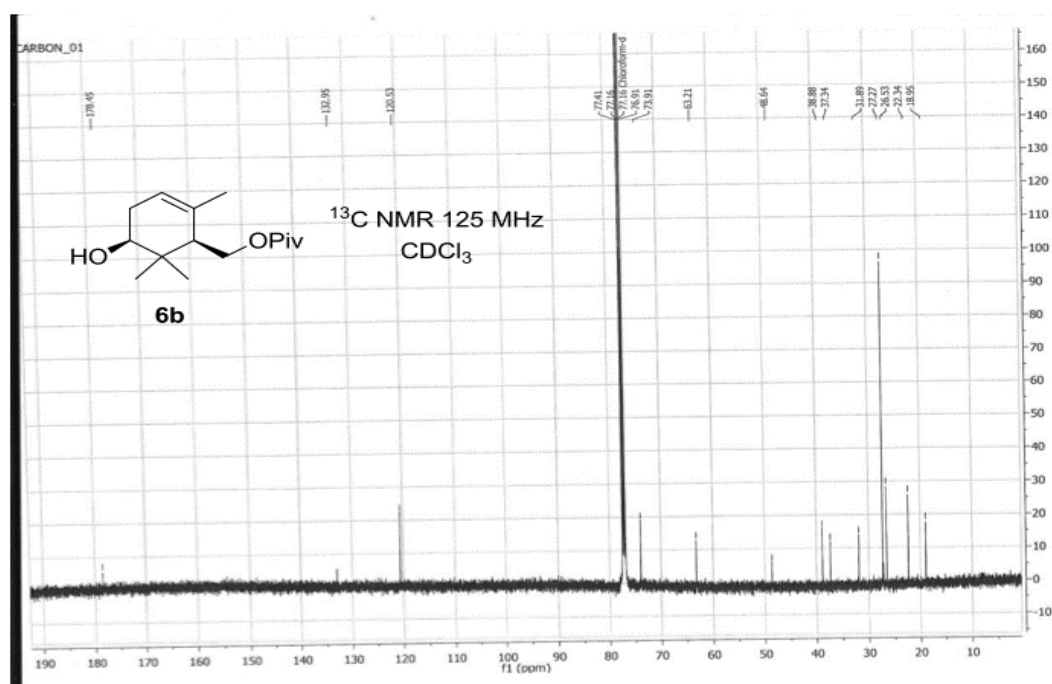
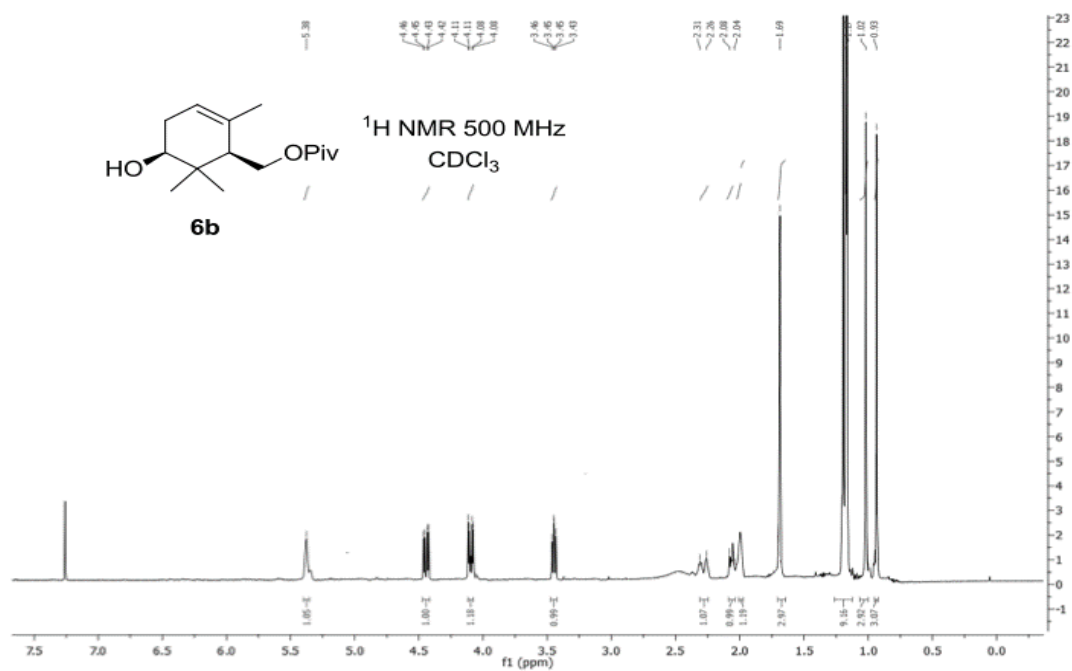


(+)-Apotrissporin E (1): In a similar deprotection to the one described earlier, **18** (90 mg, 0.25 mmol) in anhyd THF (3.4 mL) was reacted with 1.0 M TBAF in THF (0.12 mL, 0.12 mmol) and the mixture stirred for 30 min at rt. Solvent was then removed under reduced pressure and the crude extracted with EtOAc. Organic extracts were washed with brine, dried over anhyd Na_2SO_4 and concd under reduced pressure. The resulting crude was purified by column chromatography (hexane/EtOAc, 10:90) on silica gel yielding 70% of (+)-apotrissporin E (44 mg, 0.18 mmol) as a colorless oil. TLC (*t*-BuOMe) R_f : 0.23; IR: $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3407, 2958, 2926, 2871, 1735, 1719, 1648, 1012, 736; $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ +7.1 (c 0.80, CH_2Cl_2); ^1H NMR: δ_{H} (500 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si) 6.22 (s, 2H), 5.76 (t, 1H, $J = 6.7$ Hz), 4.35 (d, 2H, $J = 6.7$ Hz), 3.88 (dd, 1H, $J = 9.1, 4.2$), 2.78 (dd, 1H, $J = 16.9, 4.2$ Hz), 2.60 (dd, 1H, $J = 16.9, 9.1$ Hz), 1.88 (s, 3H), 1.84 (s, 3H), 1.18 (s, 6H); ^{13}C NMR: δ_{C} (125 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si) 197.3, 159.4, 140.5, 135.6, 132.7, 130.5, 124.5, 74.3, 55.6, 42.8, 41.4, 25.7, 21.5, 13.8, 12.6 ppm; TOFESMS: calcd. for $\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 251.1647, found: 251.1644.









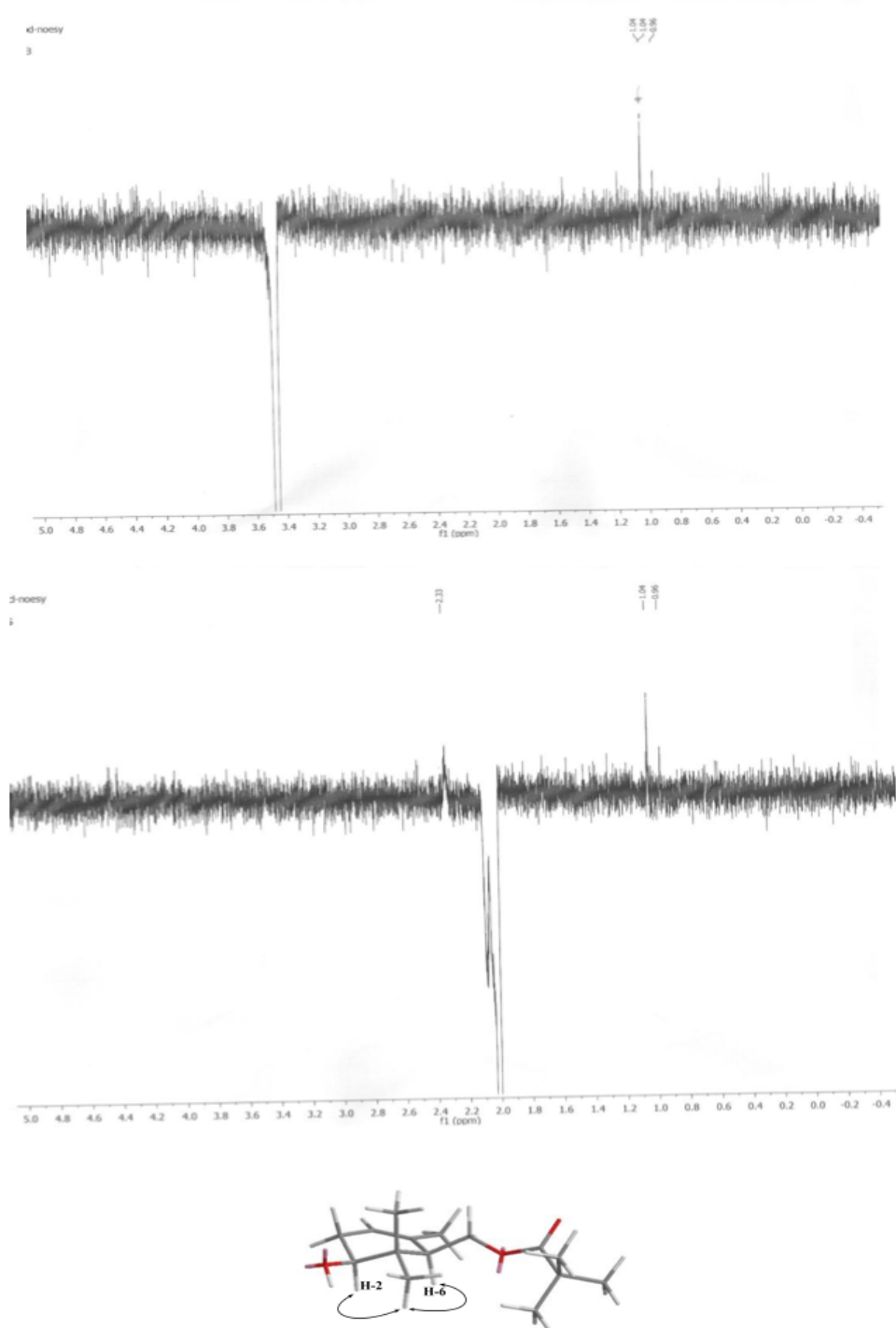
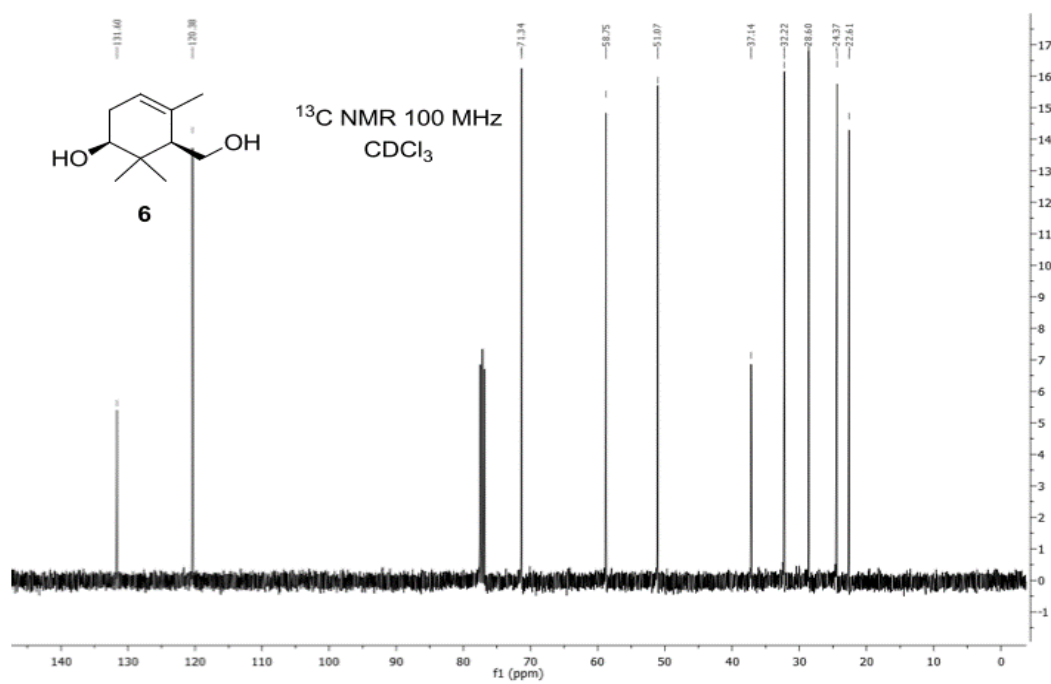
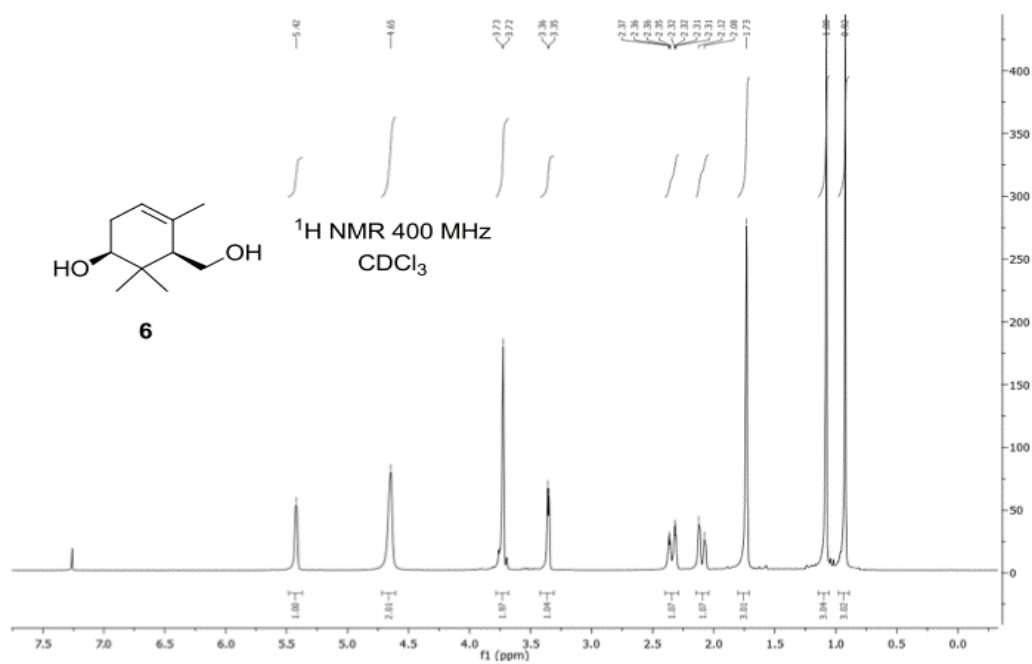
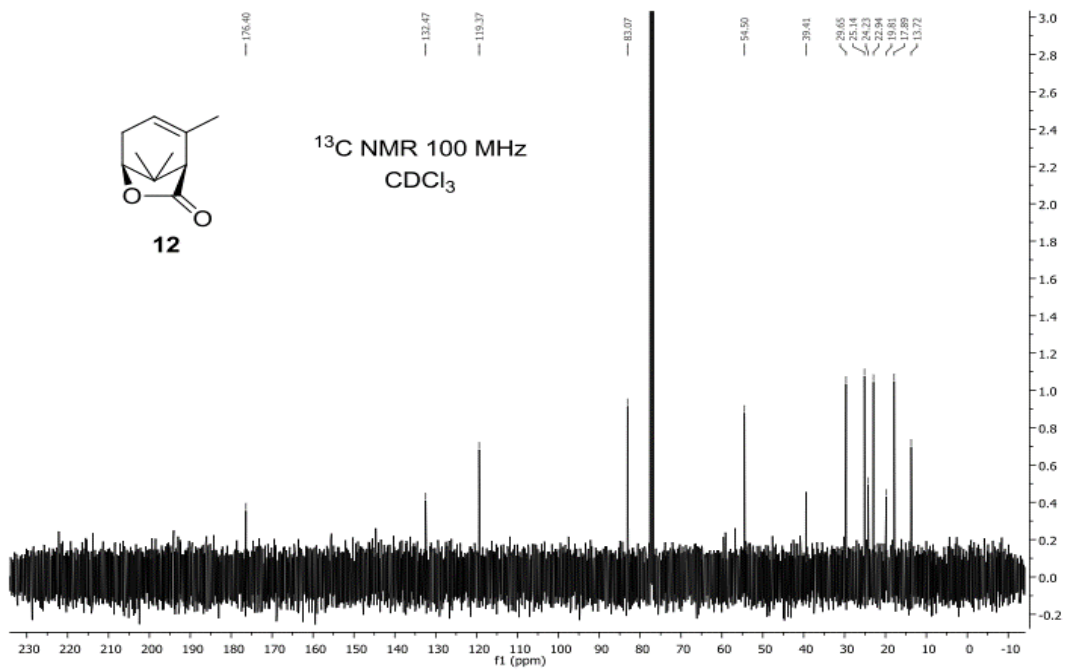
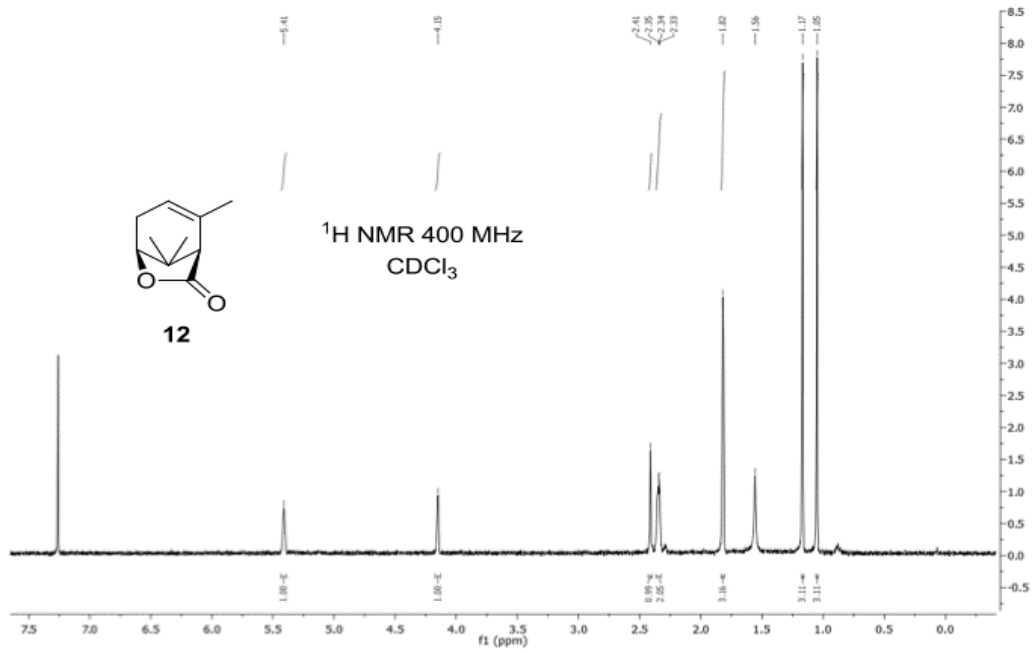
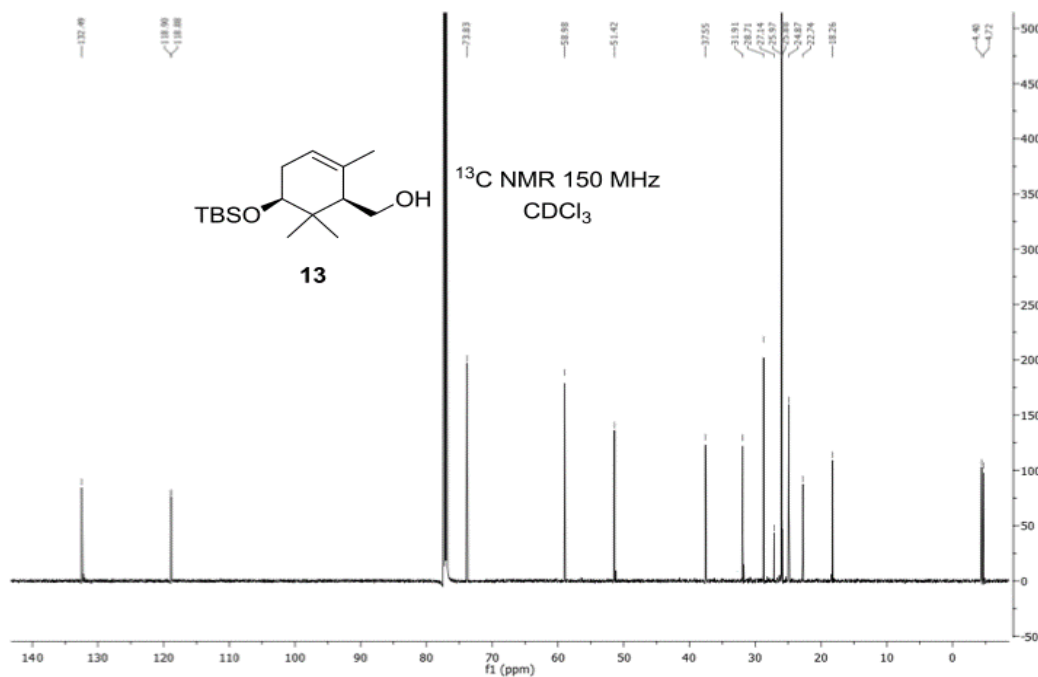
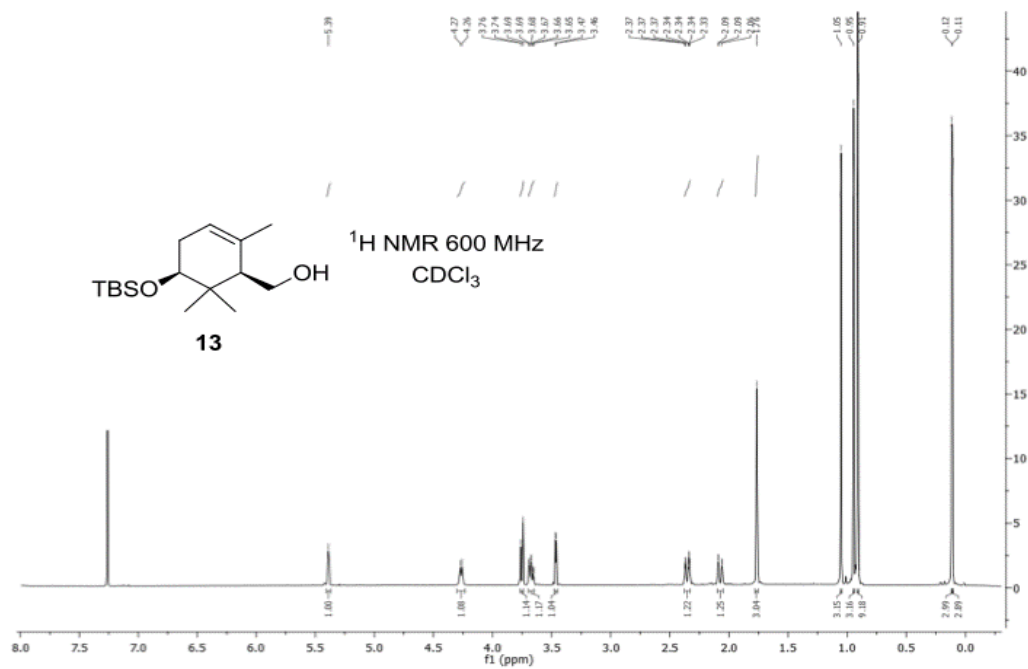


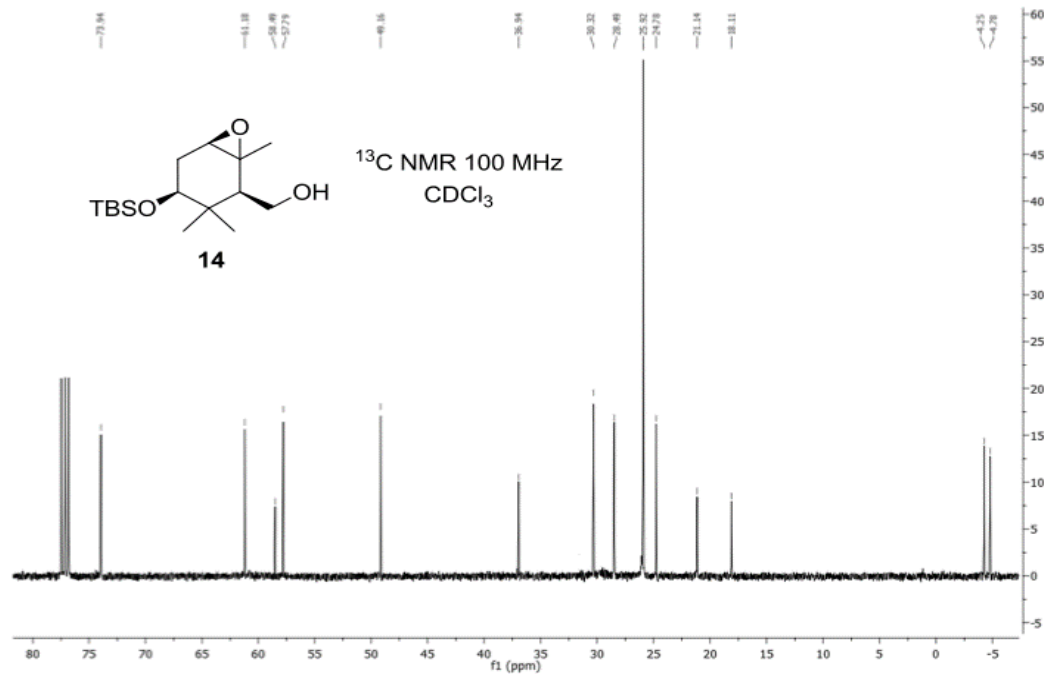
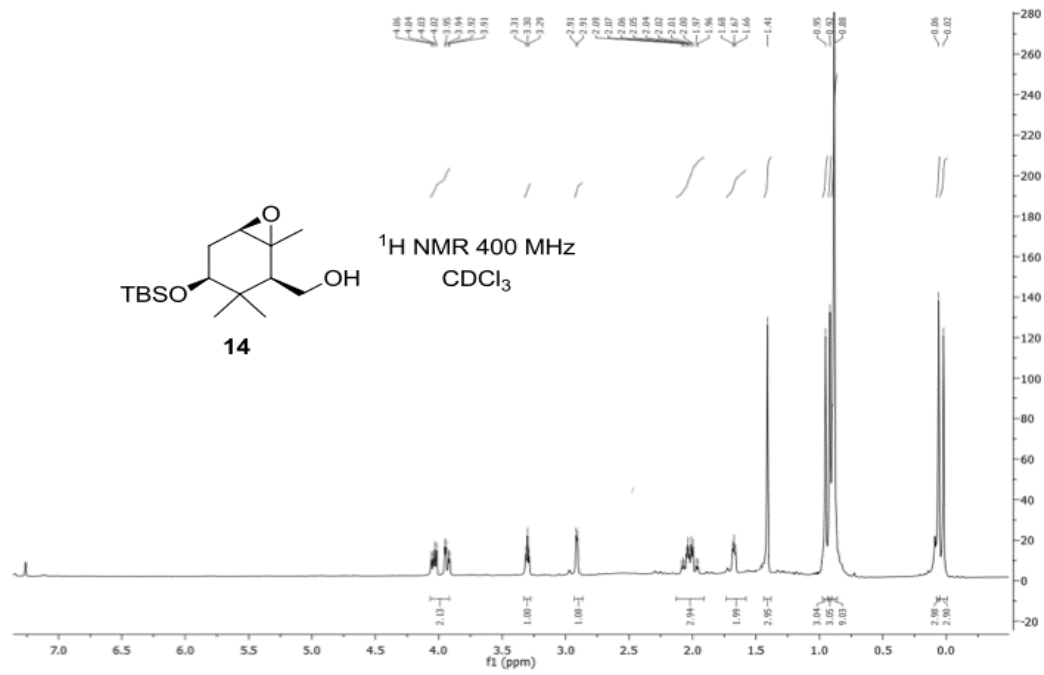
Fig. 1 NOE experiments to establish the stereochemistry of **6b**.

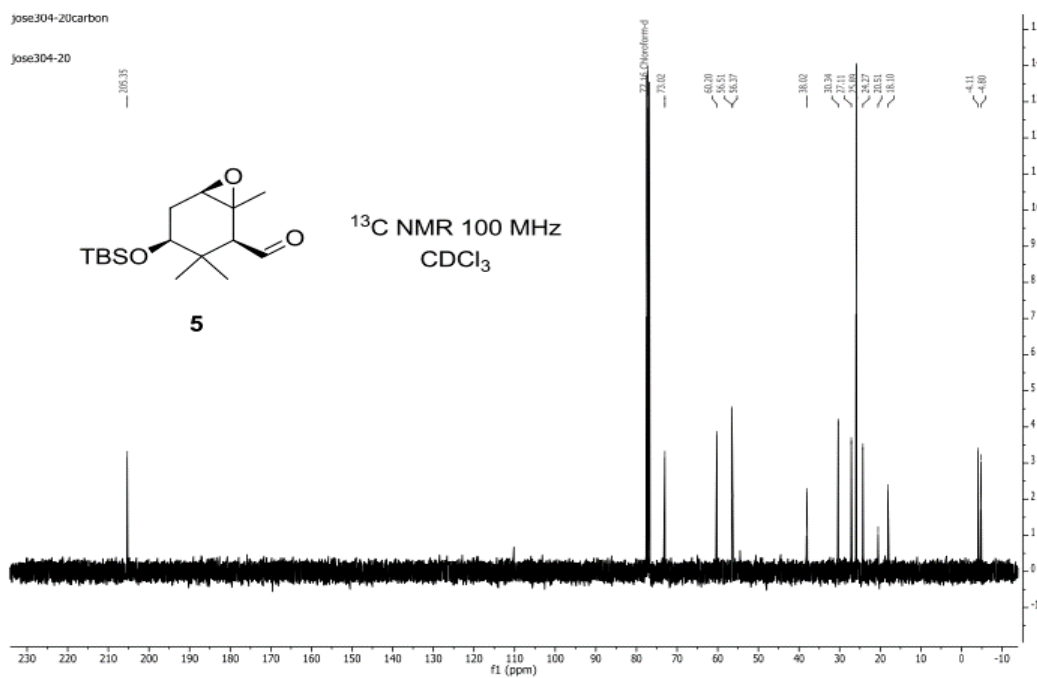
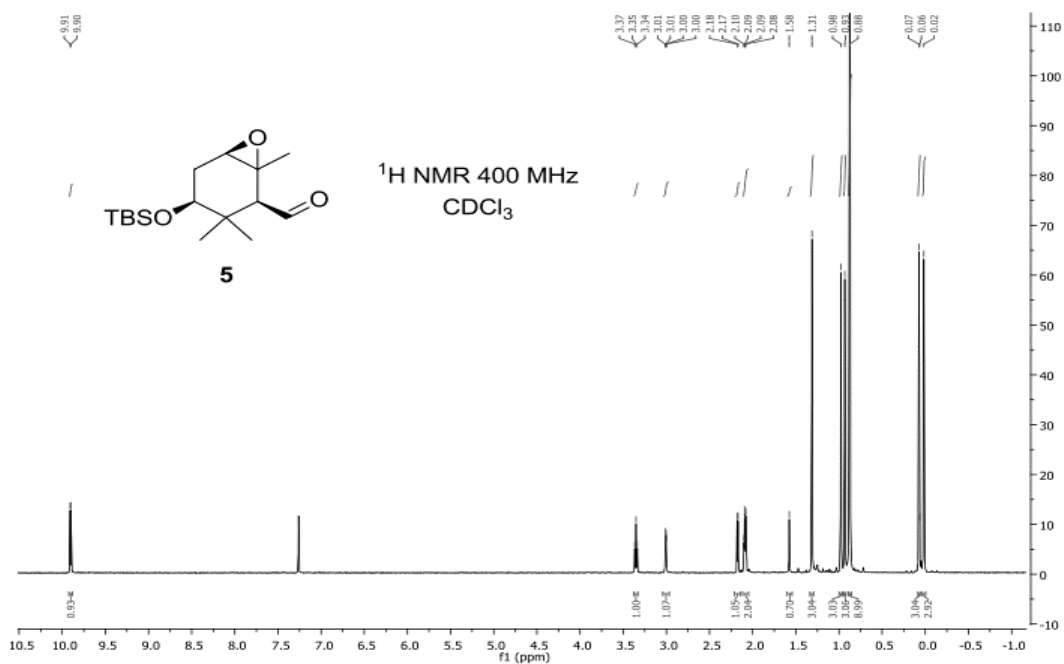
S-23

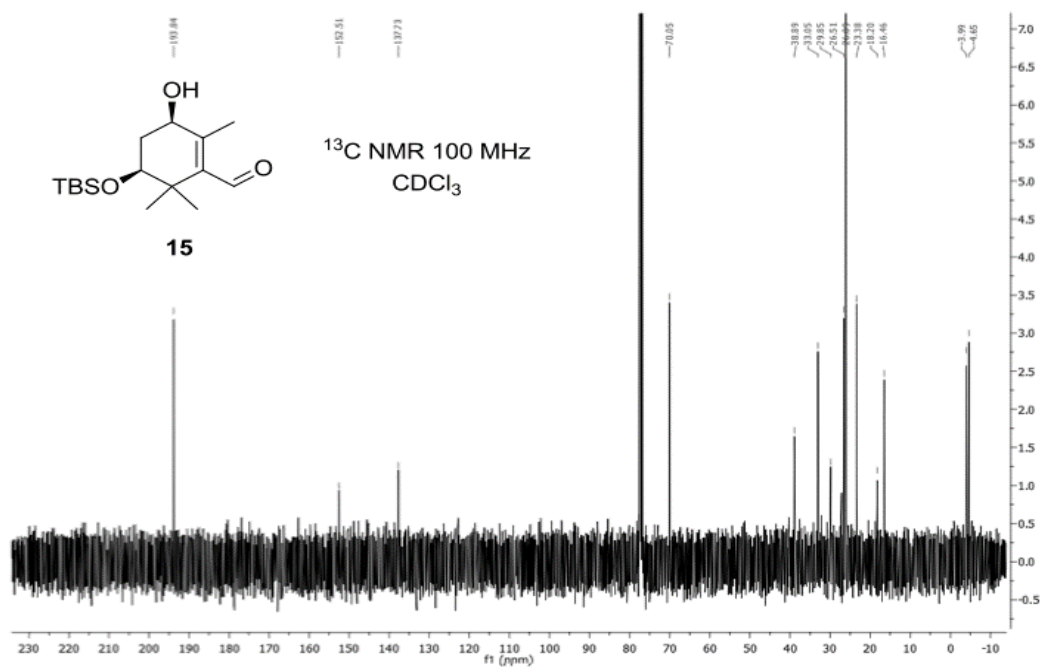
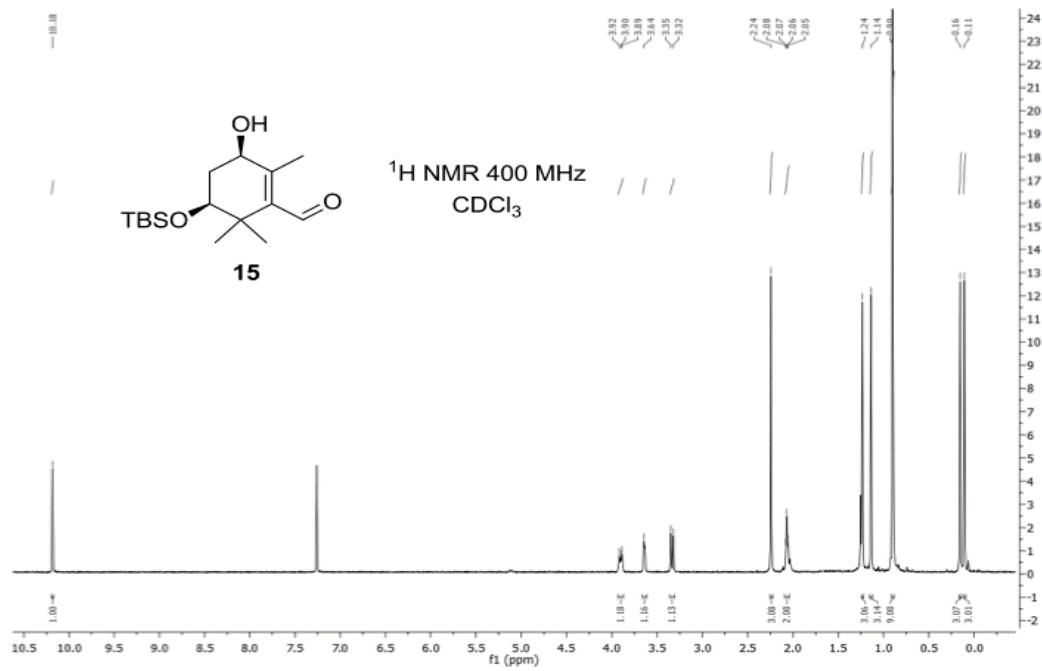


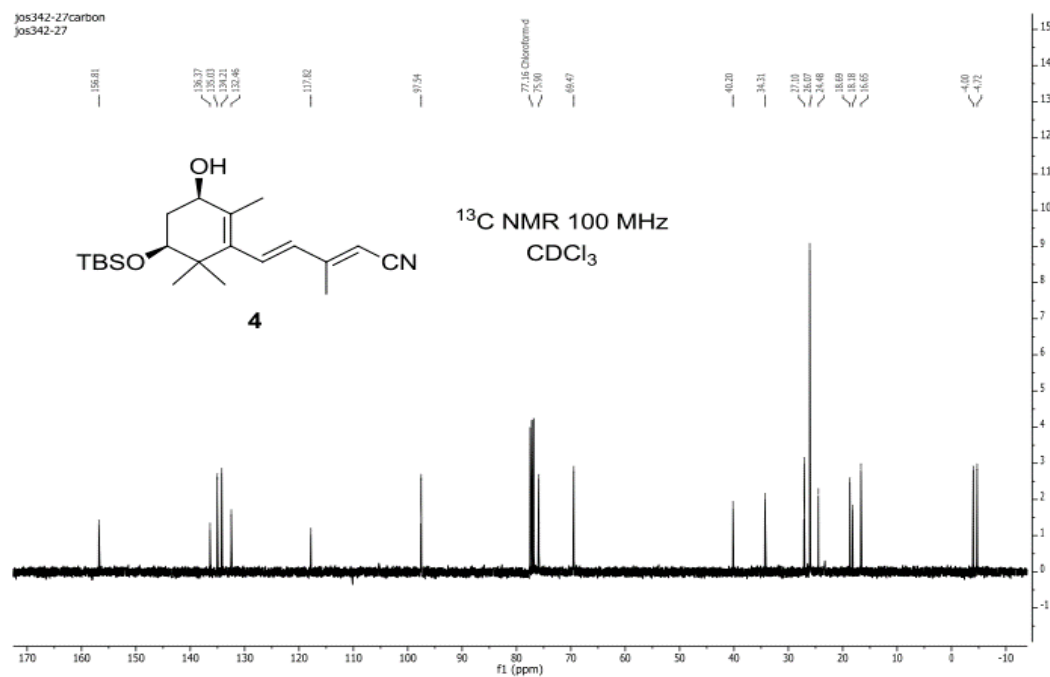
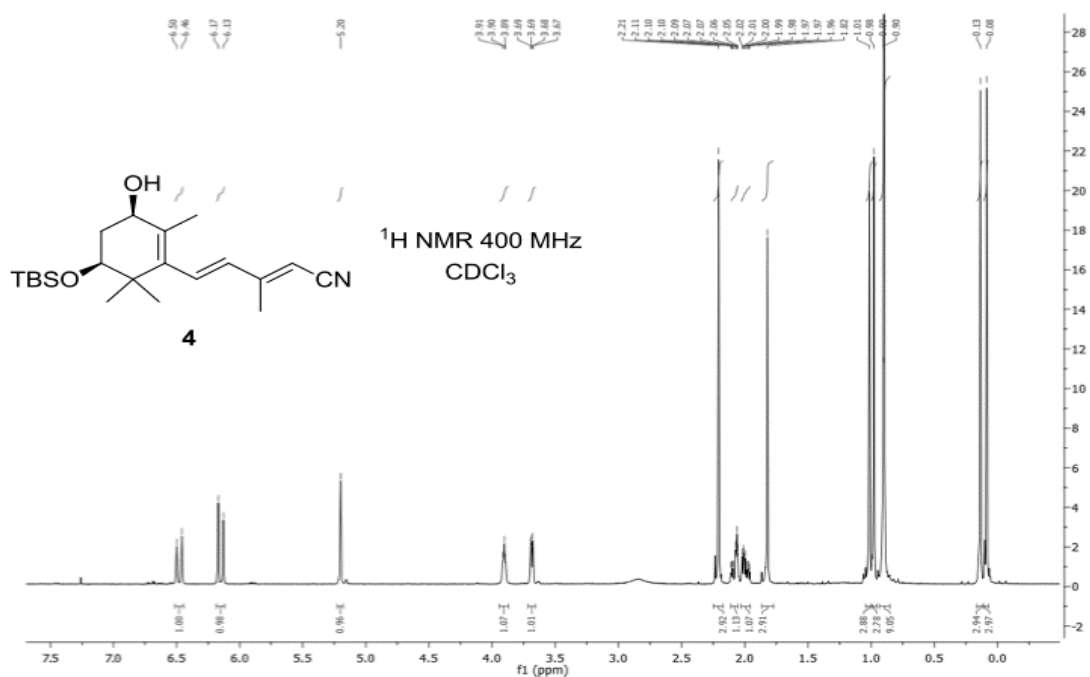


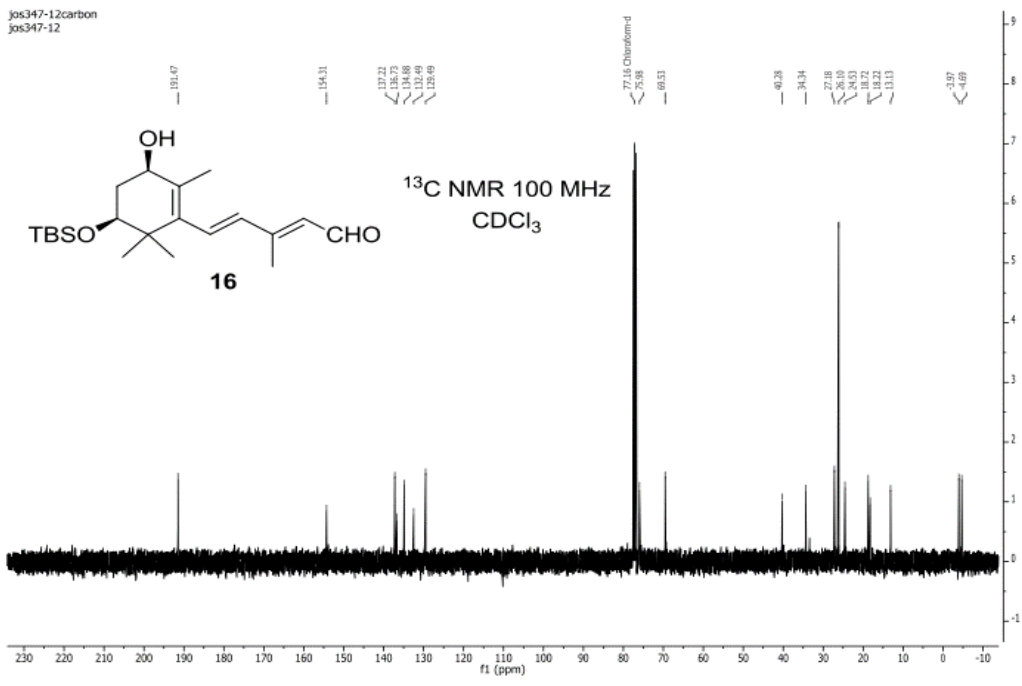
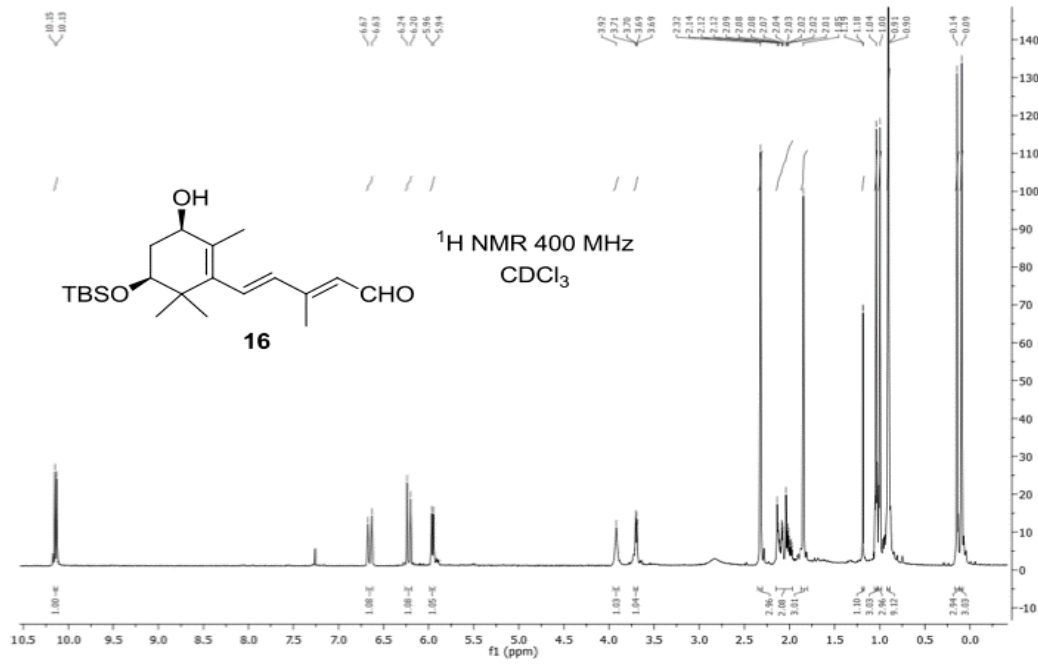




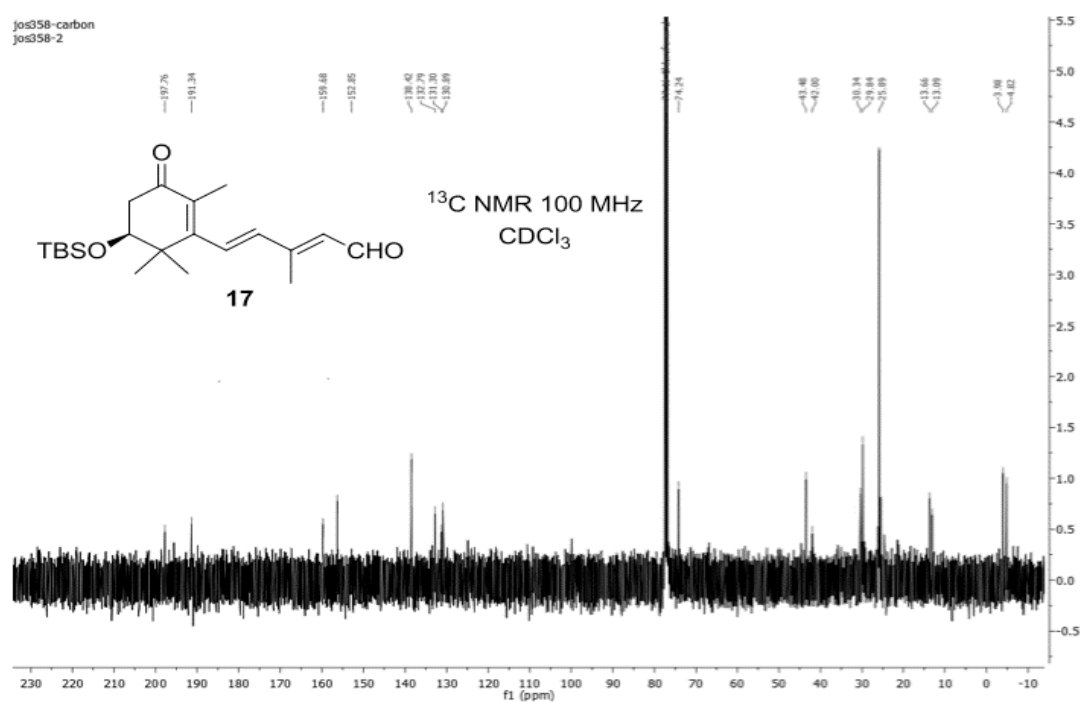
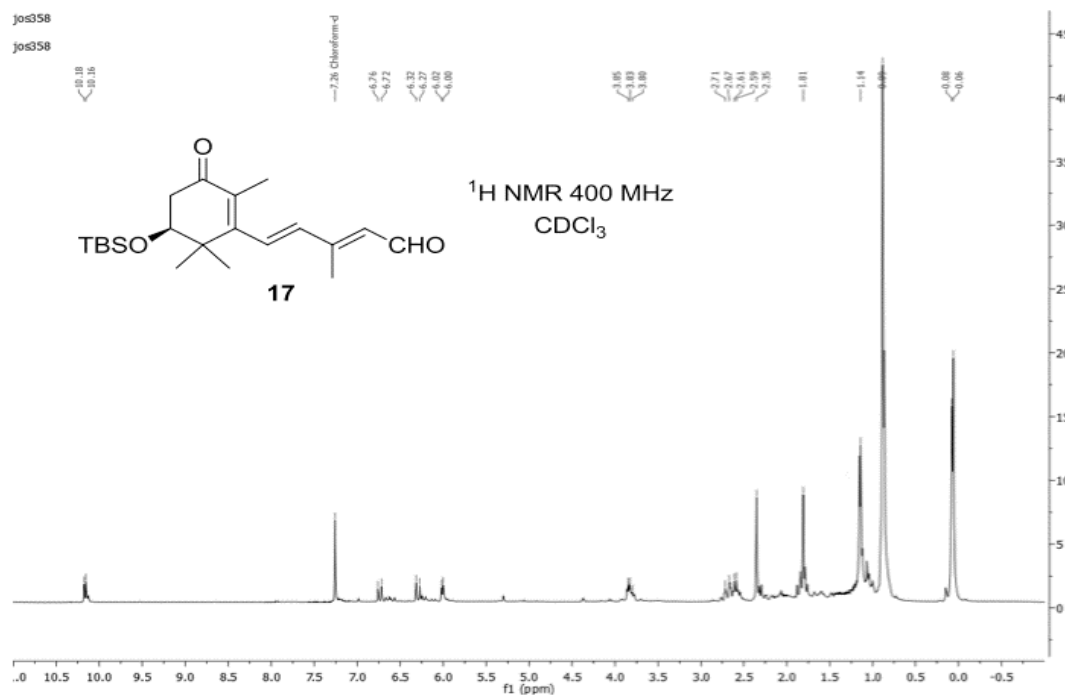


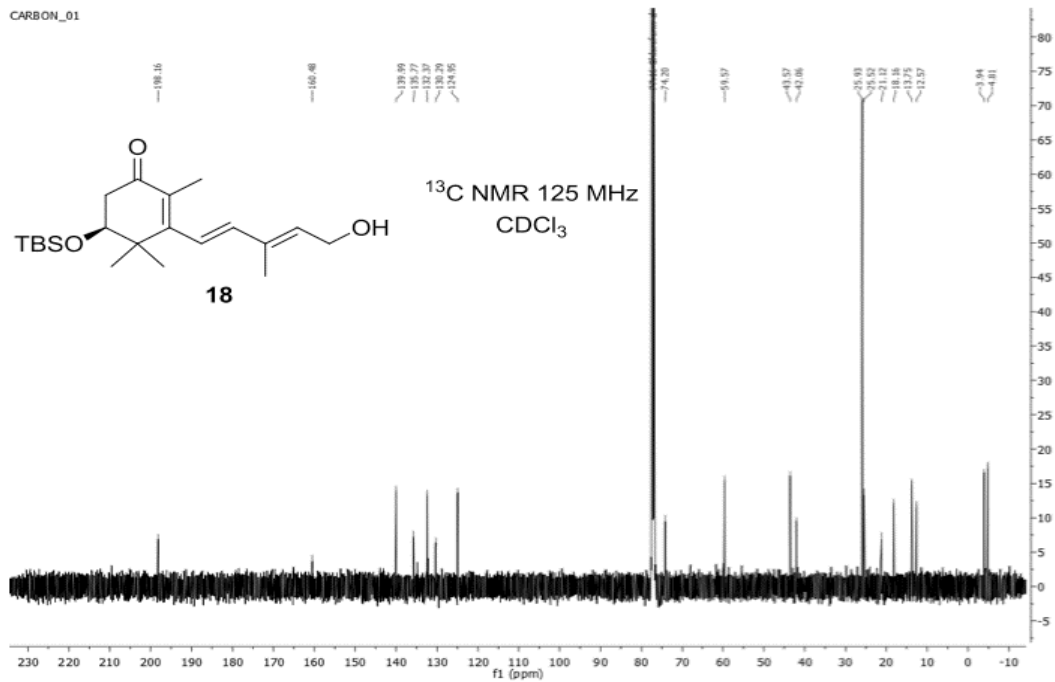
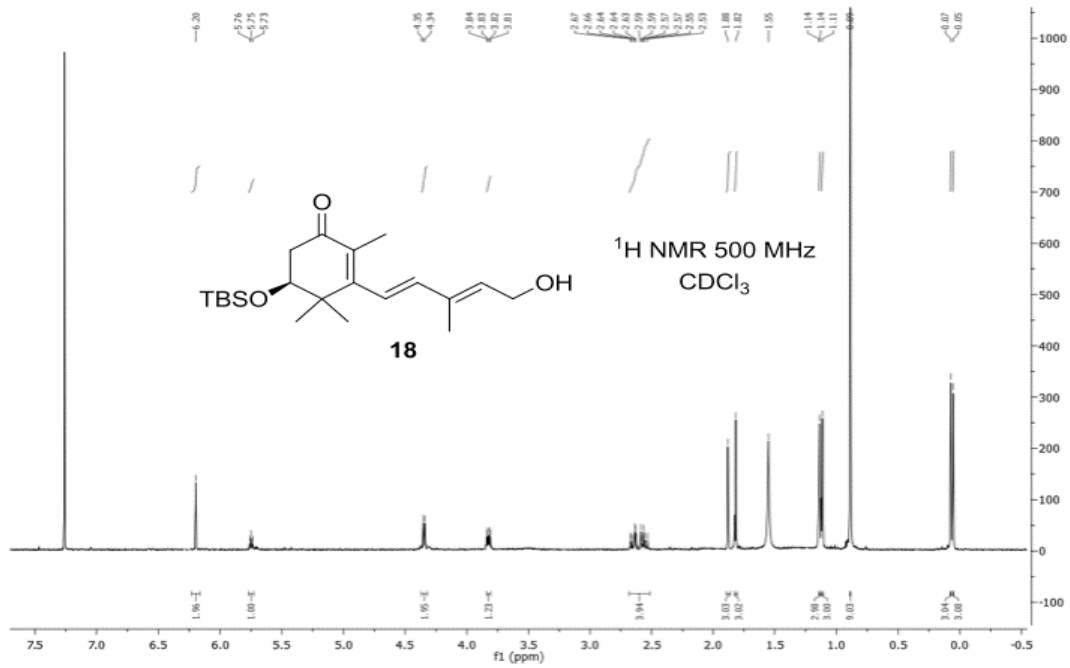


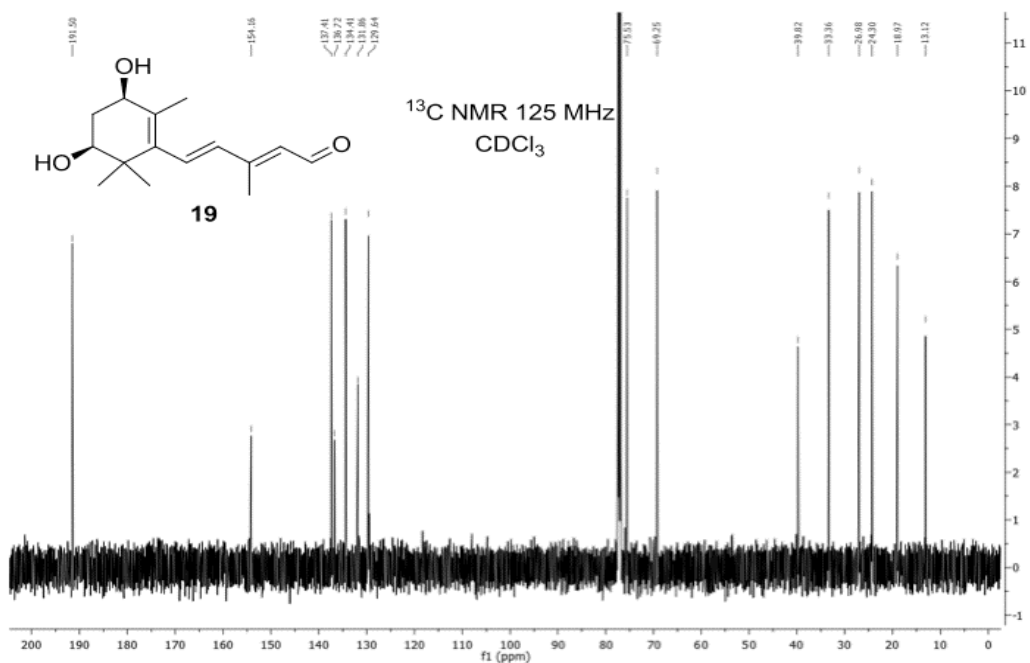
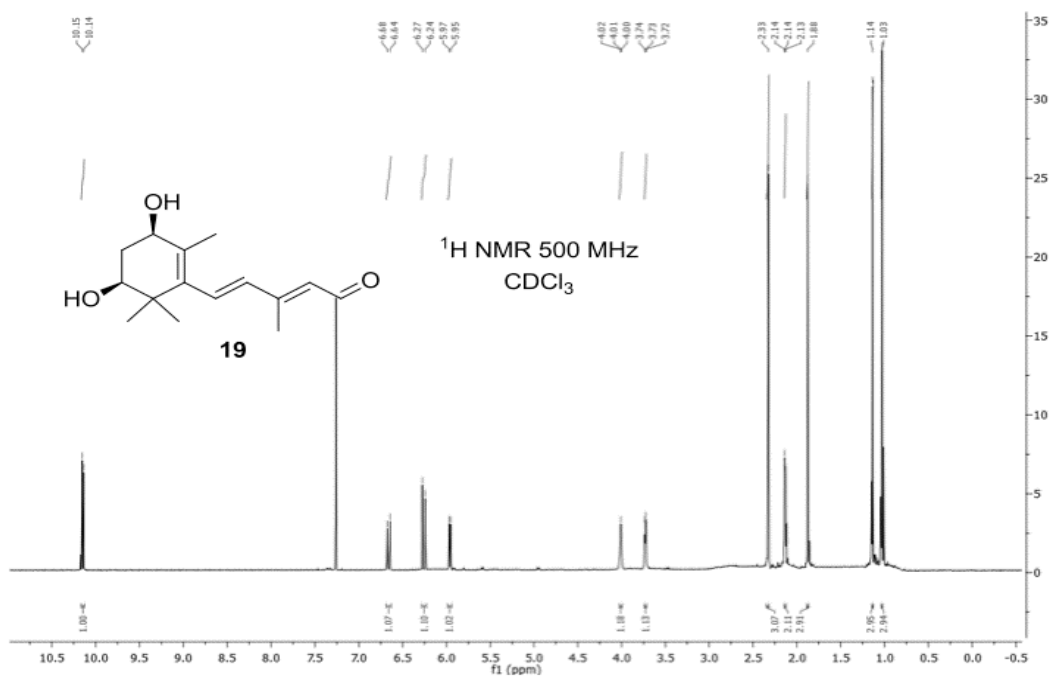


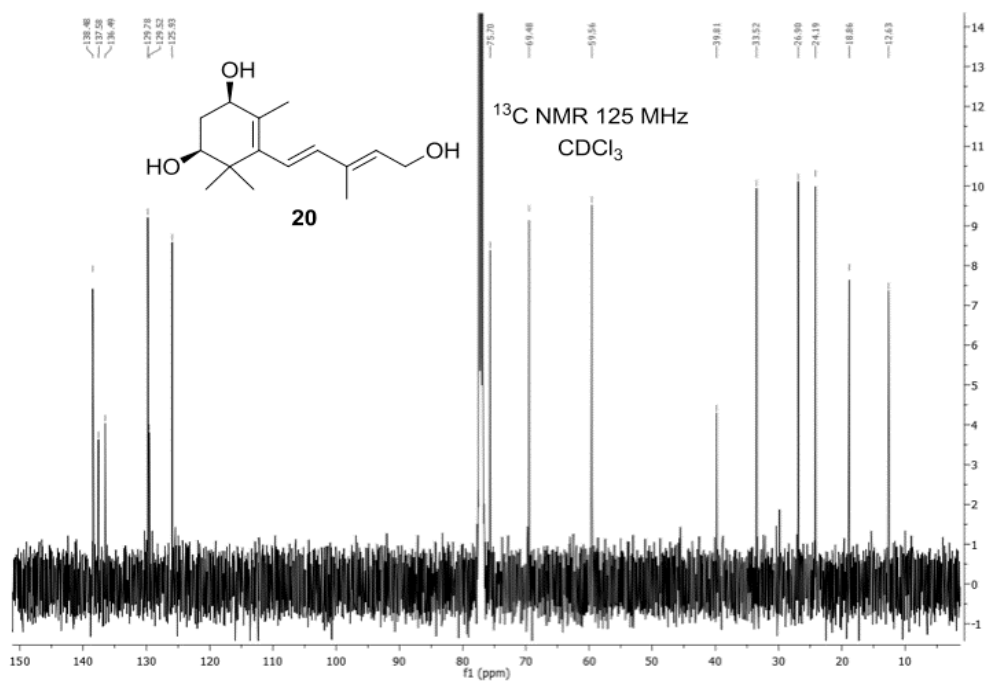
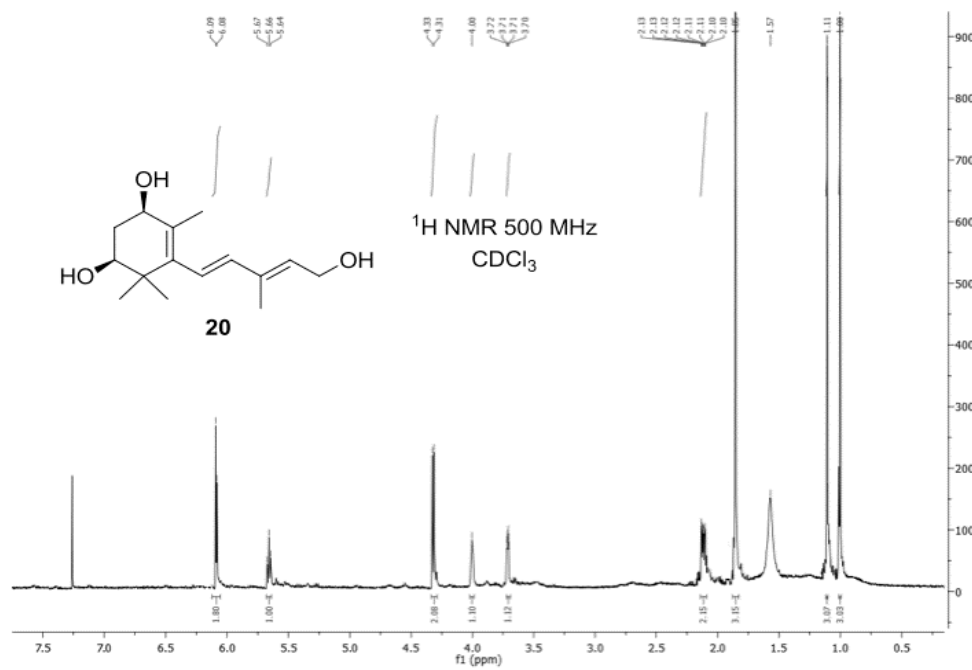


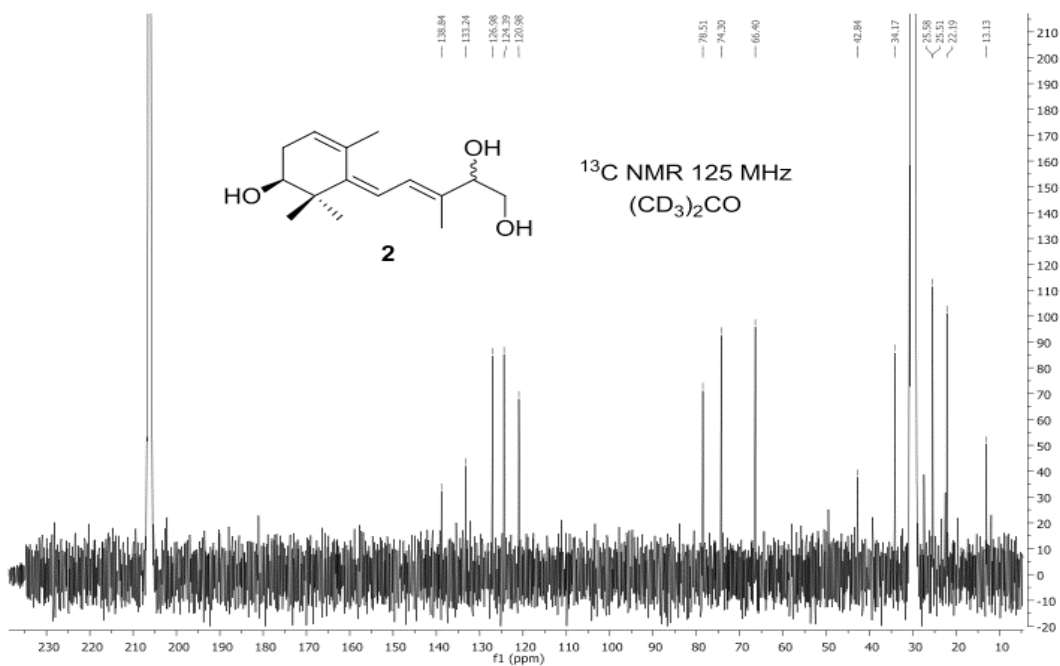
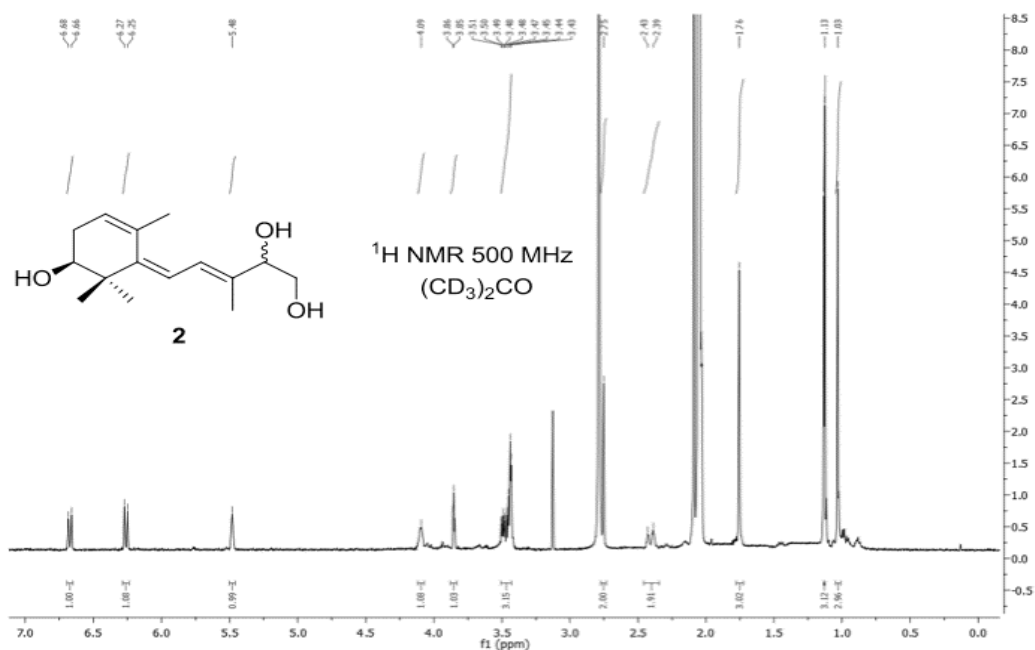
S-31

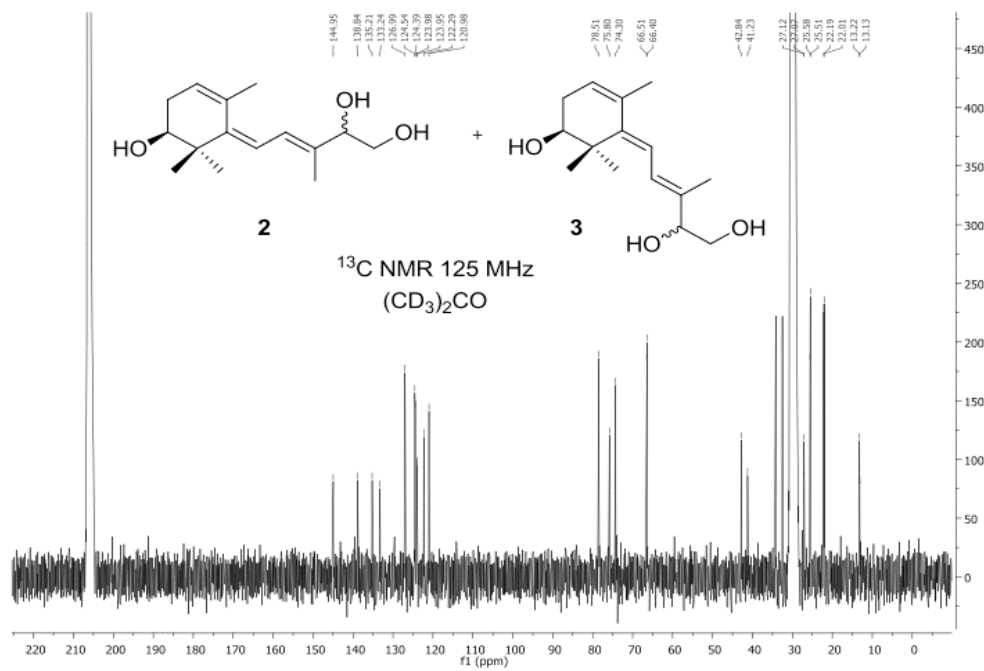
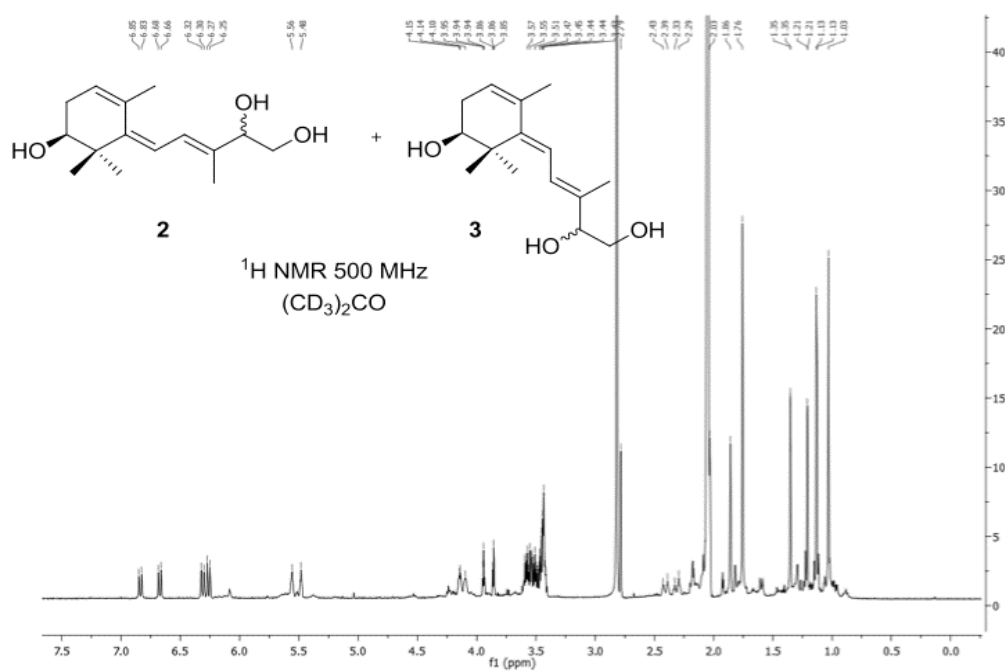


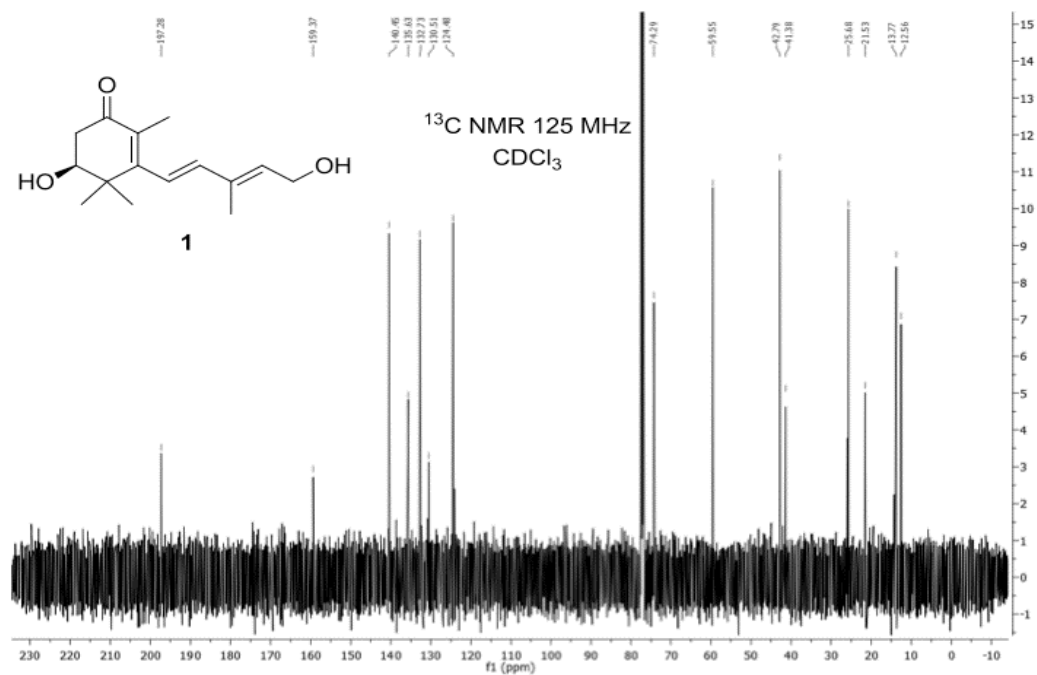
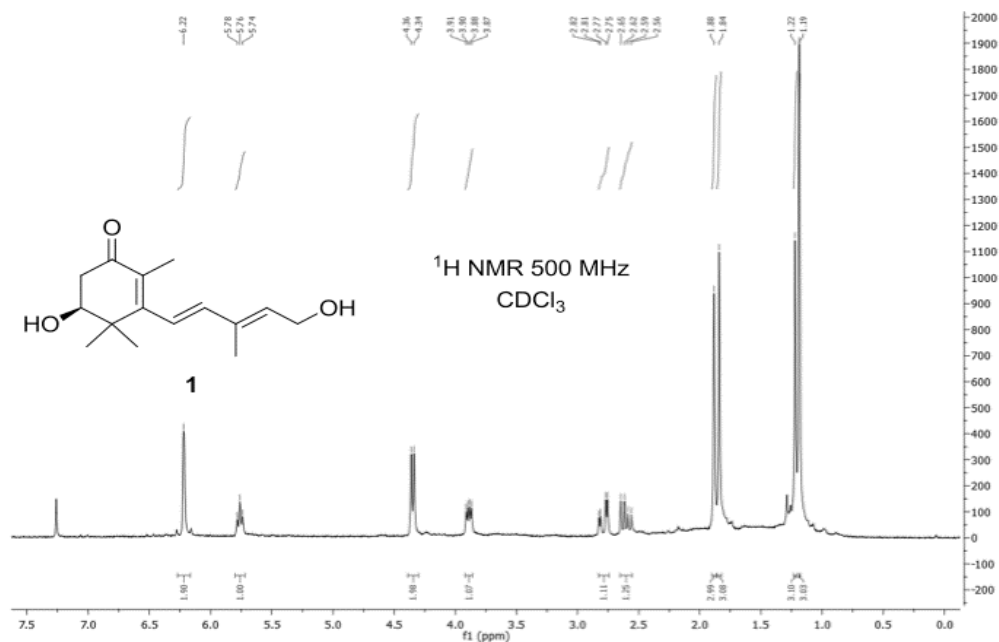




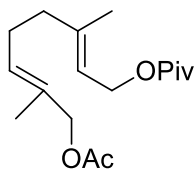






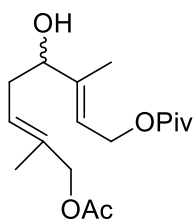


Aproximación hacia la síntesis de trisporoles y ácidos trispóricos mediante ciclación radicalaria con Cp₂TiCl.

**(96)**

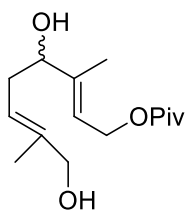
A una disolución de **94** (6.588 g, 27.64 mmol) en 49 ml de DCM seco, se le añade *t*BuO₂H (3.4 ml, 18.52 mmol) y SeO₂ (1012 mg, 9.12 mmol); todo ello bajo atmósfera de argón y en un baño de hielo durante una hora. Se diluye posteriormente con DCM y se lava con salmuera tres veces. Finalmente, se deseca con Na₂SO₄ y se concentra bajo presión reducida obteniéndose un crudo que se cromatografía en columna de sílica gel (Hexano : *t*-BuOMe, 2:1) aislándose el alcohol **96** (3.153 g, 54% tras el reciclado del producto de partida).

Pivalato de (2E,6E)-8-hidroxi-3,7-dimetilocta-2,6-dienilo (96): ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 5.36 (1H, t), 5.34 (1H, t), 4.56 (2H, d), 3.98 (2H, s), 2.16 (2H, q), 2.08 (2H, t), 1.70 (3H, s), 1.68 (3H, s), 1.12 (9H, s); HRFABMS: calculada para C₁₅H₂₆O₃Na [M+Na]⁺ 277.1780, encontrada: 277.1769.

**(98)**

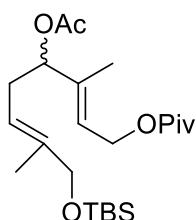
A una disolución de **97** (3.122 g, 10.53 mmol) se añade EtOH al 97.5% (1.035 ml) y SeO₂ (4.675 g, 42.14 mmol) bajo atmósfera de argón y reflujo. La mezcla de reacción se agitó durante dos horas y se diluyó con EtOAc, lavándose tres veces con salmuera y desecando con Na₂SO₄. Por último, se concentró bajo presión reducida obteniéndose un crudo que posteriormente se cromatografió en columna de sílica gel (Hexano : *t*-BuOMe, 2:1) aislándose el alcohol **98** (1.15 g, 42% tras el reciclado del producto de partida).

Pivalato de (2E, 6E)-8-acetoxi-4-hidroxi-3,7-dimetilocta-2,6-dienilo (98): ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 5.52 (1H, t), 5.39 (1H, t), 4.55 (2H, d), 4.40 (2H, s), 4.02 (1H, t), 2.26 (2H, t), 2.00 (3H, s), 1.65 (3H, s), 1.62 (3H, s), 1.12 (9H, s); ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃): δ 178.5, 170.9, 142.0, 133.0, 124.7, 120.2, 75.9, 69.9, 60.9, 49.4, 38.7, 33.6, 27.2, 27.0, 21.0, 14.2, 12.3; HRFABMS: calculada para C₁₇H₂₈O₅Na [M+Na]⁺ 335.1834, encontrada: 335.1824.



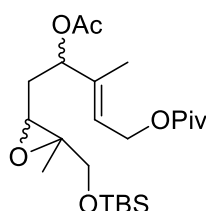
A una disolución de **98** (1.198 g, 3.83 mmol) en 27 ml de MeOH se le añade K_2CO_3 (529 mg, 3.83 mmol) en un baño de hielo. Pasada una hora y media, se diluye con salmuera y se lava tres veces con EtOAc. Se deseca con Na_2SO_4 y se concentra bajo presión reducida obteniéndose **99** (1 g, 99%).

(**99**) *Pivalato de (2E, 6E)-4,8-dihidroxi-3,7-dimetilocta-2,6-dienilo (99)*: 1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$): δ 5.52 (1H, t), 5.38 (1H, t), 4.58 (2H, d), 4.04 (1H, t), 3.94 (2H, s), 2.52 (2H, s), 1.68 (3H, s), 1.62 (3H, s), 1.18 (9H, s); ^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$): δ 178.7, 142.0, 137.8, 121.0, 120.1, 76.1, 68.5, 61.1, 38.7, 33.3, 27.2, 14.0, 12.4; HRFABMS: calculada para $C_{15}H_{26}O_4Na$ $[M+Na]^+$ 293.1729, encontrada: 293.1738.



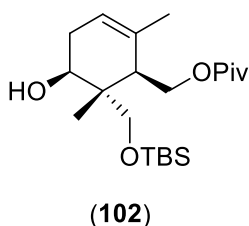
(**100**) A una disolución de **99** (700 mg, 1.82 mmol) se le añade una disolución de 8 ml de piridina, DMAP (13 mg, 0.1 mmol) y Ac_2O (4 ml, 41.86 mmol) bajo atmósfera de argón y a temperatura ambiente. Después de una hora, se lava tres veces con HCl 1N, $NaHCO_3$ y salmuera. Se deseca con Na_2SO_4 y se concentra bajo presión reducida obteniéndose un crudo que se cromatografió en columna de sílica gel (Hexano : *t*-BuOMe, 2:1) obteniendo el producto **100** (567 mg, 73%).

Pivalato de (2E, 6E)-4-acetoxi-8-(tert-butildimetilsililoxi)-3,7-dimetilocta-2,6-dienilo (100): 1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$): δ 5.52 (1H, t), 5.25 (1H, t), 5.10 (1H, t), 4.55 (2H, d), 3.94 (2H, s), 2.45 (2H, s), 1.68 (3H, s), 1.62 (3H, s), 1.18 (9H, s); ^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$): δ 178.7, 142.0, 137.8, 121.0, 120.1, 76.1, 68.5, 61.1, 38.7, 33.3, 27.2, 14.0, 12.4; HRFABMS: calculada para $C_{15}H_{26}O_4Na$ $[M+Na]^+$ 426.2801, encontrada: 426.2789.



(**101**) A una disolución de **100** (431 mg, 1.01 mmol) se añade 20 ml de DCM anhidro. Por otra parte, se disuelve AMCPB (348.65 mg, 2.02 mmol) en 19 ml de DCM anhidro y se añade a la disolución de partida en un baño de hielo y bajo atmósfera de argón. Pasadas dos horas y media, se para la reacción con *t*-BuOMe y se lava tres veces con $NaHCO_3$ y salmuera. Se deseca con Na_2SO_4 anhidro y se concentra bajo presión reducida obteniéndose un crudo que se cromatografió en columna de sílica gel (Hexano : *t*-BuOMe, 4:1) obteniendo el producto **101** (402 mg, 90%).

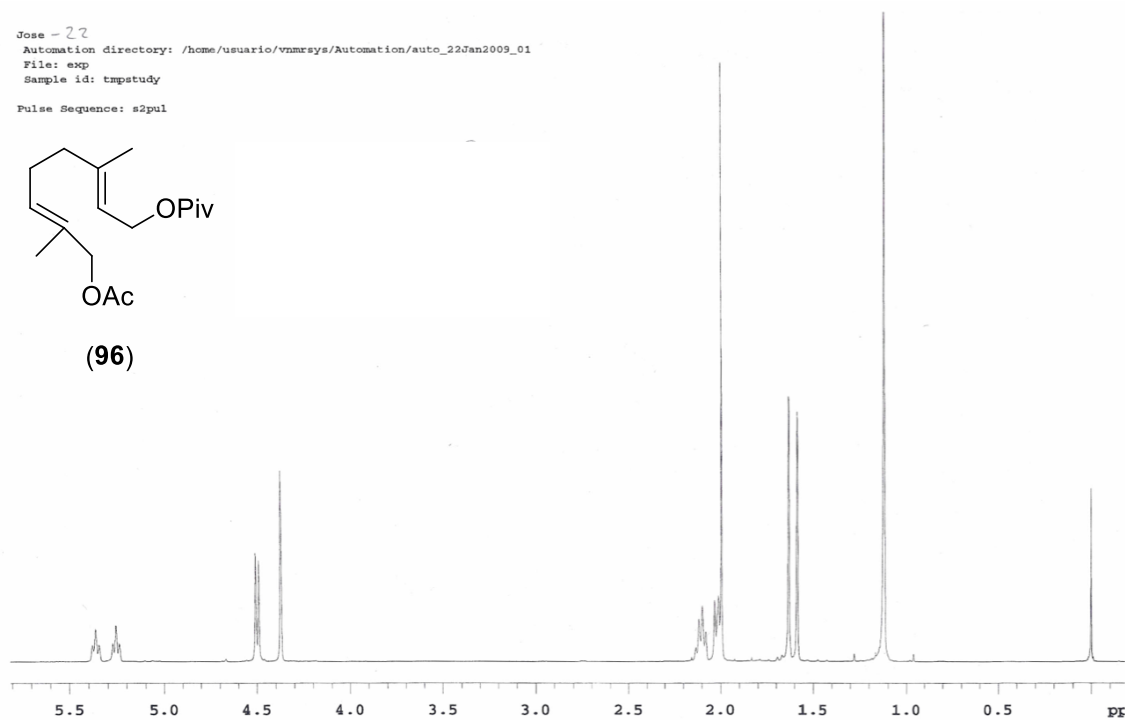
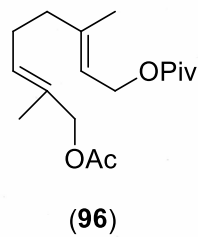
Pivaloato de (E)-4-acetoxi-5-(3-((tert-butildimetilsililoxi)metil)-3-metiloxiran-2-il)-3-metilpent-2-enilo (101, mezcla de diastereoisómeros): ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 5.56 (1H, ta), 5.26 (1H, m), 4.54 (2H, d), 3.50 (2H, s), 2.84 (1H, m), 2.05 (3H, s), 1.85 (2H, m), 1.66 (3H, s), 1.22 (3H, s), 1.16 (9H, s), 0.82 (9H, s), 0.00 (6H, s).



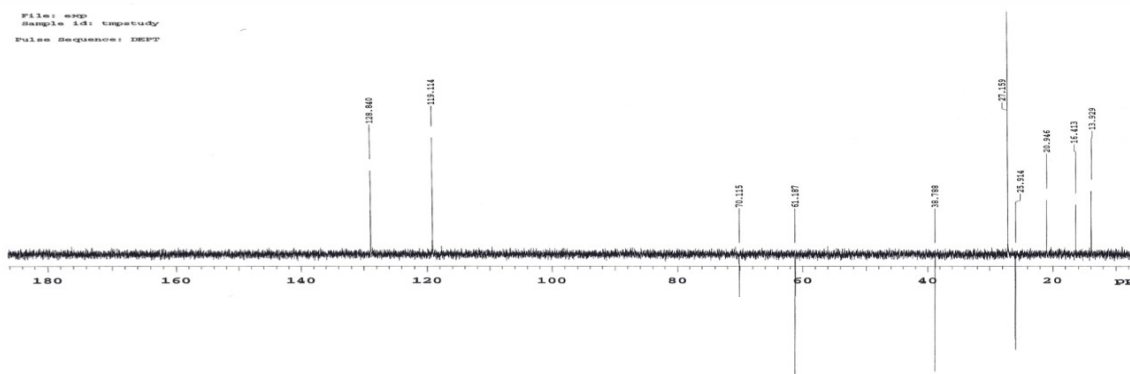
En un matraz previamente flameado, se desoxigena THF durante 30 minutos. En otro matraz también flameado, se añade el producto **101** (360 mg, 0.81 mmol) conectando vacío y posteriormente una corriente de argón. El matraz de reacción junto con un adaptador y un sistema de reflujo se flamea para a continuación añadir Cp_2TiCl_2 (608 mg, 2.44 mmol) junto con Mn (356 mg, 6.48 mmol) y 5 ml de THF hasta que cambie la disolución de color rojo a verde. A continuación, se añade el producto **11** poniendo a calentar a reflujo y con atmósfera de argón. Pasados 15 minutos, la reacción se diluye con *t*-BuOMe y se filtra el crudo de la reacción en un embudo de decantación. Se lava tres veces con HCl 2N y salmuera, se deseca con Na_2SO_4 anhidro y se concentra bajo presión reducida. El crudo obtenido se cromatografía en columna de sílica gel (Hexano : *t*-BuOMe, 7:1) rindiendo el producto **102** (252 mg, 70%).

Pivaloato de 6-((tert-butildimetilsililoxi)metil)-5-hidroxi-2,6-dimetilciclohexen-2-enilmetilo (102): ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3): δ 5.39 (1H, sa), 4.30 (1H, dd), 4.07 (1H, dd), 3.85 (1H, dd), 3.68 (1H, d, $J = 10.0$), 3.53 (1H, d, $J = 10.0$), 2.22 (2H, m), 2.02 (1H, m), 1.68 (3H, s), 1.19 (9H, s), 0.89 (9H, s), 0.88 (3H, s), 0.07 (3H, s), 0.06 (3H, s); ^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3): δ 178.5, 132.6, 121.1, 71.5, 68.9, 62.7, 43.1, 41.4, 38.8, 30.8, 27.2, 25.9, 22.0, 18.2, 12.0, -5.5; HRFABMS: calculada para $\text{C}_{21}\text{H}_{40}\text{O}_4\text{Si}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 385.2774, encontrada: 385.2790.

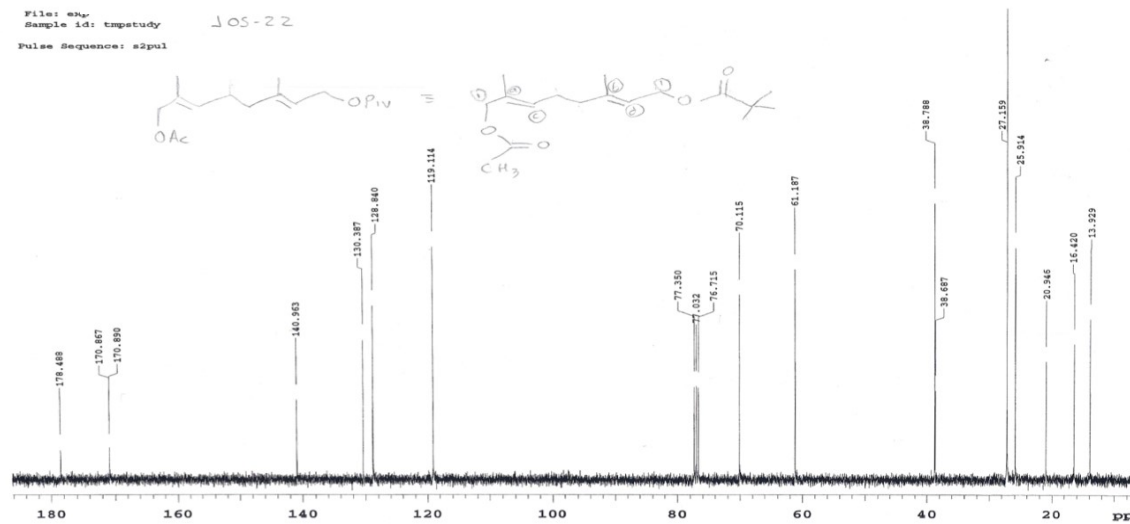
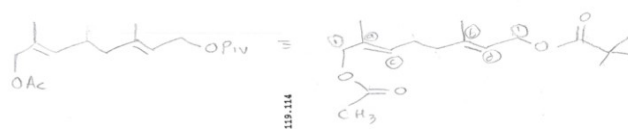
Jose - 22
 Automation directory: /home/usuario/vnmrsvs/Automation/auto_22Jan2009_01
 File: exp
 Sample id: tmpstudy
 Pulse Sequence: s2pul



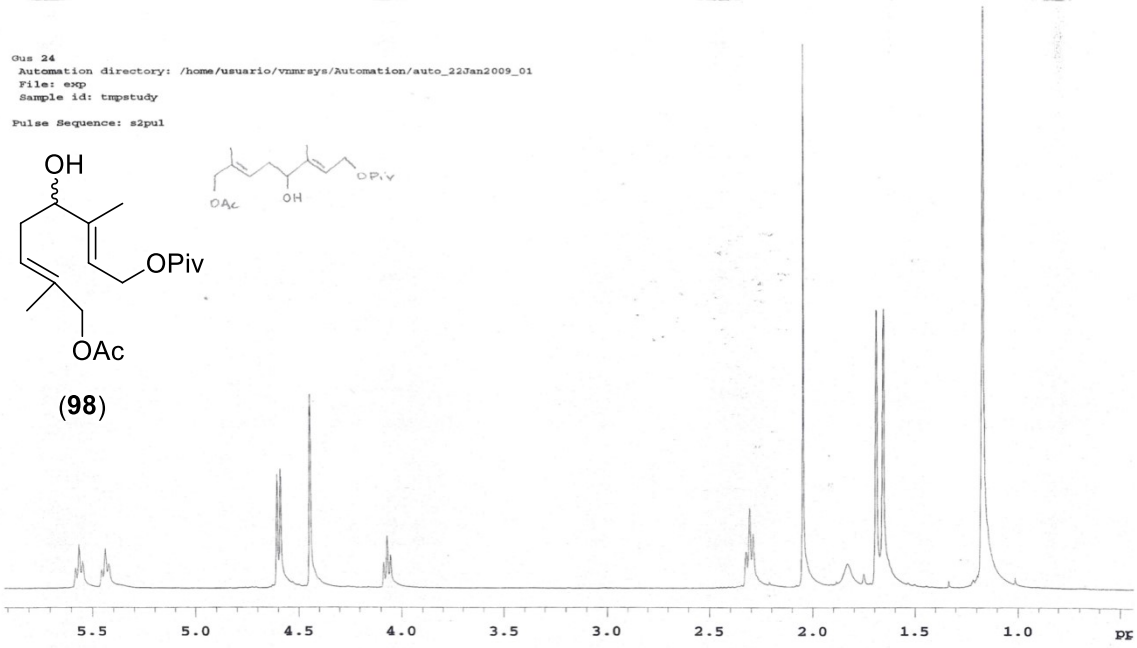
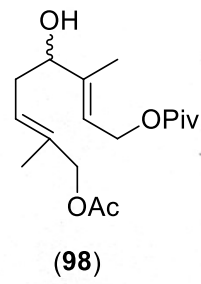
File: exp
 Sample id: tmpstudy
 Pulse Sequence: DEPT



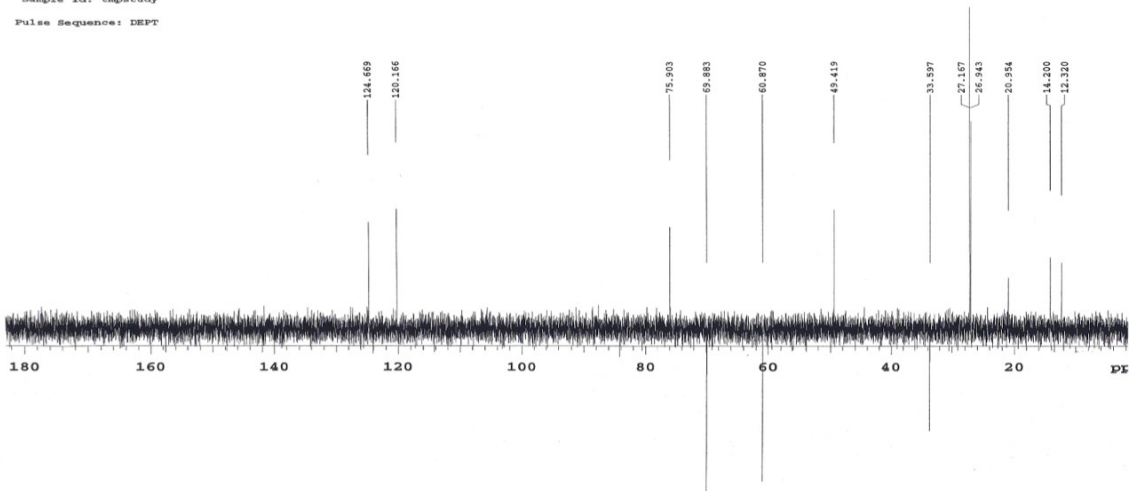
File: exp
 Sample id: tmpstudy
 Pulse Sequence: s2pul



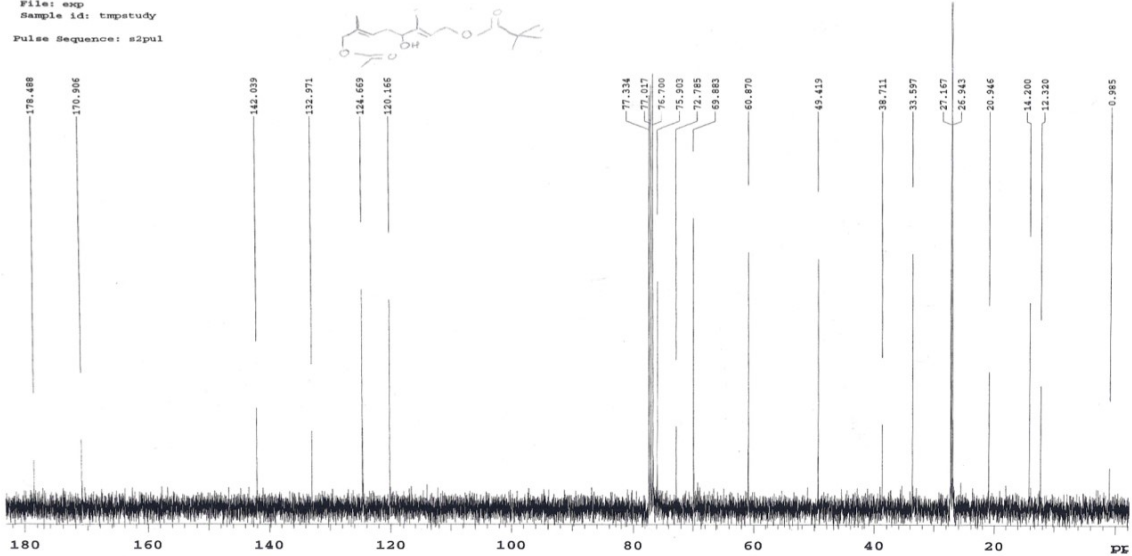
Qus 24
 Automation directory: /home/usuario/vnmrsws/Automation/auto_22Jan2009_01
 File: exp
 Sample id: tmpstudy
 Pulse Sequence: s2pul



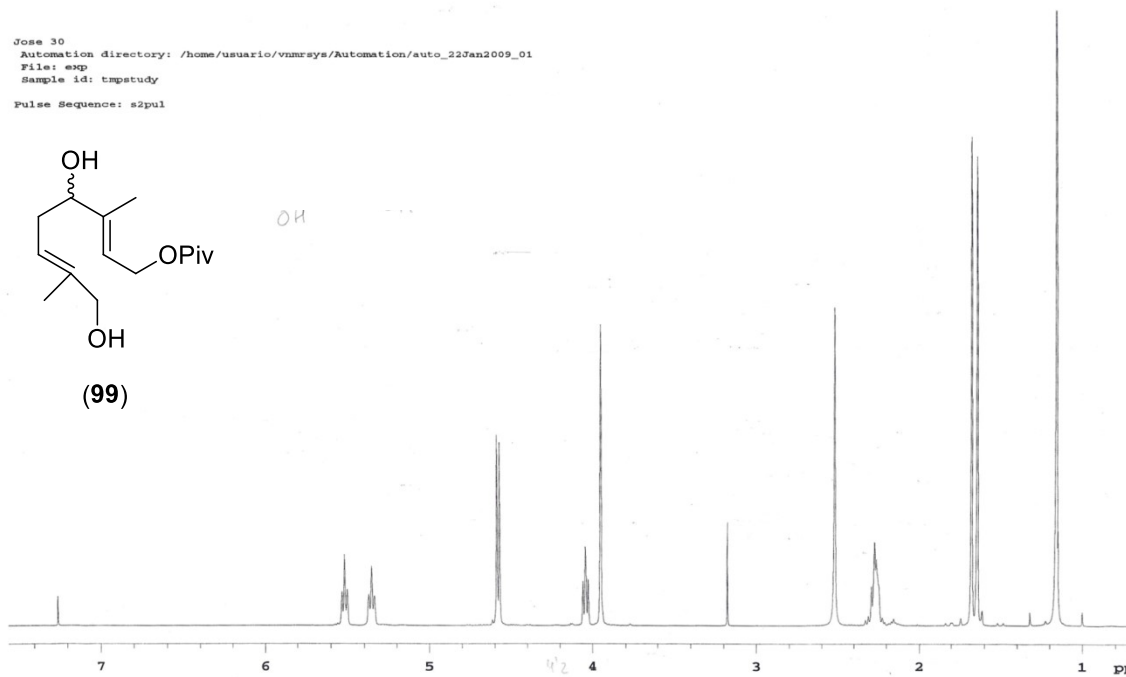
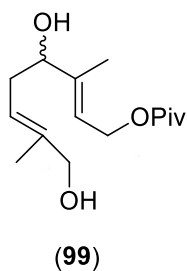
Automation directory: /home/usuario/vnmrsws/Automation/auto_22Jan2009_01
 File: exp
 Sample id: tmpstudy
 Pulse Sequence: DEPT



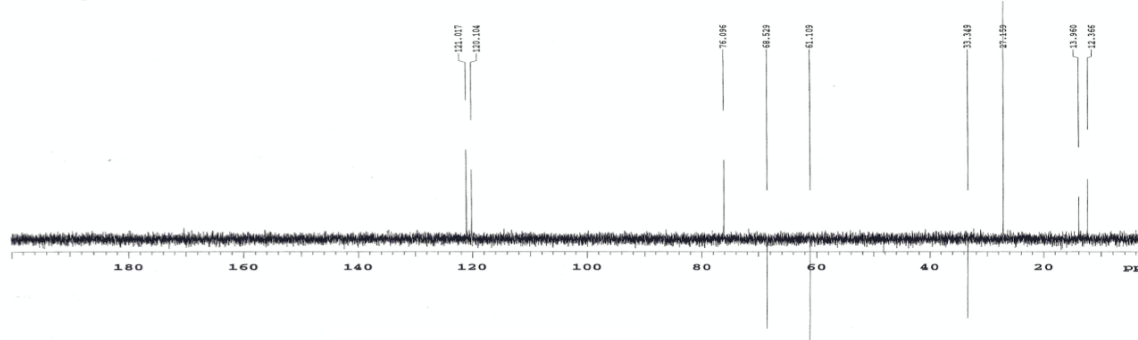
File: exp
 Sample id: tmpstudy
 Pulse Sequence: s2pul



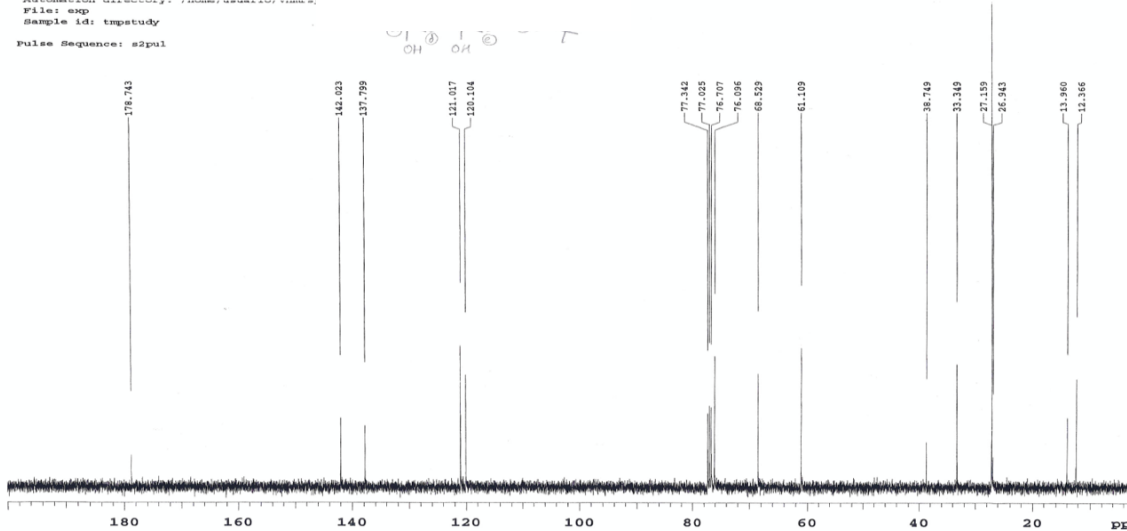
Jose 30
 Automation directory: /home/usuario/vnmrsws/Automation/auto_22Jan2009_01
 File: exp
 Sample id: tmpstudy
 Pulse Sequence: s2pul



File: exp
 Sample id: tmpstudy
 Pulse Sequence: DEPT



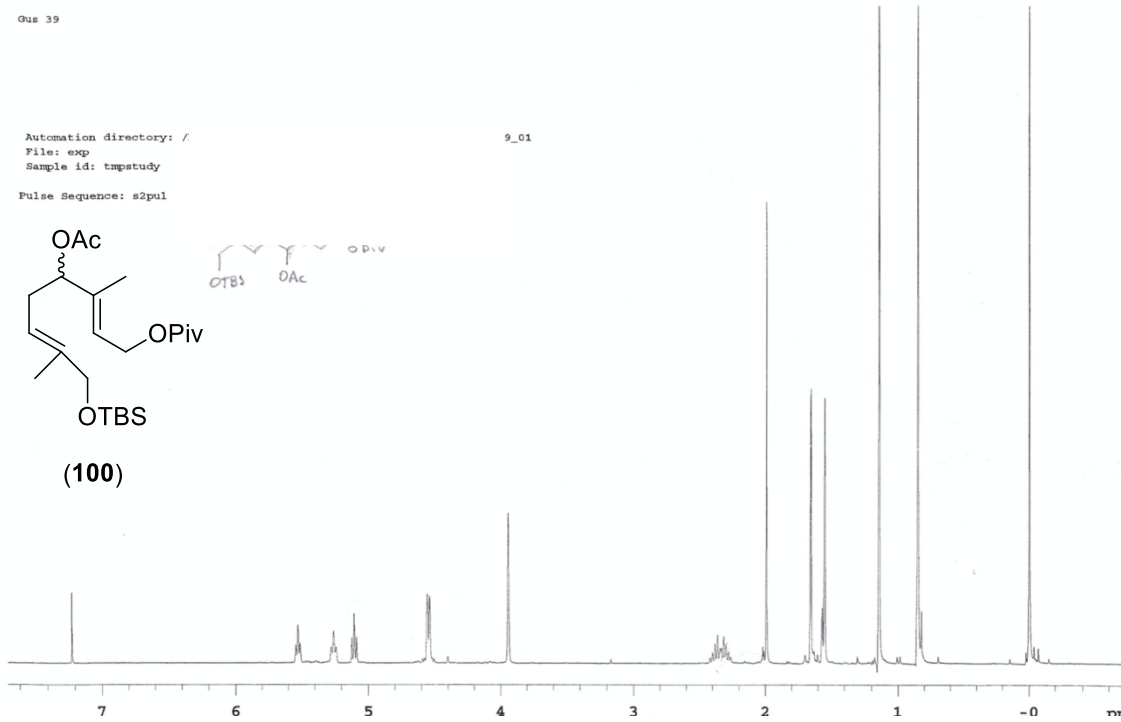
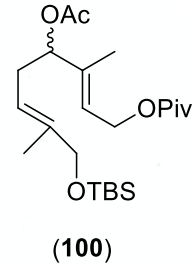
File: exp
 Sample id: tmpstudy
 Pulse Sequence: s2pul



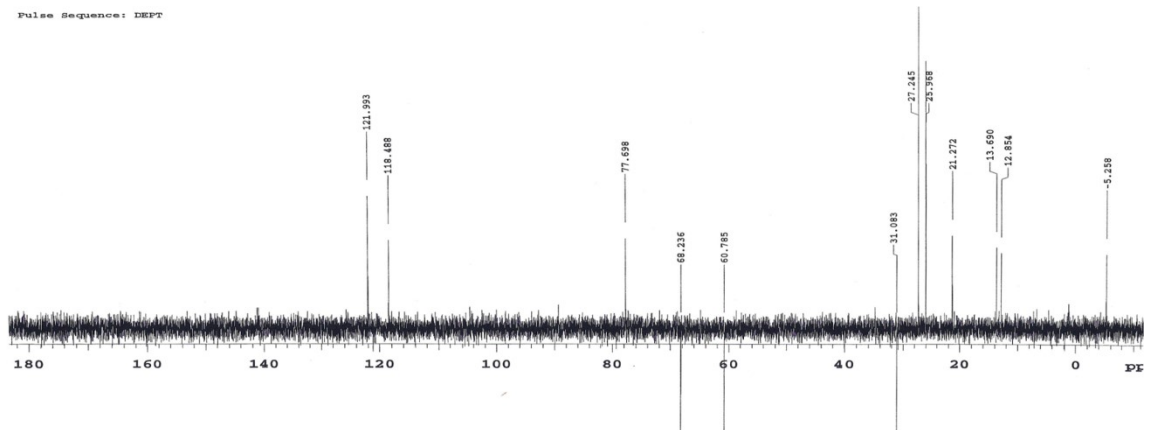
Qua 39

Automation directory: /
File: exp
Sample id: tmpstudy
Pulse Sequence: s2pul

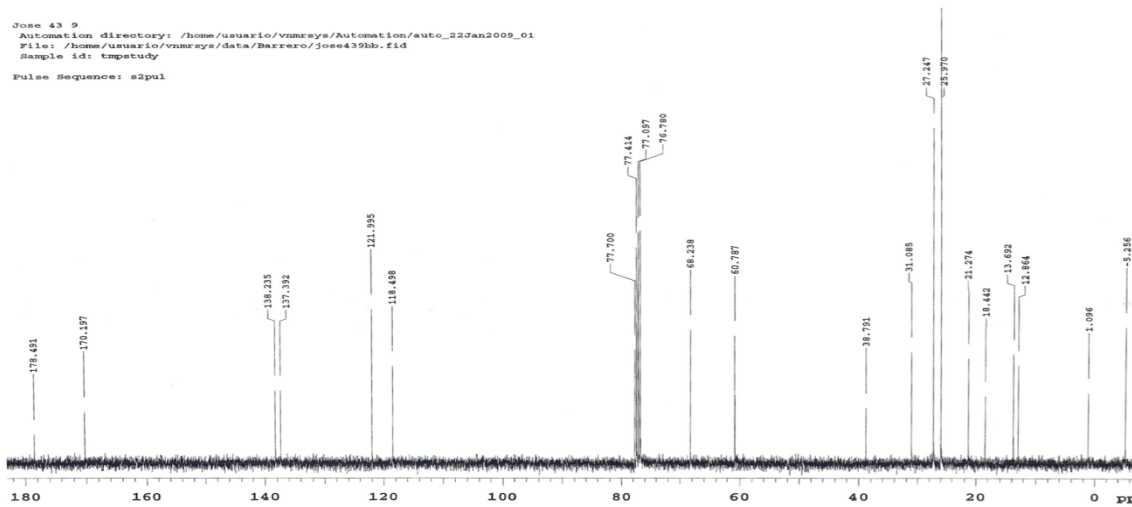
9_01

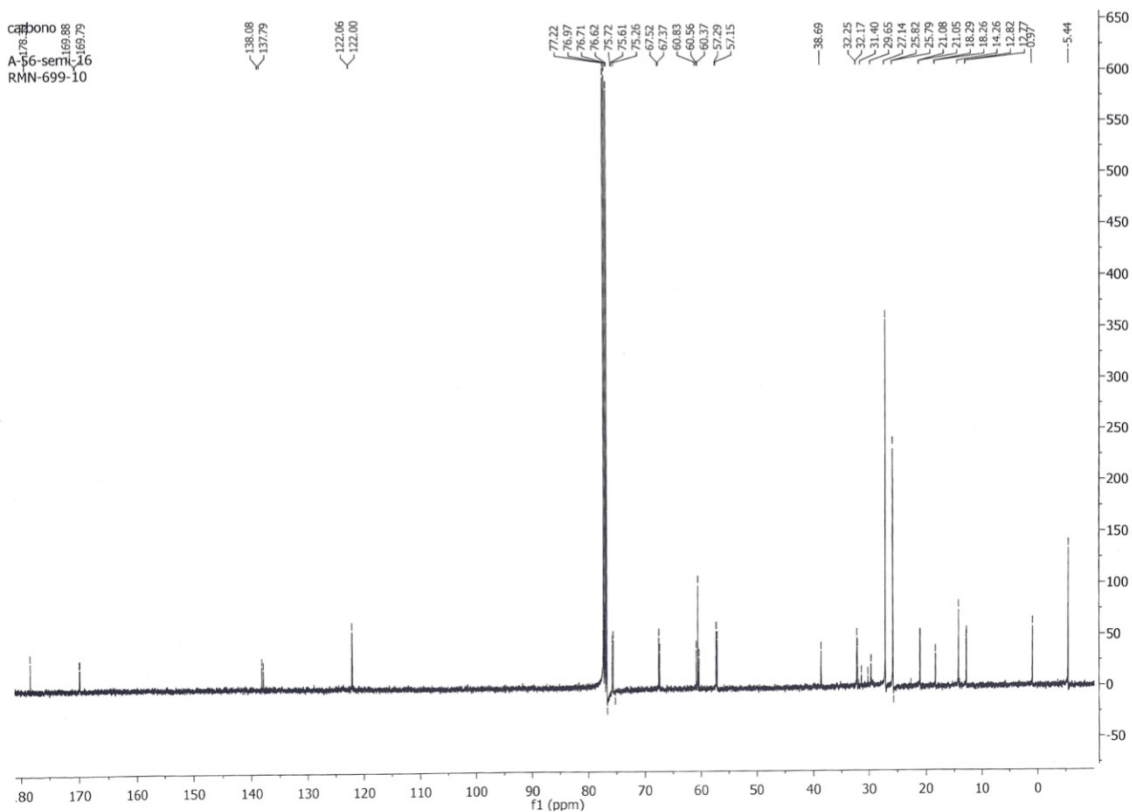
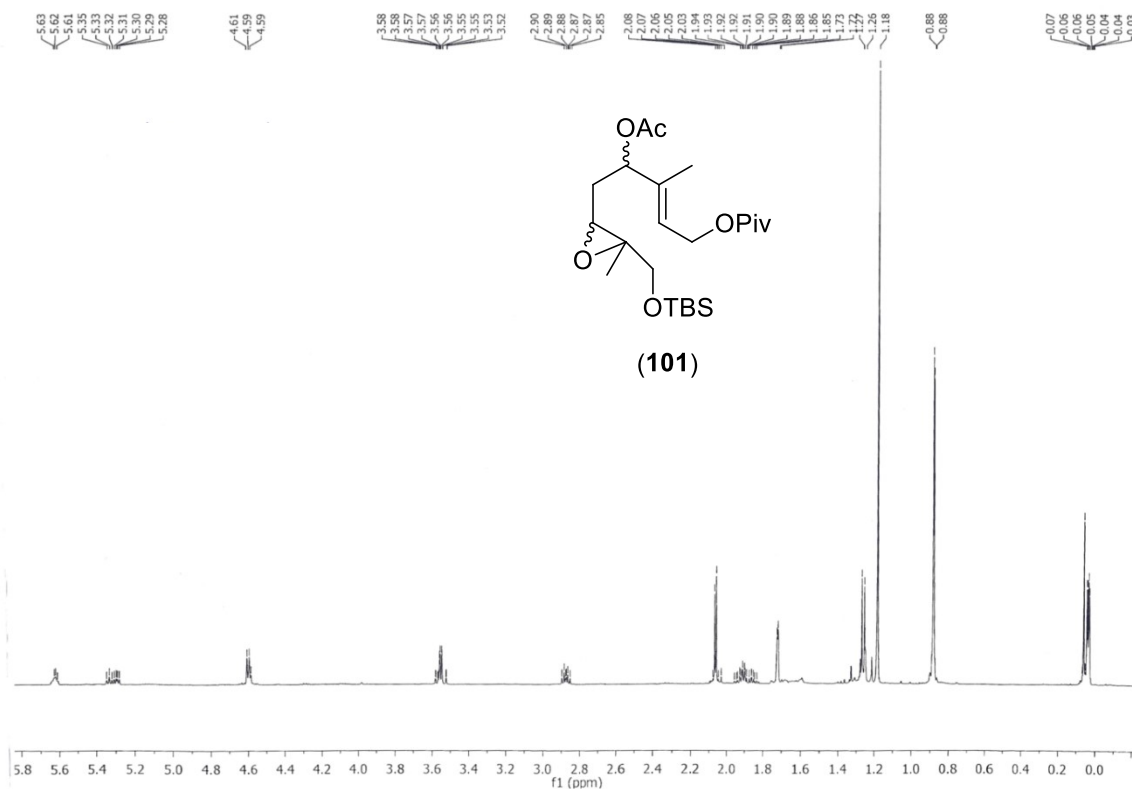


File: /home/usuario/vnmrsvs/data/Barrero/jose439dept.fid
Sample id: tmpstudy
Pulse Sequence: DEPT

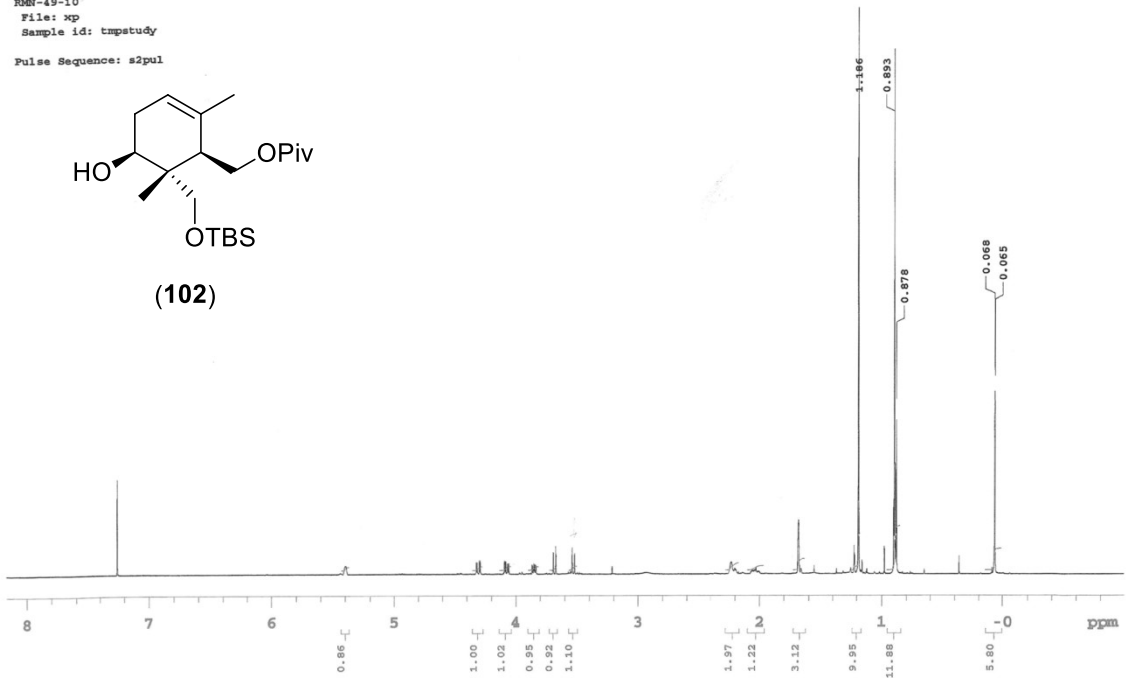
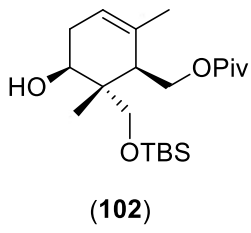


Jose 43 9
Automation directory: /home/usuario/vnmrsvs/automation/auto_22Jan2009_01
File: /home/usuario/vnmrsvs/data/Barrero/jose439bb.fid
Sample id: tmpstudy
Pulse Sequence: s2pul

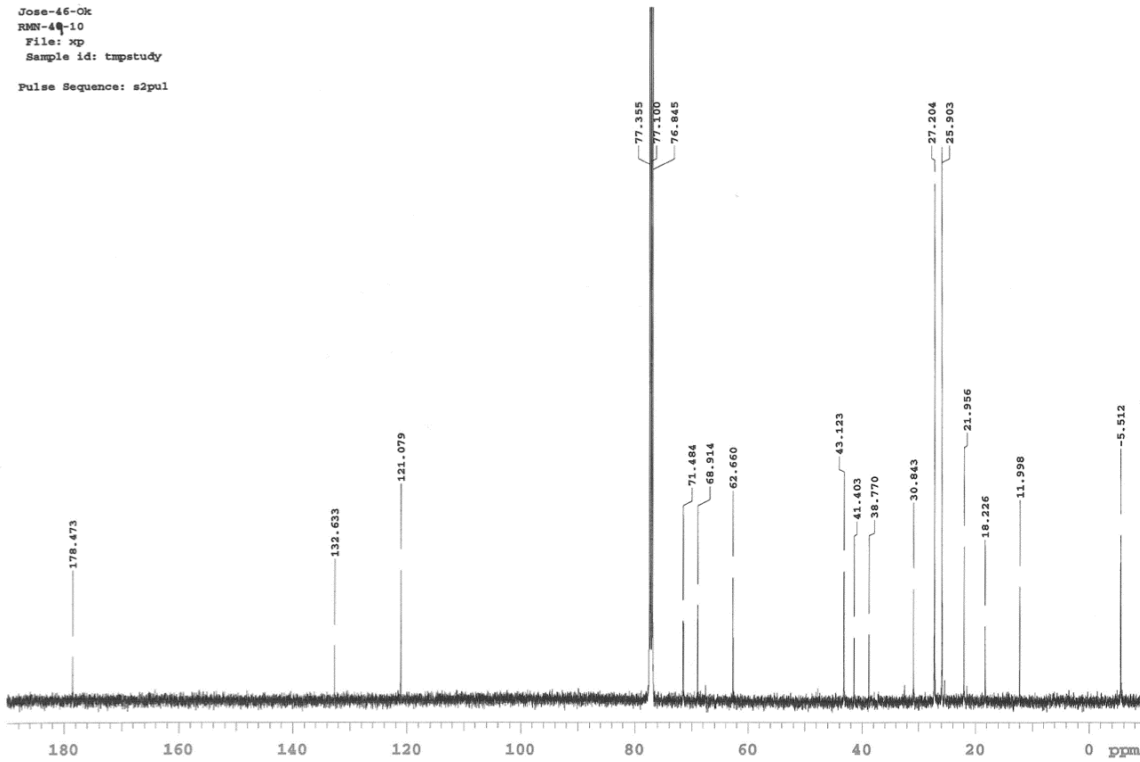




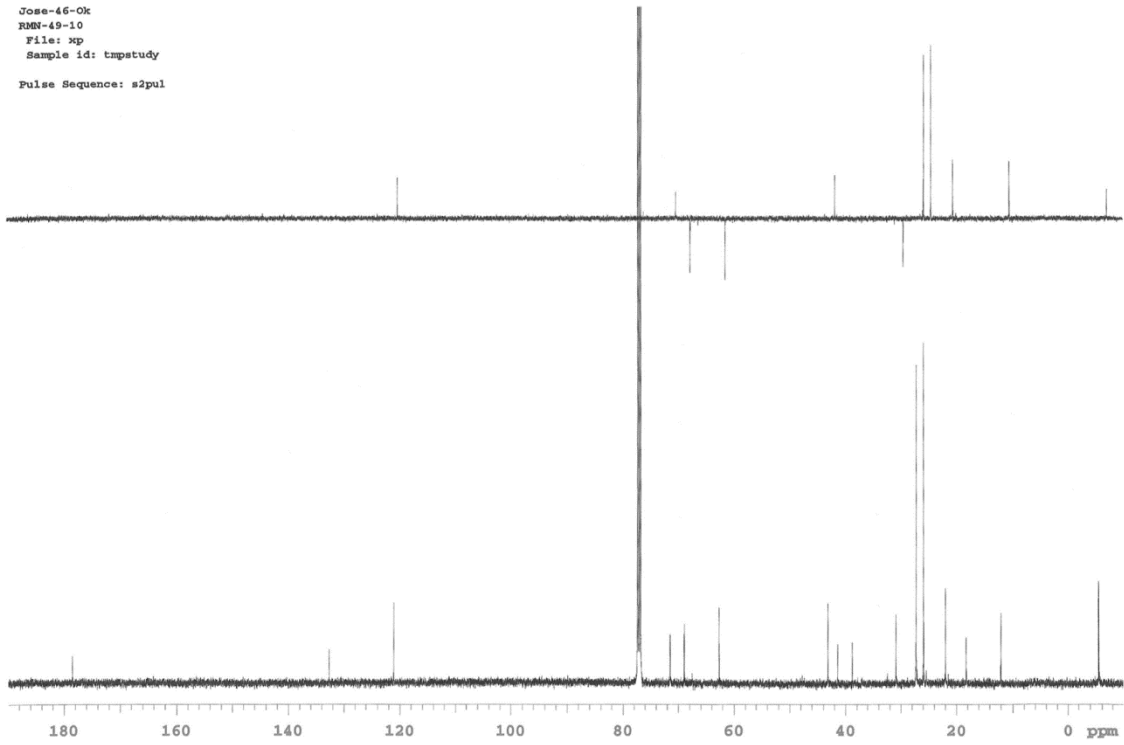
Jose-46-OK
 RMN-49-10
 File: xp
 Sample id: tmpstudy
 Pulse Sequence: s2pul



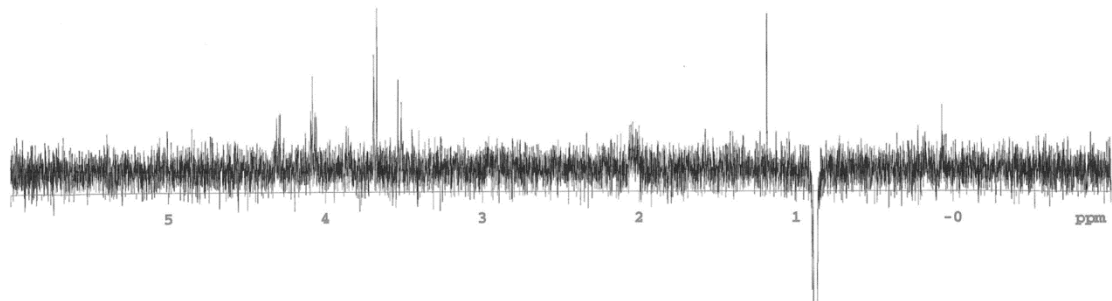
Jose-46-OK
 RMN-49-10
 File: xp
 Sample id: tmpstudy
 Pulse Sequence: s2pul



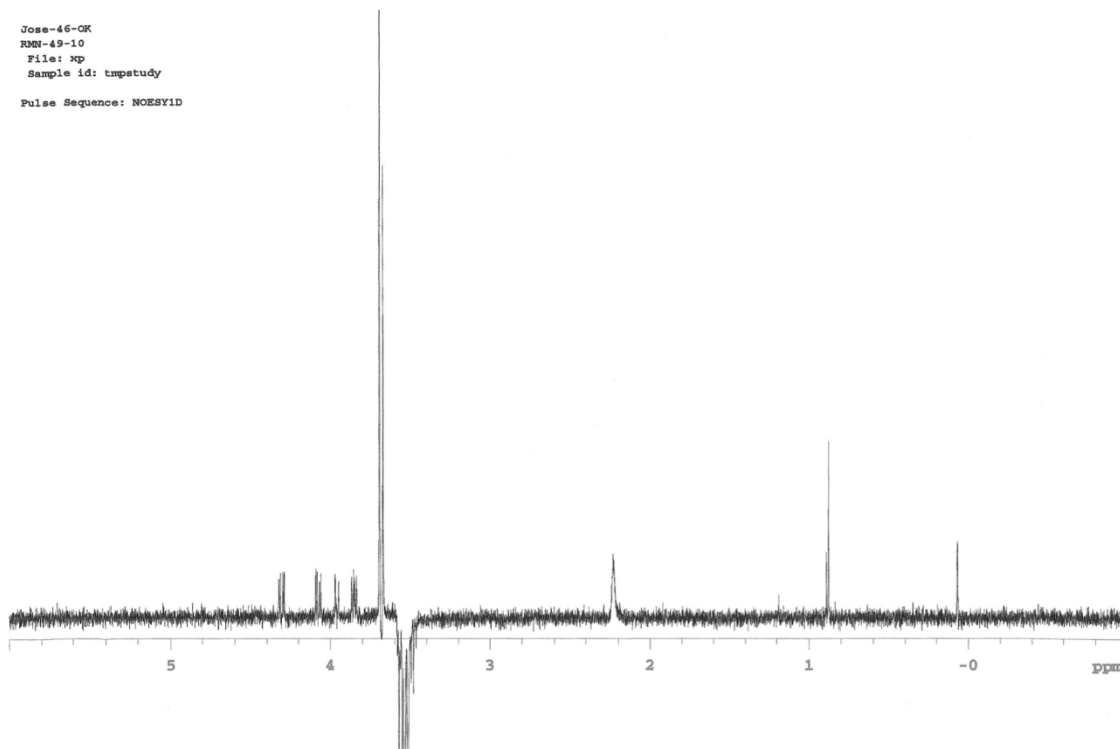
Jose-46-Ok
RMN-49-10
File: xp
Sample id: tmpstudy
Pulse Sequence: s2pul



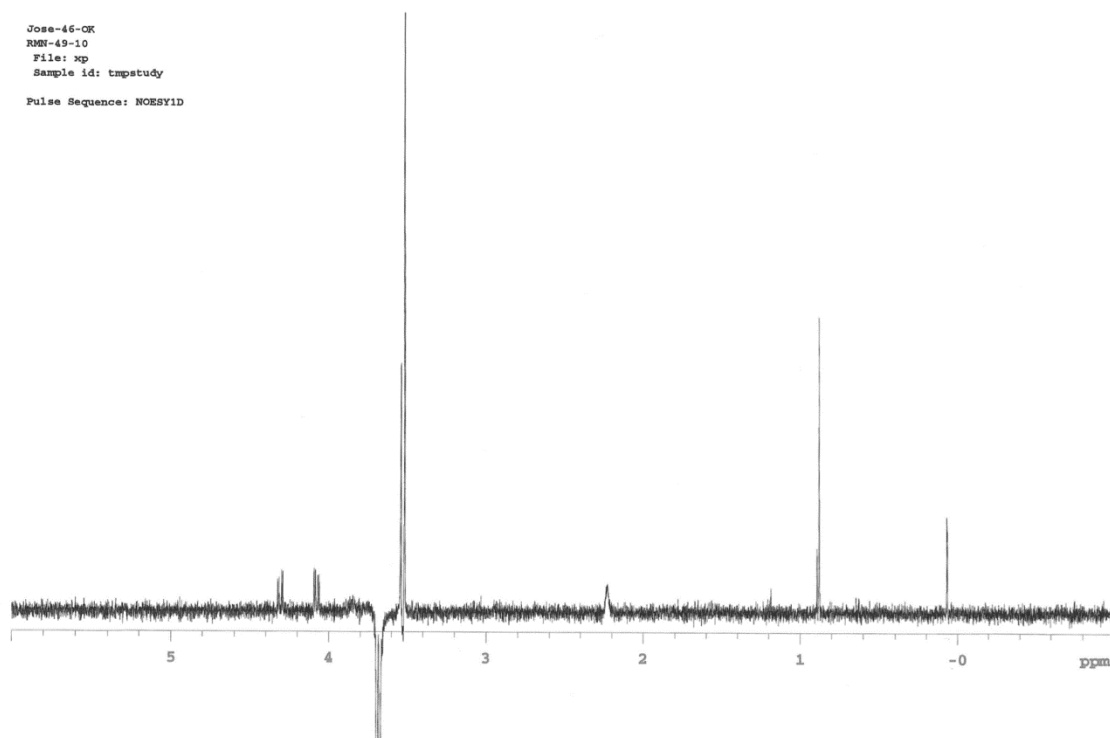
Jose-46-OK
RMN-49-10
File: xp
Sample id: tmpstudy
Pulse Sequence: NOESY1D



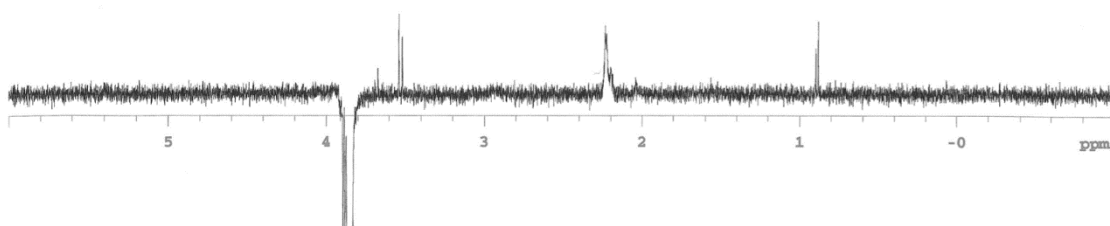
Jose-46-OK
RMN-49-10
File: xp
Sample id: tmpstudy
Pulse Sequence: NOESY1D



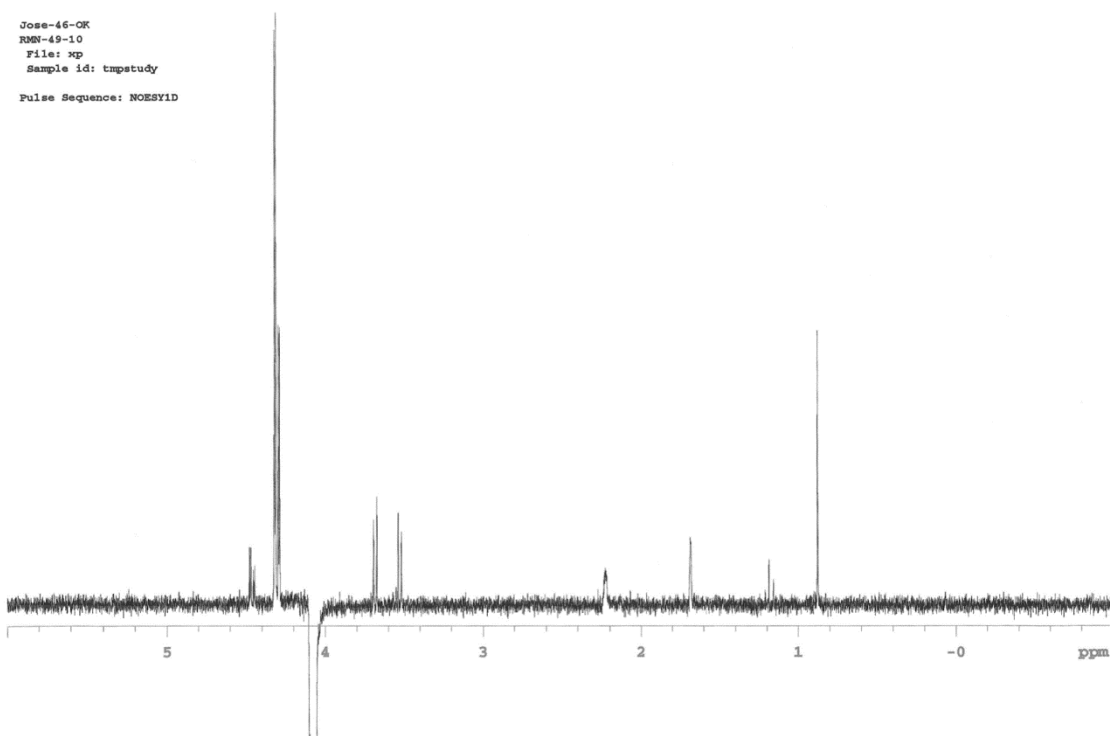
Jose-46-OK
RMN-49-10
File: xp
Sample id: tmpstudy
Pulse Sequence: NOESY1D



Jose-46-OK
RMN-49-10
File: xp
Sample id: tmpstudy
Pulse Sequence: NOESY1D



Jose-46-OK
RMN-49-10
File: xp
Sample id: tmpstudy
Pulse Sequence: NOESY1D



ANEXO 5

Obtención de exudados:

Los exudados han sido obtenidos por el grupo del Prof. Cerdá Olmedo de la Universidad de Sevilla. Estos se obtienen por congelación de los cultivos a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante una noche, descongelación a $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante una hora, presión sobre el agar. Los exudados se filtraron a través de un filtro de nitrocelulosa de $0,45\text{ }\mu\text{m}$ de diámetro de poro (Type HA, Millipore) para eliminar los restos de micelio.

Extracción y fraccionamiento de apocarotenoides:

Los apocarotenoides presentes en los medios de cultivo se extraen mediante un fraccionamiento ácido-base. Para ello, el caldo de cultivo se alcaliniza hasta pH 8 con NaOH 2N y se extrae tres veces con EtOAc. La fase orgánica se seca sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtra y evapora bajo presión reducida obteniéndose un extracto neutro. La fase acuosa se acidifica hasta pH 2 con HCl 2N y se extrae tres veces con EtOAc, se seca sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtra y evapora bajo presión reducida obteniéndose un extracto ácido.

	Cultivo mixto de 2 días:	Cultivo individual de 2 días. Estirpe A56 (+):	Cultivo individual de 2 días. Estirpe NRRL1555 (—):	Cultivo mixto de 5 días no liofilizado:	Cultivo mixto de 5 días liofilizado:
Caldo de cultivo (ml)	250	300	300	125	125
Peso de extracto neutro (mg)	10.0	8.8	8.0	46.0	33.7
Peso de extracto ácido (mg)	14.0	18.3	17.0	33.2	43.9

Liofilización del caldo de cultivo:

Tal y como se obtienen los 125 ml aproximadamente de caldo de cultivo se lleva directamente al Centro de Instrumentación Científica (CIC) de la Universidad de Granada, al Servicio de Biología Fundamental; Unidad de Liofilización, Secuenciación y Síntesis. La muestra se dispone en un liofilizador FLEXI-DRY- μ P resguardada de la luz solar durante 5 días. Después de este tiempo, se obtiene 1.36 gramos de muestra seca que se fracciona según el procedimiento habitual.

Análisis mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC):

Los análisis de los extractos ácidos o neutros se efectuaron en un HPLC (Series 1100, Agilent), usando una columna de fase reversa C18 Spherisorb-ODS2, Waters (4.6 x 250 mm, tamaño de partícula 5 μ m) unida a una pre-columna (Waters) de 12.5 mm rellena con el mismo material. Se inyectan alícuotas de 20 μ L de una disolución metanólica del extracto neutro (15 mg/1 mL) o del extracto ácido (15 mg/1 mL). Las muestras se eluyen a temperatura ambiente con una velocidad de flujo de 1 mL/min de metanol/agua (1:4) durante los primeros 6 minutos y sucesivamente con un gradiente lineal hasta metanol puro a los 25 minutos, con metanol puro hasta los 40 minutos y con un gradiente lineal hasta volver a la mezcla inicial a los 45 minutos. La detección fue realizada con un detector de UV a 328, 300, 280, 230 y 210 nm.

Análisis de apocarotenoides mediante LC-HRMS:

5 μ L de los extractos ácidos o neutros en metanol (15 mg/1 mL) se han analizado mediante LC-HRMS. Los análisis se realizaron en un cromatógrafo de líquidos Agilent (Santa Clara, CA) 1200, usando la columna descrita en el apartado anterior, mantenida a 25 °C y con una velocidad de flujo de 1 mL/min. Los disolventes y sus tiempos de uso son los mismos que el apartado anterior. A los disolventes se les añade 0.01% de ácido trifluoroacético. La adquisición de los espectros de masas fue llevada a cabo en un espectrómetro de masas Bruker maXis HR-QTOF (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Alemania), acoplado al cromatógrafo

previamente descrito en el párrafo anterior. El disolvente de elución fue separado con un separador estático y la ionización del disolvente de elución fue obtenida usando una fuente maxis ESI standard ajustada a un flujo de gas de secado de 11 L/min a 200 °C y un nebulizador de presión de 40 psig. El voltaje de capilaridad se ajustó a 4000 V. Los espectros de masas fueron coleccionados desde 50 a 700 m/z en modo positivo.