

Curso 2004/05
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS/5
I.S.B.N.: 84-7756-626-7

CARLOS JOSÉ BOLUDA CABRERA

**Aislamiento, estudio, actividad biológica
y síntesis de metabolitos de origen vegetal**

Directores

**JUAN MANUEL TRUJILLO CARREÑO
HERMELO LÓPEZ DORTA
JOSÉ ANDRÉS PÉREZ PÉREZ**



SOPORTES AUDIOVISUALES E INFORMÁTICOS
Serie Tesis Doctorales

*A mi familia,
en especial a mis padres, a mi hermano Miguel y a Beatriz*

IN MEMORIAM

Ginés Boluda Güeita

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada bajo la dirección de los doctores D. **Hermelo López Dorta**, D. **José Andrés Pérez Pérez** y D. **Juan Manuel Trujillo Carreño** a quienes deseo expresar mi más sincero agradecimiento y afecto por su inestimable ayuda tanto en los aspectos científico-técnicos como personales y por la gran calidad humana que han demostrado tener durante la realización del presente trabajo.

La Laguna, octubre de 2004

Agradecimientos

Al Profesor Dr. D. Antonio González González, por su cálida acogida en el centro y por el placer de haberle conocido.

A los profesores del Departamento de Química Orgánica que de algún modo me han ayudado en esta empresa, en especial a los doctores D. Ángel Gutiérrez Ravelo, D. Antonio Jiménez, Dña. Lucía San Andrés y Dña. Ana Estévez-Braun.

A la Dra. Dña. Isabel Bazzocchi, a quien estoy muy agradecido por su ayuda en la obtención de los datos de NMR.

Al Dr. D. José Manuel Hernández, quién me enseñó los primeros pasos en el laboratorio de productos naturales.

A la Dra. Dña. Zulma Aragón, por el asesoramiento científico prestado en el campo de la leishmaniasis, por el ánimo recibido y por los agradables momentos compartidos durante estos años.

Al Dr. D. José Piñero del Departamento de Parasitología, por la realización de las pruebas de actividad antileishmania.

A la Dra. Dña. Raquel Gloria Díaz de la Unidad de Investigación del Hospital Dr. Negrín (Gran Canaria), por la realización de las pruebas de actividad citotóxica.

A mis compañeros de Instituto que de un modo u otro han contribuido a la realización de este trabajo, especialmente a Mariana Salmerón, Nayra Quintana, Iván Córdova, Celina García, Patricia Cruz, Elisa Pérez, Sandra Jiménez, Francisco de León y Fernando Torres.

Quiero agradecer de un modo muy especial la colaboración de mi amigo Joaquín González, siempre dispuesto a prestar su ayuda de forma desinteresada y a dar nuevas ideas, implicándose en muchas ocasiones en mi tesis como en la suya propia.

A Dña. Lucía Cruz, por su eficiencia.

Al personal técnico y de seguridad del Instituto.

A D. Juan Antonio Suárez, por su inestimable y desinteresada colaboración en la realización de la espectrometría de masas.

A mis padres y a mi hermano Miguel, por su apoyo incondicional.

A Beatriz, por haber podido contar con su apoyo en todo momento y por su paciencia a la hora de enseñar las herramientas informáticas necesarias a un acérrimo detractor de la materia. Su colaboración en la escritura y corrección de esta tesis ha sido imprescindible.

A Alicia, por el ánimo recibido durante la realización de este trabajo y por su eficacia en la corrección de errores tipográficos.

A mis tíos Nieves Esther Boluda y Miguel Ampuero, por la revisión de los aspectos históricos de la introducción.

A María Amelia Duque y Félix Diez, por la revisión y corrección de los aspectos médicos de esta memoria.

A la Universidad de La Laguna y al MEC, por la financiación recibida durante estos años.

Índice

INTRODUCCIÓN

Introducción a los productos naturales	1
Los lignanos: definición y tipos	14
Los lignanos y la evolución de las plantas	27
El metabolismo de los lignanos.....	42
Funciones fisiológicas en las plantas.....	62
Actividades biológicas de los lignanos	77
Enterolignanos.....	106

OBJETIVOS Y ESPECIES ELEGIDAS	133
--	------------

PARTE TEÓRICA	143
----------------------------	------------

Capítulo I. Aislamiento y caracterización de productos naturales

<i>Bupleurum handiense</i>	145
<i>Justicia hyssopifolia</i>	161

Capítulo II. Síntesis total de la justicidona

Introducción: síntesis de lignanos arilnaftalénicos	179
Aproximaciones y síntesis total de la justicidona.....	197

Capítulo III. Semisíntesis de la justicidona.....

Capítulo IV. Catálisis enzimática en disolventes orgánicos

Introducción.....	289
Acetilación enzimática regioselectiva de secoiridoides.....	317

PARTE EXPERIMENTAL.....	337
--------------------------------	------------

Métodos generales e instrumentación	339
<i>Bupleurum handiense</i>	345
<i>Justicia hyssopifolia</i>	361
Aproximaciones y síntesis total de la justicidona.....	373
Semisíntesis de la justicidona	421
Acetilación enzimática regioselectiva de secoiridoides.....	429

ACTIVIDADES BIOLÓGICAS

Actividad antileishmania.....	439
Actividad citotóxica	451

CONCLUSIONES	459
---------------------------	------------

Índice de productos

	PT	PE
Productos de <i>Bupleurum handiense</i>		
2(Z)-9(Z)-heptadecadien-4,6-diino-1,8-diol.....	150	352
Bursehernina	154	353
Chasnarolido	156	357
Guamarol	155	355
Isoescopoletina.....	157	357
Isokaerofilina.....	148	349
Kaerofilina	149	350
Metilchasnarolido.....	158	358
Saikogenina F	159	360
 Productos de <i>Justicia hysopifolia</i>		
Glucósido D3 (compuesto 14)	168	371
Helioxantina	165	367
Justicidina E.....	164	365
Justicidona	169	372
Savinina.....	166	368
Sesamina	167	369
 Síntesis y semisíntesis de la justicidona		
Compuesto 2	202	375
Compuesto 3b	203	377
Compuesto 3c	210	379
Compuesto 3d	210	379
Compuesto 6	255	412
Compuesto 10a	214	381
Compuesto 10b	214	382
Compuesto 11	216	382
Compuesto 15	221	385
Compuesto 20	225	389
Compuesto 21	226	391
Compuesto 30	231	394
Compuesto 31	231	393
Compuesto 33	231	394

	PT	PE
Compuesto 35	235	396
Compuesto 37	237	397
Compuesto 38	242	399
Compuesto 39	243	400
Compuesto 40a	244	403
Compuesto 40b	244	404
Compuesto 41a	245	406
Compuesto 41b	245	407
Compuesto 42	250	407
Compuesto 43	252	409
Compuesto 44	253	410
Compuesto 45	260	414
Compuesto 46	260	415
Compuesto 47	261	416
Compuesto 48	272	417
Compuesto 49	278	419
Compuesto 50	278	419
Compuesto 51	282	423
Compuesto 52	283	424
Compuesto 53	285	427
Compuesto 54	285	428

Acetilación regioselectiva

10-Acetoxioleósido dimetil éster (4).....	319	431
6'-O-Acetil-10-acetoxioleósido dimetil éster (6)	321	432
2'-O-Acetil-10-acetoxioleósido dimetil éster (7)	321	433
2',6'-O-Diacetil-10-acetoxioleósido dimetil éster (8).....	323	433
3'-O-Acetil-10-acetoxioleósido dimetil éster (10)	329	434
3',6'- O-Diacetil-10-acetoxioleósido dimetil éster (11)	329	435
10-Hidroxioleósido dimetil éster 10,2',3',4',6' pentaacetato (12)...	333	436
10-Hidroxioleósido dimetil éster 2',3',4',6' tetraacetato (13).....	334	437

Abreviaturas y siglas:

AcO:	Grupo acetilo
AcOEt:	Acetato de etilo
AcOH:	Ácido acético
AFP:	α -fetoproteína
AMPc:	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
ASC:	Ácido ascórbico
Asn:	Asparagina
ATP:	Adenosina 5'-trifosfato
AZT:	3'-azido-3'-desoxitimidina
Be:	Benceno
¹³ C-NMR:	Resonancia magnética nuclear de carbono 13.
CAL:	Lipasa de <i>Candida antarctica</i>
CAN:	Nitrato amónico cérico
CI ₅₀ :	Concentración inhibitoria 50 (que inhibe el 50% del crecimiento)
COSY:	Experimento de NMR de correlación bidimensional ¹ H- ¹ H
δ :	Desplazamiento químico
d:	doblete
dd:	doble doblete
DDQ:	2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona
DE ₅₀ :	Dosis eficaz 50 (que produce el 50% del máximo efecto posible)
DMF:	Dimetilformamida
DMSO:	Dimetilsulfóxido
DNA:	Ácido desoxirribonucleico
dt:	doble triplete
Ed.:	Editorial
ee:	Exceso enantiomérico
END:	Enterodiol
ENF:	Enterofurano
ENL:	Enterolactona
Et:	Etilo
et al.:	y otros
EtOH:	Etanol
FAB:	Espectrometría de masas de bombardeo por átomos rápidos
FAD:	Dinucleótido de flavina y adenina
FMN:	Flavina mononucleótido
FRAP:	Ensayo del poder reductor/antioxidante del hierro

GC-MS:	Cromatografía de gases con espectrometría de masas
Glu:	Glucosa
Gly:	Glicina
GPT:	Glutámico pirúvico transaminasa
GTP:	Guanosina 5'-trifosfato
¹ H-NMR:	Resonancia magnética nuclear de protón
HENL:	Hidroxienterolactona
HIV:	Virus de la inmunodeficiencia humana
HMBC:	Experimento de NMR de correlación bidimensional ¹³ C- ¹ H a larga distancia
HMPA:	Hexametilfosfotriamida
HPLC:	Cromatografía líquida de alta resolución
HR-MS:	Espectrometría de masas de alta resolución
HSQC:	Experimento de NMR de correlación bidimensional ¹³ C- ¹ H a un enlace
Inh.:	Inhibición
IR:	Infrarrojo
LDA:	Diisopropilamido de litio
LDL:	Lipoproteínas de baja densidad
[M] ⁺ :	Masa del ión molecular
m:	multiplete
MAT:	Matairesinol
Me:	Metilo
MeO:	Metoxilo
MeOH:	Metanol
MHz:	Megahercio
MS:	Espectrometría de masas
MTT:	Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]2,5-difenil-tetrazolio
<i>n</i> -BuLi:	<i>n</i> -Butil litio
NADP ⁺ :	Dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato, forma oxidada
NADPH:	Dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato, forma reducida
NDGA:	Ácido nordihidroguayarético
NiCRA:	Nikel-containing complex reducing agent
NMR:	Resonancia magnética nuclear
NOE:	Efecto nuclear Overhauser
PAF:	Factor activador de plaquetas
PDG:	Diglucósido del pinoresinol

PPi:	Pirofosfato
PPL:	Lipasa de páncreas porcino
ppm:	Partes por millón
<i>p</i> -TsOH:	Ácido <i>para</i> -toluensulfónico
Py:	Piridina
q:	cuadruplete
Rib:	Ribosa
RNA:	Ácido ribonucleico
ROESY:	Experimento de NMR de correlación bidimensional de efecto nuclear Overhauser
rpm:	Revoluciones por minuto
<i>s. str.</i> :	<i>sensu stricto</i>
s:	singulete
SAM:	S-adenosil metionina
SBP:	Proteína fijadora de esteroides sexuales
SDG:	Diglucósido del secoisolariciresinol
SECO:	Secoisolariciresinol
Ser:	Serina
SHBG:	Globulina fijadora de hormonas sexuales
SNC:	Sistema nervioso central
t:	triplete
THF:	Tetrahidrofurano
TPA:	Acetato de 12- <i>O</i> -tetradecanoilforbol
t _R :	tiempo de retención
uma:	Unidad de masa atómica
UV:	Ultravioleta
Xyl:	Xilosa

Introducción a los productos naturales

Durante milenios, nuestros antepasados emplearon las plantas con fines terapéuticos, transmitiendo de generación en generación sus conocimientos. En muchos casos se atribuyeron propiedades sobrenaturales a las plantas medicinales que suscitaron todo tipo de creencias y supersticiones. El proceso curativo, administrado por un curandero, iba generalmente acompañado de cierto misticismo, danzas rituales, amuletos y rezos que eran condición *sine qua non* para lograr el efecto deseado.

Hay evidencias de que el hombre de Neanderthal, que vivió hace unos 60.000 años en lo que actualmente es Irak, empleó plantas medicinales tales como *Althaea rosea* (Malvaceae), originaria de Siria y que en la actualidad sigue siendo utilizada en etnomedicina¹ dadas sus propiedades emoliente, pectoral y ligeramente astringente.



Althaea rosea

Tanto la farmacia como la medicina china, influenciadas por la filosofía de Confucio, reproducían con exactitud las tradiciones de los mayores sin probar nuevos remedios con el objeto de no perturbar el equilibrio universal (*yin* y *yang*) con nuevos tratamientos. Es más que probable que también influyera negativamente sobre la experimentación el hecho de que, si el enfermo fallecía, el médico podía ser decapitado por falta de conocimientos. Entre los productos naturales de plantas que han trascendido hacia occidente está el opio con el que aliviaban los dolores. Como tratado de plantas medicinales de esta época cabe destacar el Pentsao chino (2700 A. C.) que recoge un elevado número de plantas y drogas medicinales².

Las civilizaciones asiria, babilónica y fenicia en el 2500 A. C. dejaron testimonios escritos de sus conocimientos etnobotánicos en el Código de Hammurabi y las tablillas de arcilla de la famosa biblioteca de Assurbanipal (668 A. C.) que resumen los

¹ Cowan M. M. *Clinical Microbiology Review*, **12** (4), 564-82, (1999)

² Pérez de Paz P.L., Hernández Padrón C.E. "Plantas medicinales o útiles en la Flora Canaria". Ed. Lemus. La Laguna, (1999)

conocimientos de los 3000 años anteriores³. Los asirios, por ejemplo, mencionan en sus tablillas el opio, la mandrágora y la cicuta⁴, entre muchos otros vegetales.

Los egipcios tuvieron un buen conocimiento de las plantas medicinales, como atestiguan los papiros de Kahun (1900 A. C.) y Ebers (1600 A. C.)³, y es muy probable que la palabra griega *pharmakon* (medicamento o veneno) derive de otra egipcia *pharma-kei*, que significa portador de la seguridad². En el 2300 A. C. cultivaban ricino y lino e importaban sándalo o incienso. Cabría destacar de la cultura egipcia la Escuela de Medicina de Alejandría, famosa por combatir el dogmatismo en medicina y orientarla hacia la observación y la experiencia⁴.

También en el Nuevo Mundo se empleaban remedios que, por lo general, no eran muy diferentes de los empleados por civilizaciones paralelas en el Viejo Continente. Los mayas y los aztecas poseían bibliotecas en las que acumulaban valiosos manuscritos que informaban sobre sus experiencias y conocimientos. Desgraciadamente, el fanatismo religioso y la ignorancia de los conquistadores produjeron que todo este conocimiento se perdiera al ser quemadas estas bibliotecas⁴.

Los incas poseían remedios muy eficaces basados en plantas medicinales y, en contraste con el inmovilismo chino, continuamente buscaban nuevas drogas naturales. Del mismo modo, los mayas poseían conocimientos sobre plantas medicinales como se pone de manifiesto en las cartas de Hernán Cortés al emperador Carlos V durante la conquista de México².

Quizás la droga más característica de las nuevas tierras fuese la coca, empleada por los nativos tanto para contener los vómitos y diarreas como por sus propiedades analépticas³. Fernández de Piedrahita nos dice lo siguiente acerca de su uso por los indígenas: "El jugo del *hayo* (coca) es de tanto vigor y sustento para los indios, que con él no sienten hambre ni sed.....". Por otra parte, Cieza de León en la *Crónica del Perú* nos dice: "Preguntando a algunos indios por que causa traen siempre la boca ocupada con aquesta hierba, dicen que sienten poco la hambre y que se hallan en gran vigor y fuerza".

³ Gómez Caamaño J.L. "Páginas de historia de la Farmacia". Ed. Nestlé España S.A., (1995)

⁴ González A. Prólogo en: Valera A. Santos A. "Investigaciones fitoquímicas en plantas canarias". Ed. Centro de estudios Ramón Areces S.A. Madrid, (2002)

En Grecia y Roma la farmacología era casi exclusivamente botánica. Los griegos fueron grandes conocedores de las plantas y sus aplicaciones, aunque las drogas eran prácticamente las mismas que las empleadas en Oriente y Egipto. Entre los siglos V y IV A. C., tanto Sócrates como Platón y su discípulo Aristóteles se ocuparon en mayor o menor profundidad del estudio de los vegetales. Teofrasto, discípulo de Aristóteles (370-287 A. C.) y considerado como padre de la botánica, hizo la primera clasificación de las plantas y la más racional hasta Linneo³. Por otra parte, es importante resaltar que la medicina griega proclamó su independencia de la filosofía⁴.

Para Roma la medicina, al igual que otras ciencias y artes, fue un producto de importación griega. De hecho, los esclavos griegos con conocimientos médicos eran muy disputados entre los romanos³. Fue Galeno (siglo II D.C.) quien recopiló todo el saber médico de la antigüedad y fue a partir de su obra como se produjo la transmisión de la información durante la Edad Media en Europa. Pese a que Galeno defendió el tratamiento de cualquier enfermedad sin dogmatismos, su doctrina, de forma paradójica, se convirtió en un dogma para los médicos europeos, por lo que la medicina en Europa avanzó muy poco durante la Edad Media⁴. Para el pensamiento cristiano el único objetivo de esta vida era la preparación para la otra, por lo que la curiosidad intelectual sobre asuntos mundanos no tenía sentido en este planteamiento en el que sólo la fe era importante. Por tanto, el estancamiento del conocimiento científico durante la Edad Media fue consecuencia, al menos en parte, de la postura, en el mejor de los casos inmovilista, de la iglesia⁵. Una excepción fueron los monjes benedictinos que promocionaron los herbolarios, el cultivo de plantas medicinales y la transcripción de manuscritos sobre drogas².



En la Edad Media fueron los árabes quienes continuaron los estudios científicos, pero la contribución de éstos no se extendió a Europa hasta que se realizó una traducción sistemática del árabe al latín, lo cual ocurrió fundamentalmente en Toledo en el siglo XII^{3,6}.

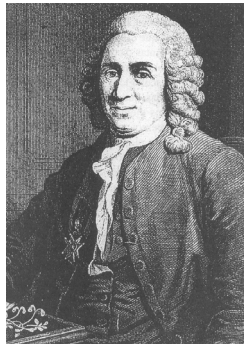
Recolección de la salvia según Abulcasis, cirujano destacado en al-Andalus y que prestó interés a la dietética médica³. Sus contribuciones a la ética y práctica clínica fueron importantes.

⁵ Hull L.W.H. "Historia y Filosofía de la Ciencia". Ed. Ariel S.A., Barcelona, (1989)

⁶ Burckhardt T. "La Civilización hispano-árabe". Cap. 10 y 12. Alianza Editorial, (1992)

La Botánica se consolida como ciencia en el Renacimiento. Así, Linneo (1707-1778) perfeccionó y consolidó el sistema binomial de nomenclatura, propuesto anteriormente por Cesalpino (1519-1603) y vigente en la actualidad.

En cuanto al estudio y aplicación de las plantas medicinales destacó Paracelso (1493-1541) que introdujo el término “principio activo”. Para este alquimista suizo en cada planta existía una clave morfológica externa que nos desvelaría sus virtudes y los males a los que podía ser aplicada².



Linneo (1707-1778)



Paracelso (1493-1541)

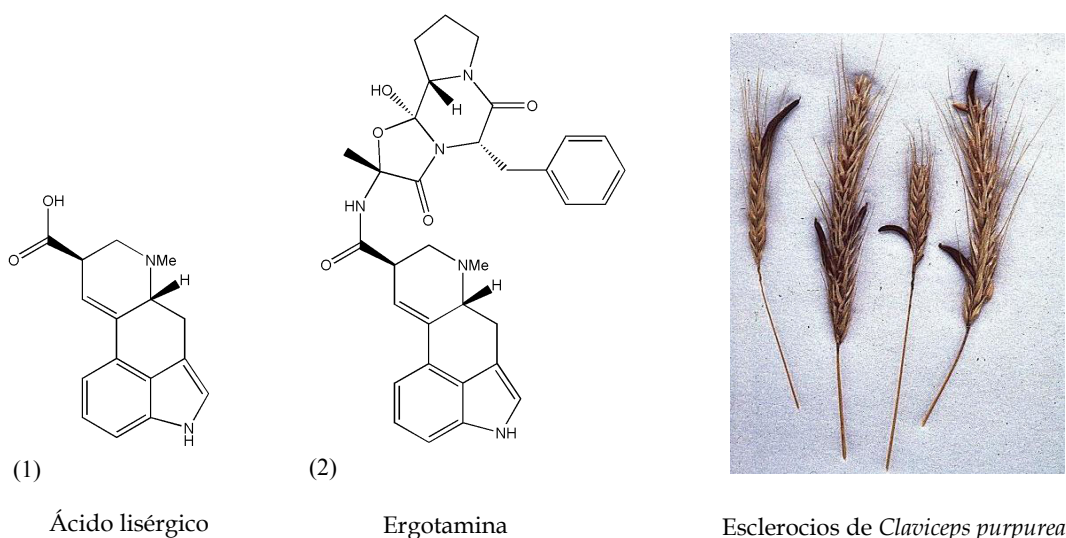
A medida que el conocimiento de las drogas fue aumentando, se hizo necesaria la especialización de disciplinas, de modo que, en el siglo XIX, la medicina se dividió en farmacología, dedicada al estudio de la acción de las drogas y farmacognosia, del griego *pharmakon* (droga) y *gnosis* (conocimiento), dedicada a todos los aspectos de las drogas naturales de plantas, animales o microorganismos, con menor énfasis en la acción⁷.

También el siglo XIX, los químicos comenzaron a sintetizar un amplio número de compuestos orgánicos con estructuras cada vez más complejas, algunos de los cuales fueron agentes terapéuticos útiles. Debido a su origen sintético, hasta mediados del siglo XX se consideró que estos compuestos no eran objeto de la farmacognosia sino de otra disciplina, la química médica. Muchos investigadores formados principalmente en el campo de la química siguieron trabajando con plantas y dieron lugar a la química de los productos naturales⁷. No obstante la fitoquímica estuvo inmersa en un largo letargo como consecuencia del gran avance de la química orgánica sintética hasta los años cincuenta, en que pasó a ser una línea de investigación preferente como consecuencia

⁷ Robbers J.E., Speedie M.K., Tyler V.E. “Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology”. Ed. Williams & Wilkins, (1996)

del avance tecnológico que tuvo lugar tras la Segunda Guerra Mundial y que proporcionó equipos de trabajo más sofisticados⁴.

En la actualidad, los productos naturales juegan un papel muy importante en la medicina moderna. En primer lugar proporcionan muchas sustancias que son muy útiles y difíciles, si no imposibles, de obtener de modo rentable por vía sintética. Un ejemplo que ilustra perfectamente esta circunstancia es el Cornezuelo del Centeno (*Claviceps purpurea*), un hongo que infecta a ésta y otras gramíneas, reemplazando el grano por esclerocios, cuerpos duros de color negro-violáceo con forma de espolón de gallo. Los alcaloides de dichos esclerocios, todos ellos derivados del ácido lisérgico (1), como ergotamina (2), ergosina, ergocristina, ergocriptina, ergocornina y ergobasina, provocan abortos y gangrena en patas y cola al ser ingeridos por el ganado.



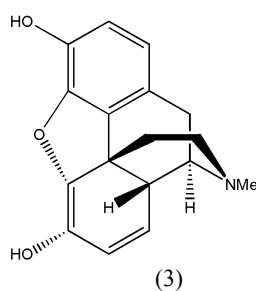
No obstante, los alcaloides del cornezuelo del centeno tienen un gran interés debido a sus propiedades vasoconstrictoras y si bien ya no se recurre a ellos para provocar el parto, se emplean para prevenir hemorragias *post-partum*. Aunque *Claviceps purpurea* crece en el laboratorio, aún no se ha conseguido inducir la formación de esclerocios y dado que su síntesis no resulta rentable, las compañías farmacéuticas se ven obligadas a comprarlo a los agricultores que en algunas zonas inoculan voluntariamente los campos de centeno y trigo con conidios del hongo para aumentar la producción del cornezuelo⁸.

Los aproximadamente treinta alcaloides del opio, obtenido del látex de *Papaver somniferum*, son todos útiles en medicina. Se dividen en dos grupos: los alcaloides con estructura fenantrénica como es el caso de la morfina (3) que es el analgésico más efectivo que se conoce¹⁰ y aquellos que tienen un núcleo isoquinoleínico como es el caso de la papaverina (4)⁹.

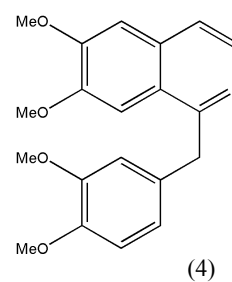
También las solanáceas son fuente de importantes alcaloides. Varias de estas plantas forman un grupo toxicológico conocido como solanáceas midriáticas, debido a la presencia de algunos alcaloides tropánicos con propiedades similares: la escopolamina (5) y la hiosciamina (6).



Papaver somniferum



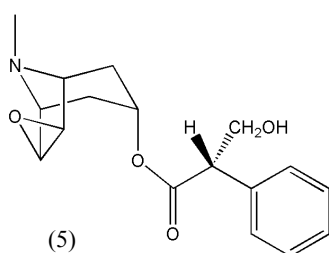
Morfina



Papaverina

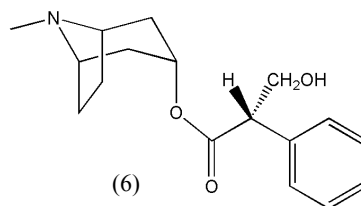
Esquema 2a. Dos alcaloides de *Papaver somniferum*

¹⁰ Mamani Tincusi B. Tesis Doctoral. Universidad de La Laguna. (1999)



(5)

Escopolamina



(6)

(-)-Hiosciamina

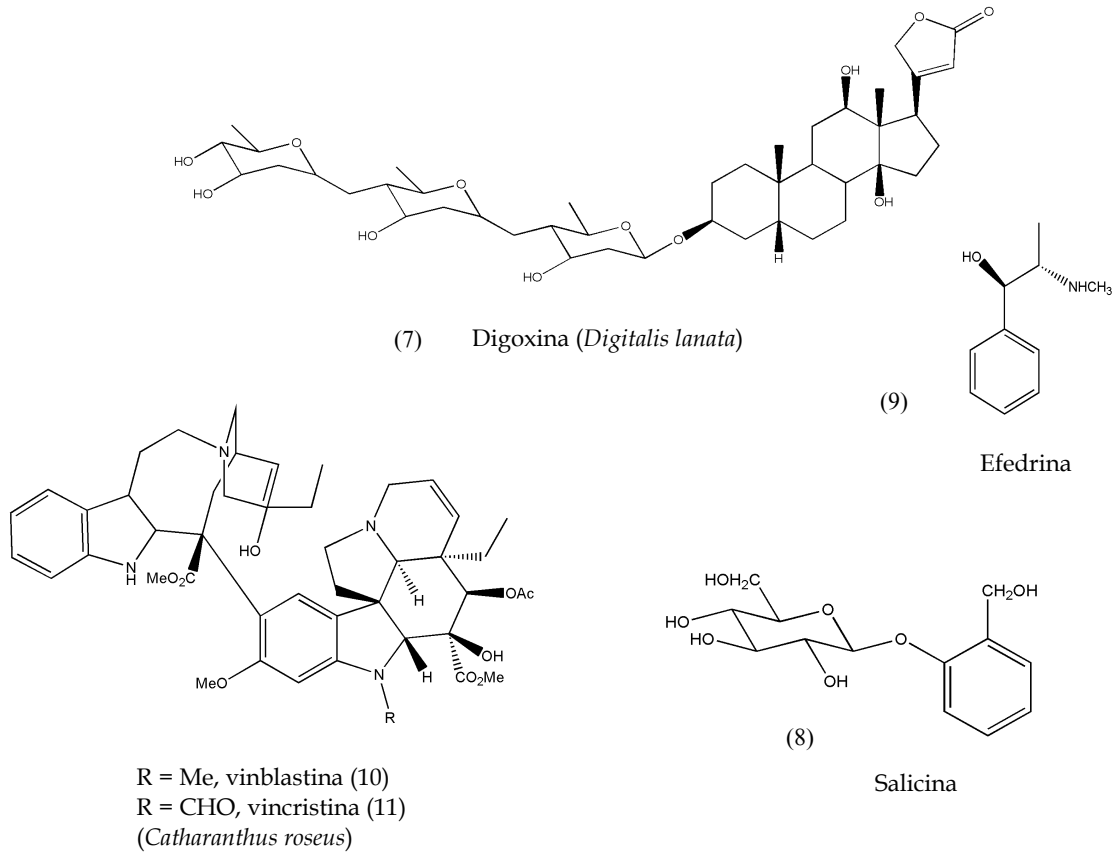
*Atropa belladonna**Hyoscyamus niger***Esquema 2b.** Dos alcaloides tropánicos de interés y sus fuentes

La actividad midriática de la atropina, nombre dado a la mezcla racémica de la hiosciamina, es aprovechada en oftalmología para facilitar los exámenes oculares y las operaciones en el ojo. También se usa como antiespasmódico para el intestino. Por otra parte, la escopolamina se emplea en cirugía como anestésico y como antiemético.

La digoxina (7), (Esq. 3) de *Digitalis lanata* es el glucósido cardiotónico más ampliamente utilizado en medicina para solucionar problemas cardiacos por su efecto inotrópico positivo. Algunos otros ejemplos son el guayacol, expectorante aislado por primera vez de *Guaiacum officinale* (Zygophyllaceae), la fisostigmina de *Physostigma venenosum* (Fabaceae) con actividad anticolinesterasa¹⁰, el antimalárico quinina aislado de *Cinchona* spp. (Rubiaceae) o la salicina (8) de especies del género *Salix* (Salicaceae) que confiere a la corteza del sauce sus propiedades analgésicas y antipiréticas¹¹. La efedrina (9) extraída de varias especies de *Ephedra* (Ephedraceae) es una amina con efectos similares a los de la adrenalina que se emplea como broncodilatador para aliviar el asma y dada su actividad vasoconstrictora en las mucosas, también se emplea como descongestionante nasal¹¹.

¹¹ Dewick P.M. "Medicinal Natural Products: A biosynthetic approach". Ed. John Wiley & Sons Ltd. (1997)

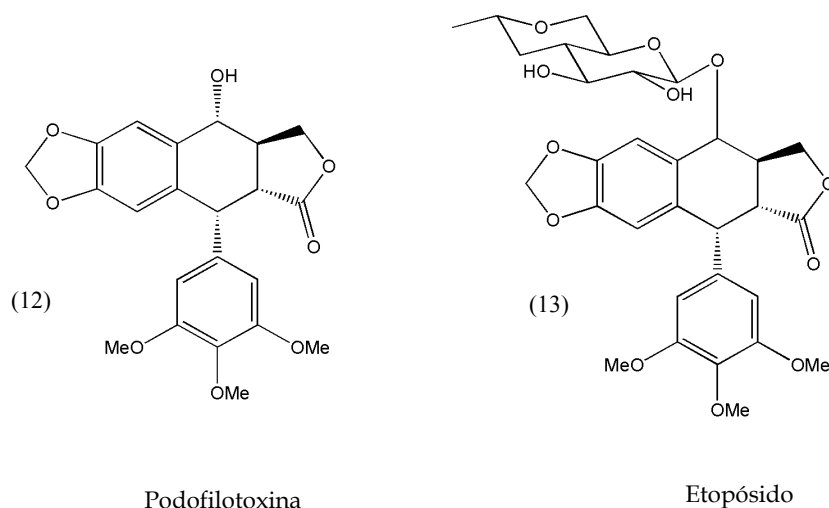
Los alcaloides vinblastina (10) y vincristina (11), aislados de *Catharanthus roseus* (Apocynaceae), son importantes anticancerígenos¹¹.



Esquema 3. Algunos fármacos importantes aislados de plantas

Los productos naturales también proporcionan compuestos que pueden ser modificados con el objeto de obtener otros más efectivos, menos tóxicos o con otras actividades. Tal es el caso del etopósido (13), (Esq. 4) obtenido por semisíntesis a partir de la podofilotoxina (12). Ésta última es un ciclolignano aislado de diferentes especies de *Podophyllum*, que se ha usado desde tiempos remotos con fines medicinales por sus propiedades catártica y antihelmíntica. También se ha empleado como antivírico y en el tratamiento de la *psoriasis vulgaris* y de la artritis reumatoide. No obstante, fue su actividad antitumoral, confirmada en la década de los 40, la que motivó que los lignanos y en especial los ciclolignanos se convirtieran en objeto de numerosas

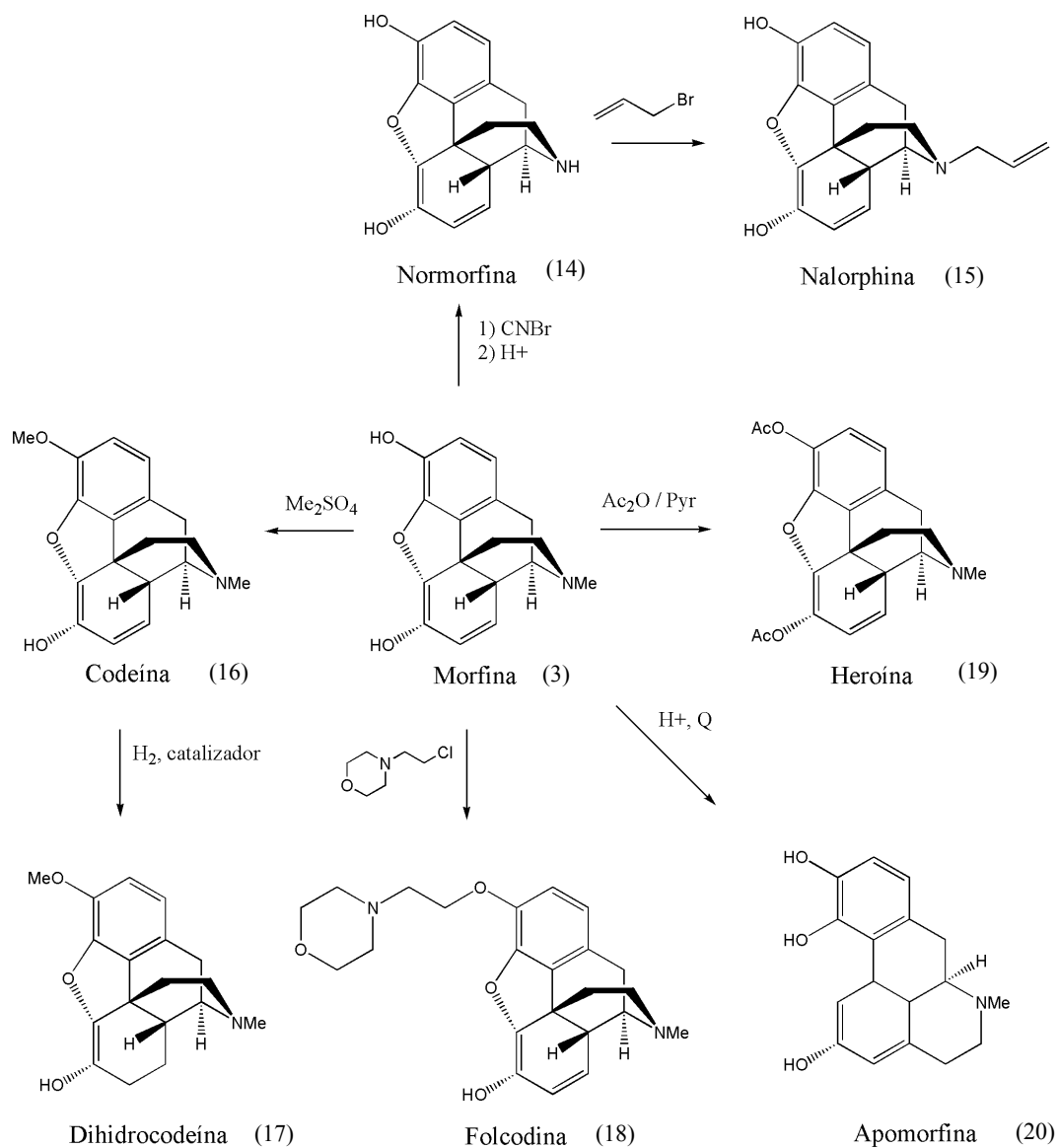
investigaciones.¹² Sin embargo, la podofilotoxina y otros lignanos de *Podophyllum* spp. no son anticancerígenos adecuados para uso clínico debido a su toxicidad¹¹. En cambio, sus derivados semisintéticos, etopósido y tenipósido, son excelentes agentes antitumorales. Estos lignanos inhiben a la DNA topoisomerasa II, esencial en la replicación del DNA.



Esquema 4. Podofilotoxina y etopósido

Otros ejemplos de lo anterior son los numerosos derivados de la morfina (3) (Esq. 5). Muchos de ellos tienen propiedades narcóticas y analgésicas similares, pero son menos adictivos. Otros poseen propiedades diferentes como es el caso de la codeína (16), un antitusígeno sin propiedades analgésicas. Más del 90% de la morfina extraída del opio es procesada para obtener derivados semisintéticos¹¹.

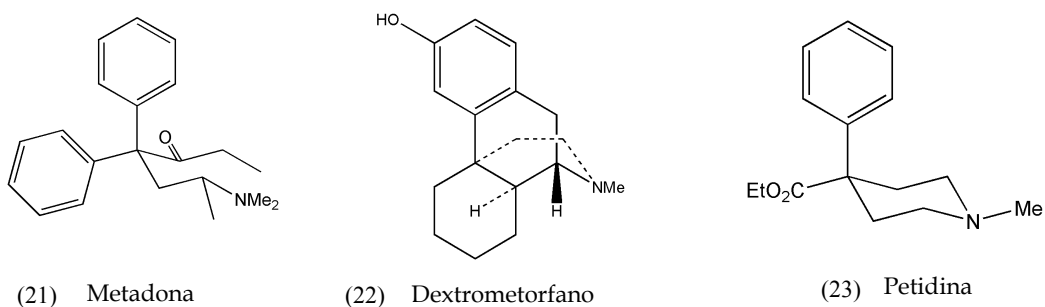
¹² Gómez-Zurita Frau M^a.A. Tesis doctoral. Universidad de Salamanca. (2002)



Esquema 5. Derivados semisintéticos de la morfina

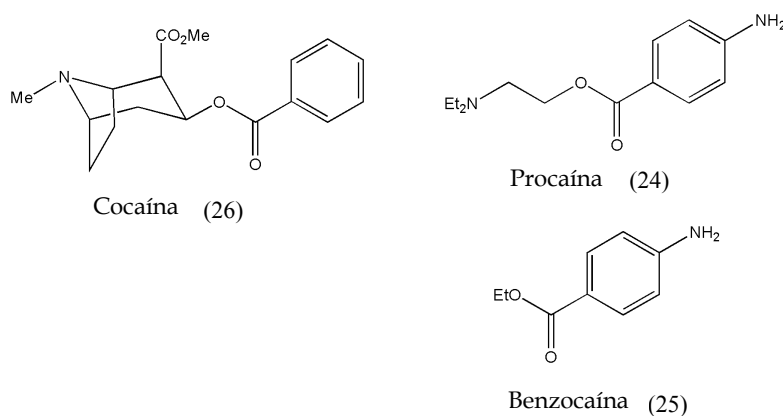
Un tercer papel de los productos naturales es el de servir como modelos para obtener drogas sintéticas con actividades fisiológicas similares a las naturales. Así, la metadona (21) (Esq. 6) es un análogo de la morfina (3) con actividad similar a ésta pero menos euforizante y con efectos menos duraderos. Aunque es potencialmente adictiva como la morfina, su síndrome de abstinencia es mucho menos severo que el de otras drogas como la heroína y por ello se emplea en la rehabilitación de heroinómanos.

El dextrometorfano (22) (Esq. 6) es un antitusígeno sintético no adictivo y sin actividad analgésica basado en la morfina. La petidina (meperidina) (23) es uno de los opiáceos sintéticos más ampliamente utilizados. Es un analgésico menos potente que la morfina que, pudiendo ser adictivo, posee no obstante un efecto analgésico de corta duración e inmediato y además es menos astringente que la morfina.



Esquema 6. Análogos sintéticos de la morfina

La procaína (24) (Esq. 7) y la benzocaína (25) son dos anestésicos locales sintéticos y análogos de la cocaína (26), obtenida de *Erythroxylon coca*.

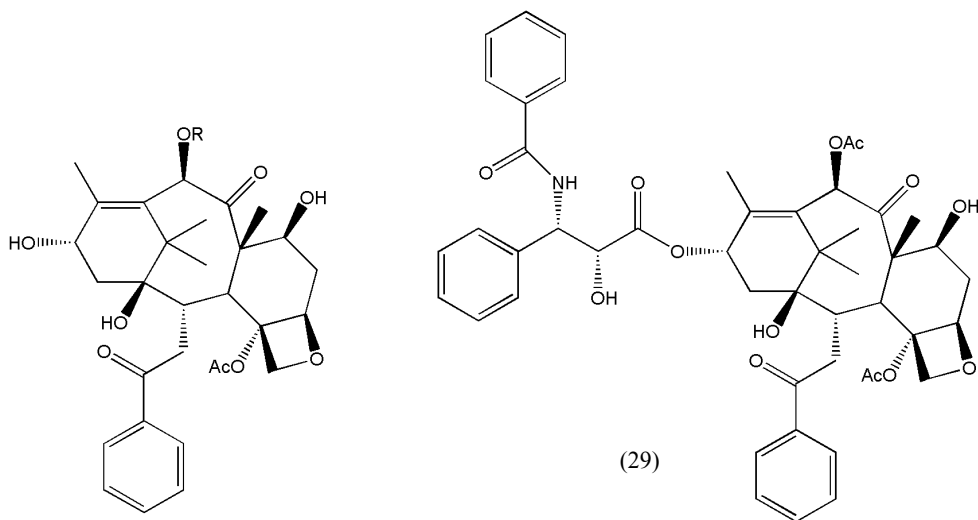


Esquema 7. Análogos sintéticos de la cocaína

En cuarto lugar, algunos productos naturales son inactivos o poseen muy baja actividad, pero pueden ser modificados mediante métodos químicos o biológicos para producir sustancias potentes que no son fáciles de obtener por otros métodos. Este es el caso de la baccatina III (27) y la 10-desacetilbaccatina III (28) (Esq. 8) aisladas del tejo común (*Taxus baccata*) y que pueden ser transformadas en taxol (paclitaxel) (29), un

potente anticancerígeno aislado de la corteza del tejo del Pacífico (*Taxus brevifolia*). Este árbol crece lentamente en bosques de Canadá y EEUU y aunque no es raro, no forma poblaciones densas, a lo que tendríamos que añadir la necesidad de conseguir plantas suficientemente desarrolladas. Se requieren aproximadamente 3 árboles de unos 100 años para lograr 1 g de taxol y a lo largo de un tratamiento pueden necesitarse 2 g.

El contenido en baccatina III y 10-desacetilbaccatina III de *Taxus baccata* es generalmente mucho más elevado que el contenido en taxol de *Taxus brevifolia*. Además, el tejo común, ornamental y ampliamente distribuido por Europa y EEUU, crece mucho más deprisa que el tejo del Pacífico¹¹.



Esquema 8. Diterpenos de *Taxus* spp.

En la actualidad, los productos naturales tienen un papel muy importante en el descubrimiento de nuevas fármacos. Esto es particularmente evidente en las áreas del cáncer y de las enfermedades infecciosas ya que el 60-75% de estos medicamentos son productos naturales, derivados o análogos de los mismos.

Para Newman et al.¹³, la mejor solución para hacer frente a la crisis de productividad actual de la comunidad científica, comprometida con el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos, es una aproximación multidisciplinaria que implique la generación de una nueva diversidad de estructuras procedentes de fuentes naturales, combinado con la síntesis orgánica total y combinatorial y con la biotecnología (manipulación de rutas biosintéticas).

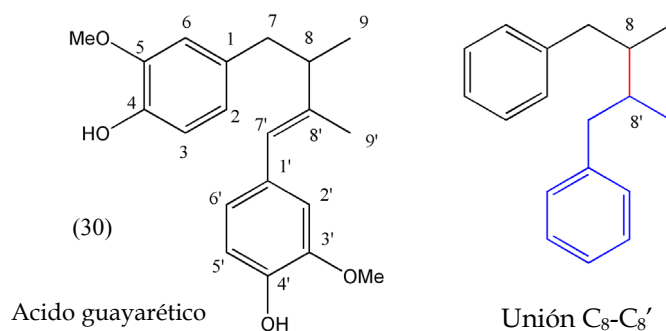
Pero la alarmante pérdida de biodiversidad y, en el caso que nos compete, de especies vegetales, puede ser un impedimento importante para el descubrimiento de nuevos fármacos. En la actualidad, se conocen unas 270.000 especies de plantas terrestres de las cuales sólo un pequeño porcentaje ha sido estudiado a fondo⁴. La destrucción sistemática de los bosques, las catástrofes ecológicas producidas por vertido de hidrocarburos, la lluvia ácida, el efecto invernadero, la urbanización de zonas ricas en endemismos, consecuencia muchas veces de políticas medioambientales erróneas cuando no nefastas, de una legislación demasiado permisiva o simplemente por necesidad en países subdesarrollados, ha dado lugar a la destrucción del medioambiente tanto a nivel local como global.

Todo esto, directa o indirectamente, pone o puede poner en serio peligro a especies que no han sido estudiadas. Sin tener en cuenta el interés puramente botánico que puedan tener estas especies y a tenor de lo explicado, resulta evidente la necesidad de hacer compatible la actividad humana con la conservación de la biodiversidad.

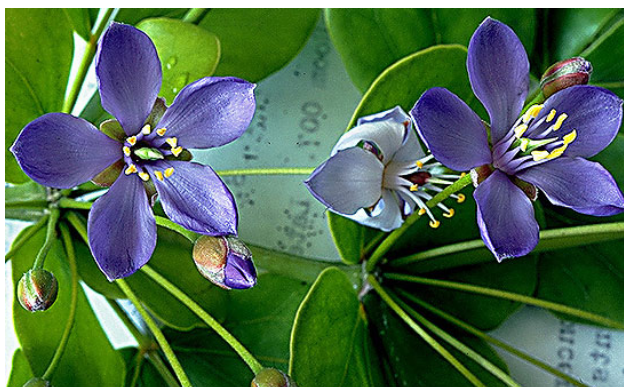
¹³ Newman D.J., Cragg G. M., Snader K. M. *J. Nat. Prod.*, **66** (7), 1022-37, (2003)

Los Lignanos: definición y tipos

Hacia finales del siglo XIX se aislaron varias sustancias fenólicas de diferentes especies vegetales, una de las cuales fue el ácido guayarético (30) (Esq. 9), de *Guaiacum officinale*, cuya estructura fue resuelta por Schroeter et al.¹⁴. Entonces se estableció que éste y otros compuestos relacionados debían representar una única clase de dímeros de unidades de fenilpropano, siendo Haworth¹⁵ quien en 1937 introdujo el término “lignane” (luego acortado a “lignan”). Los lignanos son un grupo de productos naturales, diversos desde el punto de vista estructural, ampliamente distribuidos en el reino vegetal y cuyas unidades estructurales son biosintetizadas por la ruta del ácido sikímico. Estos compuestos son por definición y en sentido estricto dímeros de unidades de fenilpropano (C₆-C₃) enlazadas por el átomo central de su cadena lateral (unión C₈-C_{8'})¹⁶ tal como se muestra en el Esquema 9.



Esquema 9



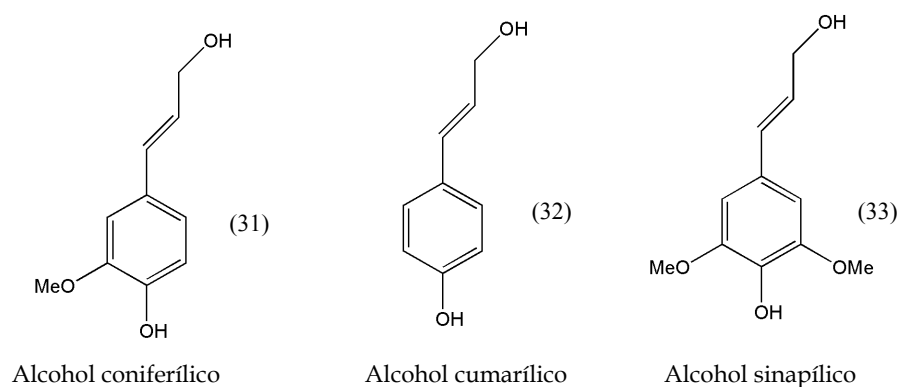
Guaiacum officinale (Zygophyllaceae)

¹⁴ Schroeter G, Lichtenstadt L, Irineu D. *Chem. Ber.*, **51**, 1587-613, (1918)

¹⁵ Haworth R.D. *Annu. Rept. Prog. Chem.*, **33**, 266, (1937)

¹⁶ MacRae W.D., Towers H.N. *Phytochemistry*, **23** (6), 1207-20, (1984)

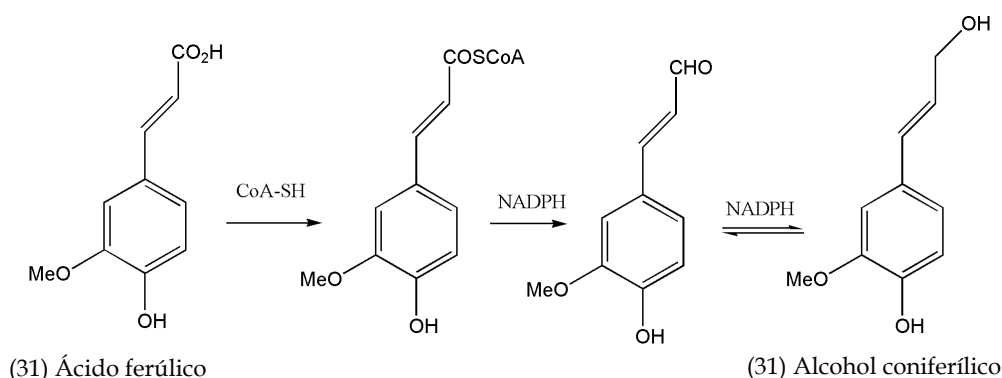
Los lignanos están muy relacionados con el componente de naturaleza no polisacárida más abundante de la pared celular de los vegetales¹⁷, la lignina. Ésta se forma mediante el acoplamiento oxidativo de los alcoholes coniferílico (31), cumarílico (32) y sinapílico (33) (Esq. 10), que da lugar a dímeros a los que conocemos como lignanos y neolignanos. Estos dímeros forman posteriormente oligómeros mayores, para dar luego lignina.



Esquema 10. Monolignoles

En las gimnospermas, el alcohol principal implicado en la polimerización es el coniferílico; en angiospermas dicotiledóneas interviene tanto el coniferílico como el sinapílico mientras que en monocotiledóneas intervienen los tres alcoholes¹¹. Estos alcoholes, a los que se suele hacer referencia como monolignoles, provienen respectivamente de la reducción enzimática de los ácidos cinámicos: ferúlico, *p*-cumárico y sinápico. Primero dichos ácidos forman un éster con CoA-SH, luego una segunda reducción reversible con NADPH conduce al alcohol. En el Esquema 11 se muestra la biosíntesis del alcohol coniferílico a partir del ácido ferúlico (34). La formación de un éster con el CoA-SH facilita la primera reducción al introducir un mejor grupo saliente para la reacción dependiente de NADPH.

¹⁷ Barceló J., Nicolás G., Sabater B., Sánchez R. "Fisiología vegetal". Ed. Pirámide, S. A., Madrid, (1992)



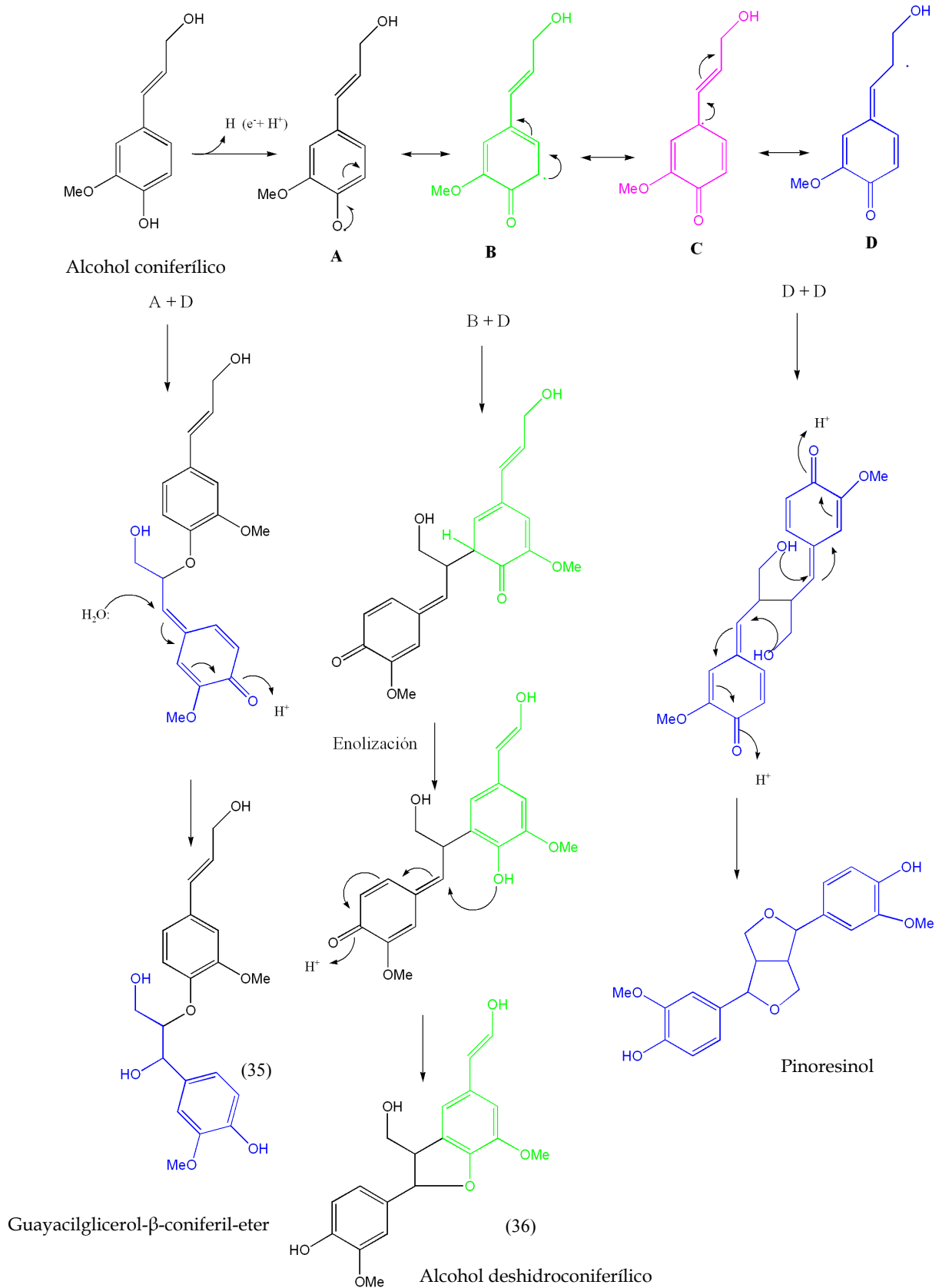
Esquema 11. Reducción del ácido ferúlico

A partir del alcohol y por abstracción de un hidrógeno se forma un radical alcóxilo, quedando el electrón desapareado deslocalizado en la estructura (Esq. 12).

En ausencia de un mecanismo que controle el acoplamiento, la unión de dos de cualquiera de las estructuras resonantes, da lugar a diferentes dímeros. Como se verá más adelante, dicho acoplamiento no es aleatorio ya que tanto la regioquímica como la estereoquímica están controladas enzimáticamente, lo cual explica el hecho de que los lignanos suelen aislarse en formas enantioméricamente puras.

Los dímeros resultantes de este acoplamiento reciben en su conjunto el nombre de lignanos, aunque es conveniente restringir el significado del término a aquellos dímeros que tengan una unión entre los carbonos centrales de sus cadenas laterales (unión C₈-C₈').

Los compuestos que resultan de otro tipo de unión deben ser catalogados como neolignanos. En el Esquema 12 se muestra la formación de varios de estos dímeros a partir del alcohol coniferílico.



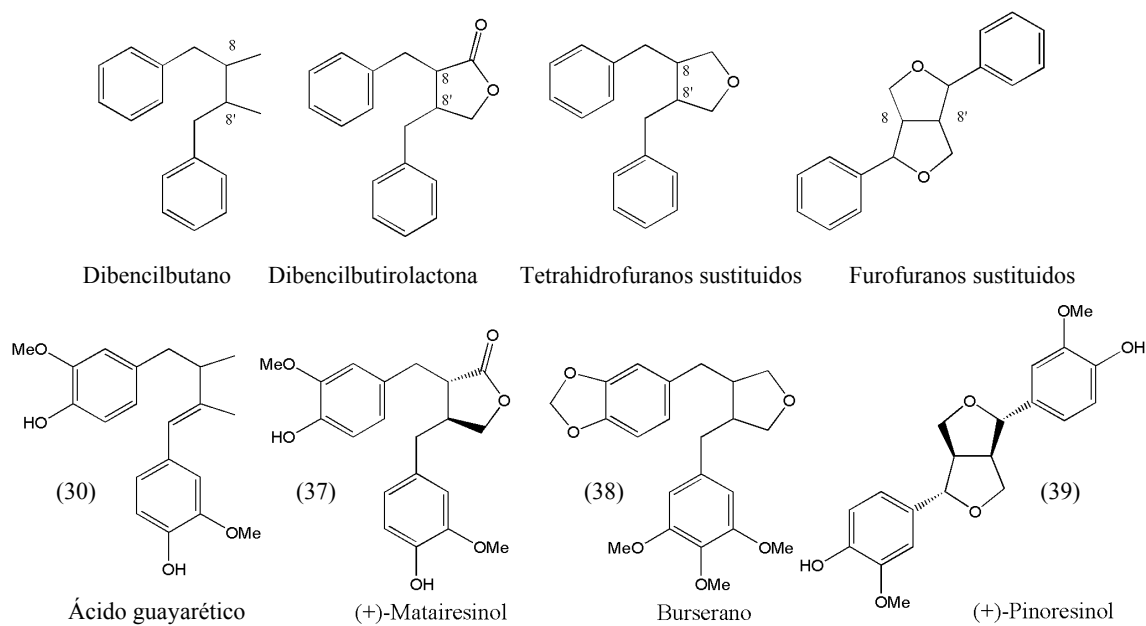
Esquema 12. Acoplamiento aleatorio de radicales del alcohol coniferílico.
Dewick P.M.¹¹

Los lignanos (unión C₈-C_{8'}) se pueden subdividir en lignanos simples y ciclolignanos.

Lignanos simples

Se denominan lignanos simples a aquellos que sólo presentan la unión carbono-carbono a través de las posiciones 8 y 8' de sus cadenas laterales. En función de si el oxígeno es o no incorporado a la cadena lateral y del modo en que lo hace, se pueden establecer 4 subtipos:

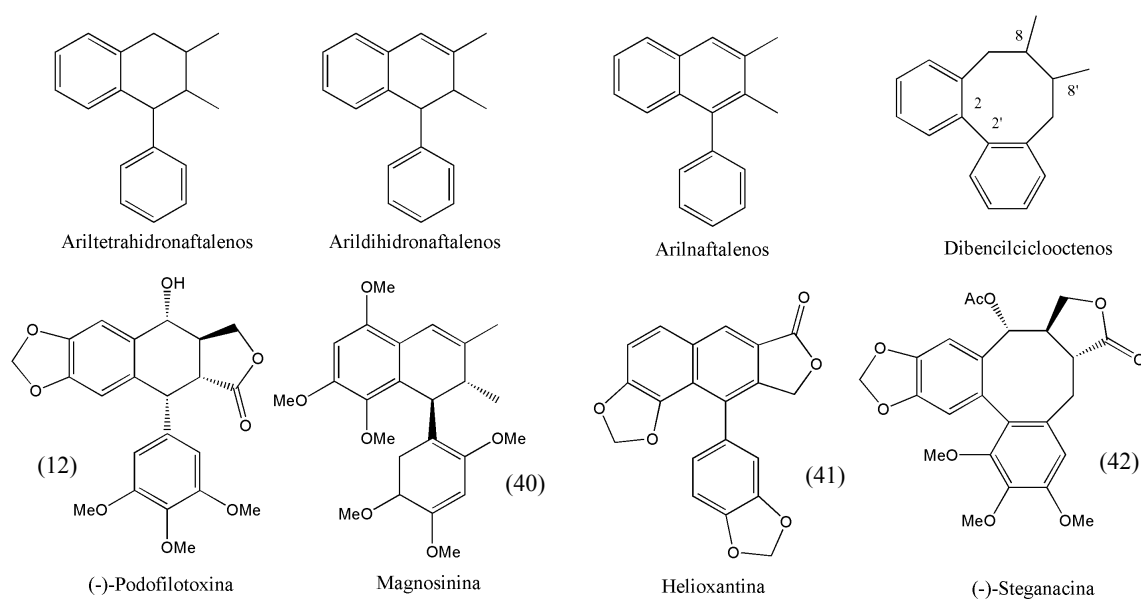
Derivados del dibencilbutano, de la dibencilbutirolactona (lignanólidos), del tetrahydrofurano (epoxilignanos) y del furofurano (bisepoxilignanos).



Esquema 13. Tipos de lignanos simples y ejemplos

Ciclolignanos

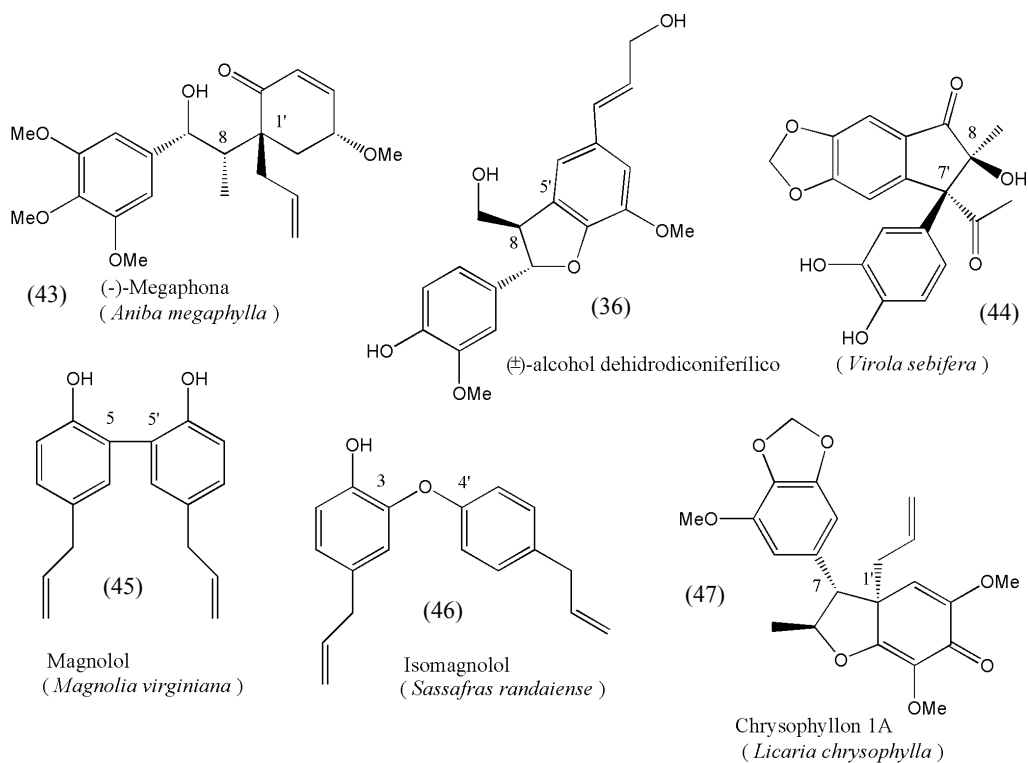
Los ciclolignanos son un amplio grupo de compuestos que resultan de la formación de otro enlace adicional carbono-carbono, lo que da lugar a un nuevo anillo. Aparecen así los subtipos: ariltetrahidronaftalenos, arildihidronaftalenos, arilnaftalenos y dibencilciclooctadienos.



Esquema 14. Ciclolignanos y ejemplos

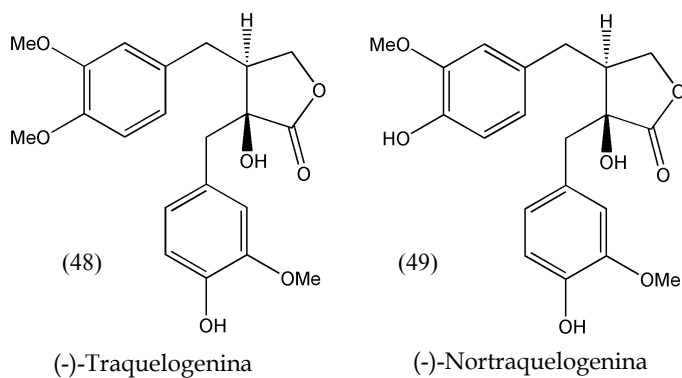
Neolignanos

Aunque los compuestos con la unión C_8-C_8' son los más extendidos en la naturaleza, son posibles otros tipos de unión originándose así los llamados neolignanos. En el Esquema 15 se muestran varios ejemplos de neolignanos, indicándose en cada caso el tipo de unión.



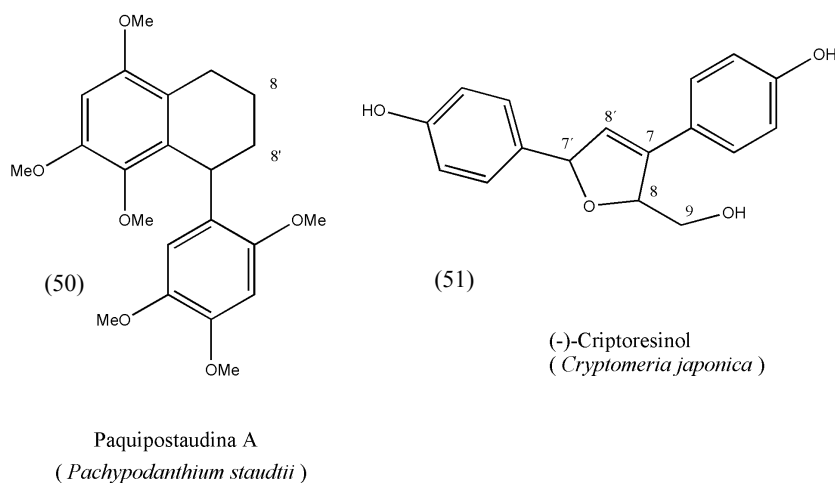
Esquema 15. Ejemplos de neolignanos

El término norlignano se emplea para denominar a aquellos compuestos que son similares a los lignanos pero carecen de los carbonos de las posiciones C₉ y/o C_{9'}¹⁸. En el Esquema 17 se muestran dos ejemplos de norlignanos. También se emplea este término para indicar la falta del grupo metilo en un metoxilo aromático, como por ejemplo en el caso de traquelogenina (48) *versus* nortraquelogenina (49) (Esq. 16). Aunque no siempre que se da esta circunstancia se usa este prefijo, como en el caso de la α-peltatina (191) y β-peltatina (192) (Esq. 57, página 73) que también se diferencian en un metilo.



Esquema 16. Traquelogenina vs. Nortraquelogenina

¹⁸ Whiting D.A. *Nat. Prod. Rep.*, **4** (5), 499-525, (1987)



Esquema 17. Ejemplo de norlignanos

Lignanos y neolignanos mixtos

Existen compuestos mixtos que resultan del acoplamiento de monolignoles o, en algunos casos, lignanos o neolignanos, con otras sustancias como los flavonoides¹⁹, cumarinas, xantonas, etc. Así se forman los denominados flavonolignanos, cumarolignanos, estilbenolignanos, xantonolignanos, etc. Estos compuestos reciben el nombre de lignanos o neolignanos mixtos.

La sinaiticina (52), (Esq. 18) es un flavonolignano aislado de las hojas de *Verbascum sinaiticum* (Scrophulariaceae)²⁰ que parece ser el resultado del acoplamiento regioselectivo de la luteolina (53) con alcohol *p*-cumarílico (32). Dado que el compuesto es ópticamente activo y su único centro quiral proviene de la unión del monolignol a la luteolina, debe haber una enzima específica que controle el acoplamiento¹⁹.

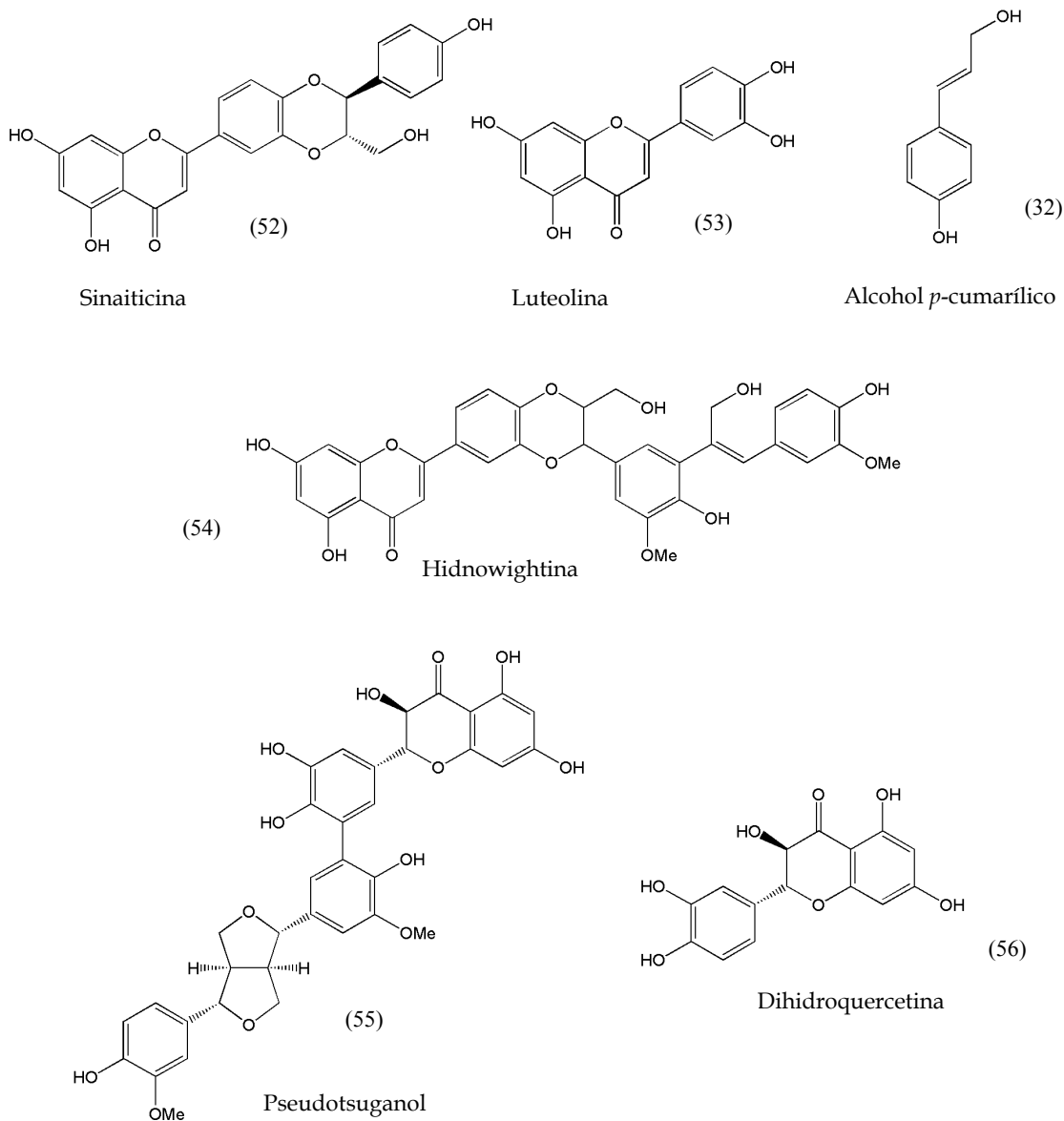
La hidnowightina (54), aislada de las semillas de *Hydnocarpus wightiana* (Flacourtiaceae)²¹, está estructuralmente relacionada con la sinaiticina y también es ópticamente activa.

¹⁹ Lewis N.G., Davin L.B. Lignans: Biosynthesis and function in: "Comprehensive Natural Products Chemistry". Vol 1. pp. 639-712, Ed. Pergamon, (1999)

²⁰ Afifi M.S.A., Ahmed M.M., Pezzuto J.M., Kinghorn A.D. *Phytochemistry*, **34** (3), 839-41, (1993)

²¹ Sharma D.K., Ranganathan K.R., Parthasarathy M.R., Bhushan B., Seshadri T.R. *Planta Medica*, **37** (1), 79-89, (1979)

Existen flavonolignanos más complejos, como es el caso del pseudotsuganol (55) aislado de la corteza más externa de *Pseudotsuga menziesii* (Pinaceae) en forma ópticamente activa y que resulta de la unión del pinoresinol con un resto de dihidroquercetina (56), también presente en esta especie^{22,23}.

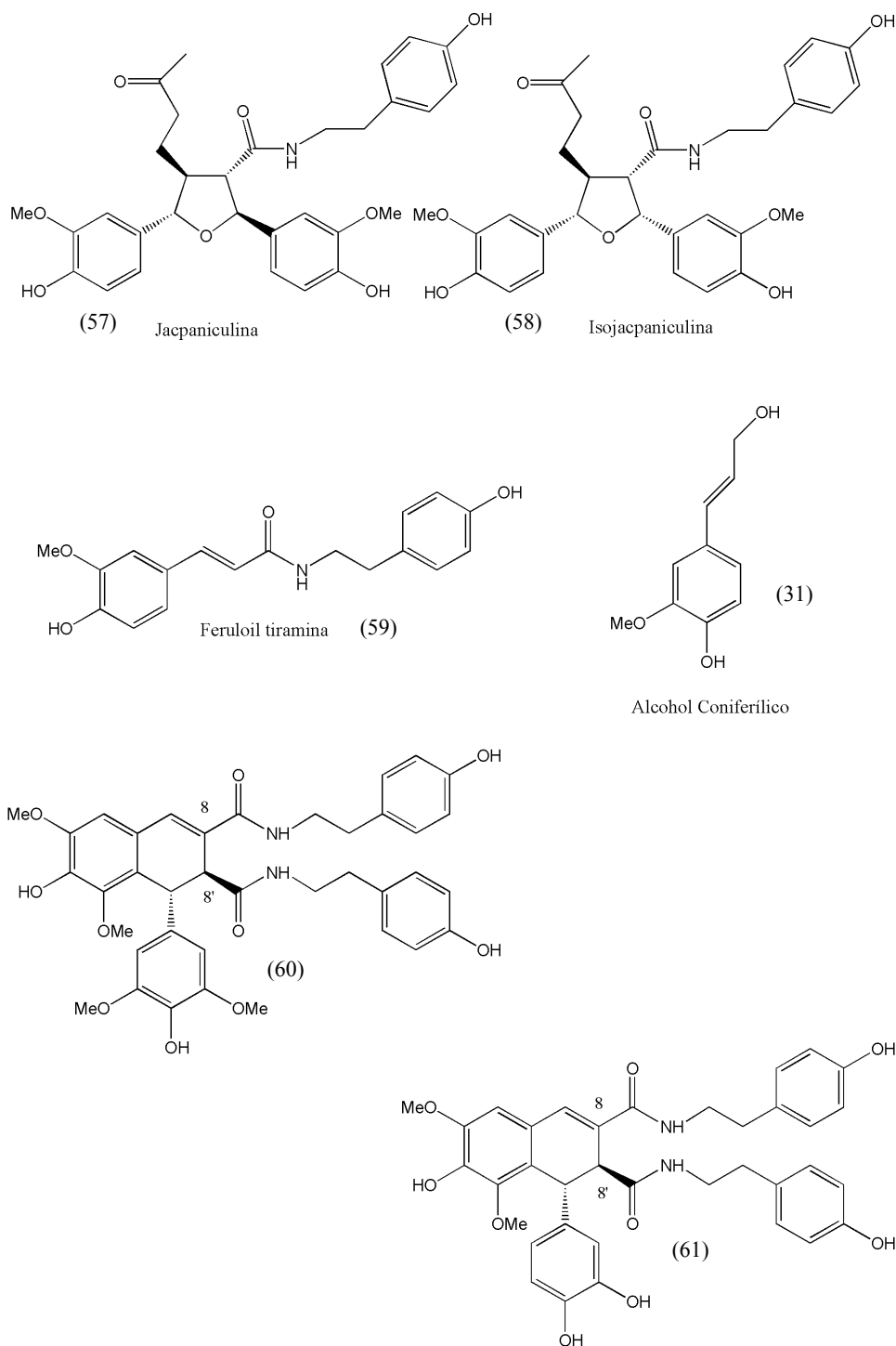


Esquema 18. Flavonolignanos

²² Foo L. Y. and Karchesy J. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, (4), 217-9, (1989)

²³ Malan J.C.S., Chen J., Foo L.Y. Karchesy J.J., in "Plant Polyphenols," eds. Hemingway R.W. and Laks P.E., Plenum, New York, p.411. (1992)

Otro grupo interesante son las lignanamidas como jacpaniculina (57) e isojacpaniculina (58) (Esq. 19), aisladas del fruto de *Jacquemontia paniculata* (Convolvulaceae)²⁴. Probablemente estos compuestos resulten del acoplamiento del alcohol coniferílico (31) con feruloil tiramina (59).



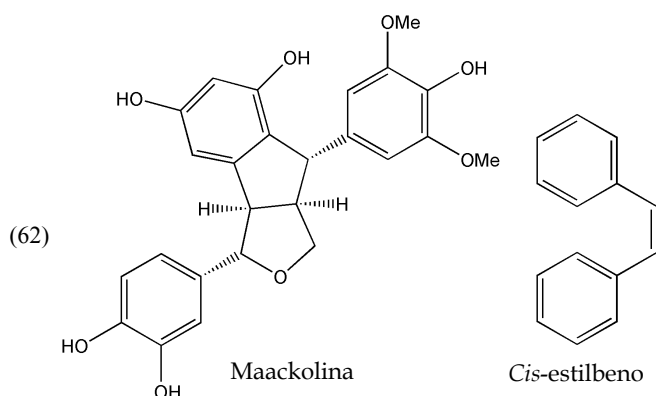
Esquema 19. Lignanamidias

²⁴ Henrici A., Kaloga M., Eich E. *Phytochemistry*, **37** (6), 1637-40, (1994)

Varias especies de plantas, en especial de la familia Solanaceae, acumulan derivados de *p*-cumaril y feruloil tiramina que se considera que forman parte del componente aromático de la suberina.

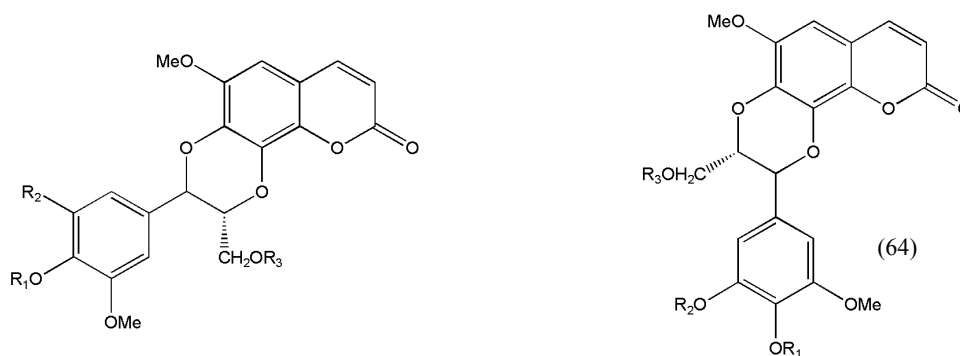
Las lignanamidas dihidronaftalénicas 60 y 61 (Esq. 19) han sido aisladas de *Porcelia macrocarpa* (Annonaceae)²⁵.

La maackolina (62) (Esq. 20), aislada de *Maackia amurensis* (Fabaceae)²⁶, es un estilbenolignano aislado en forma racémica que presumiblemente procede del acoplamiento no específico del alcohol sinapílico con precursores del estilbeno.



Esquema 20. Ejemplo de estilbenolignano

Las cleomiscosinas A (63), B (64) y C (65) (Esq. 21) son tres cumarinolignanos aislados de la semilla de *Cleome viscosa* (Capparidaceae)²⁷, una planta usada en la medicina tradicional india.



Esquema 21. Ejemplos de cumarinolignanos

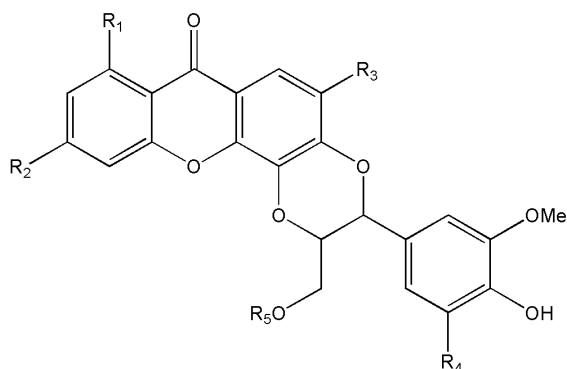
²⁵ Chaves M. H. and Roque N. F. *Phytochemistry*, **46** (5), 879-81, (1997)

²⁶ Kulesh N.I., Denisenko V.A., Maksimov O.B. *Phytochemistry*, **40** (3), 1001-3, (1995)

²⁷ Ray A. B., Chattopadhyay S. K., Kumar S. *Tetrahedron*, **41** (1), 209-14, (1985)

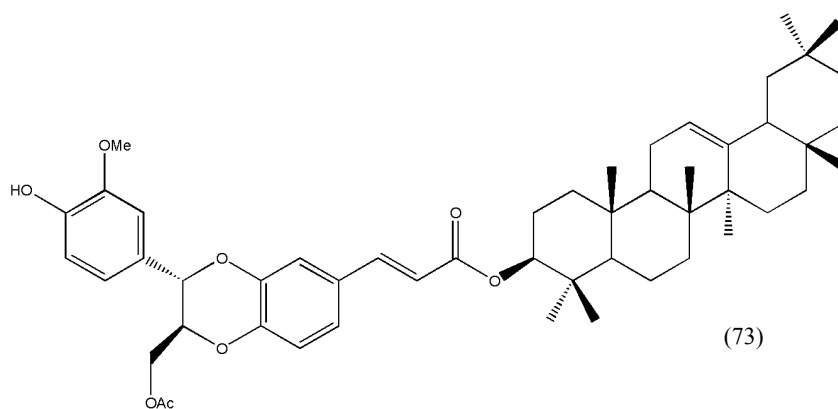
Otro ejemplo de dímeros mixtos son los 7 xantonolignanos (66-72) que se muestran en el Esquema 22, aislados de *Psorospermum febrifugum*²⁸.

Compuesto	R1	R2	R3	R4	R5
66	H	H	OMe	H	H
67	H	H	OMe	OMe	H
68	OMe	H	OMe	H	H
69	OMe	H	OMe	H	Ac
70	OMe	H	OMe	OMe	H
71	OMe	OH	OMe	OMe	H
72	OH	OH	H	OMe	H



Esquema 22. Xantonolignanos de *Psorospermum febrifugum*

Recientemente se ha aislado²⁹ de *Crossopetalum uragoga* (Celastraceae) el primer ejemplo de dímero mixto formado por un neolignano y un triterpeno, uragogin (73) (Esq. 23) que además es el primer neolignano aislado de Celastraceae.



Esquema 23. Uragogin

En el Esquema 24 se muestran otros dímeros mixtos como el ácido-(+)-megacerotónico (74), aislado de *Megaceros flagellaris*^{30,31,32} (Bryophyta), (-)-criptoresinol

²⁸ Abou-Shoer M., Habib A.-A., Chang C.-J., Cassady J.M. *Phytochemistry*, **28** (9), 2483-7, (1989)

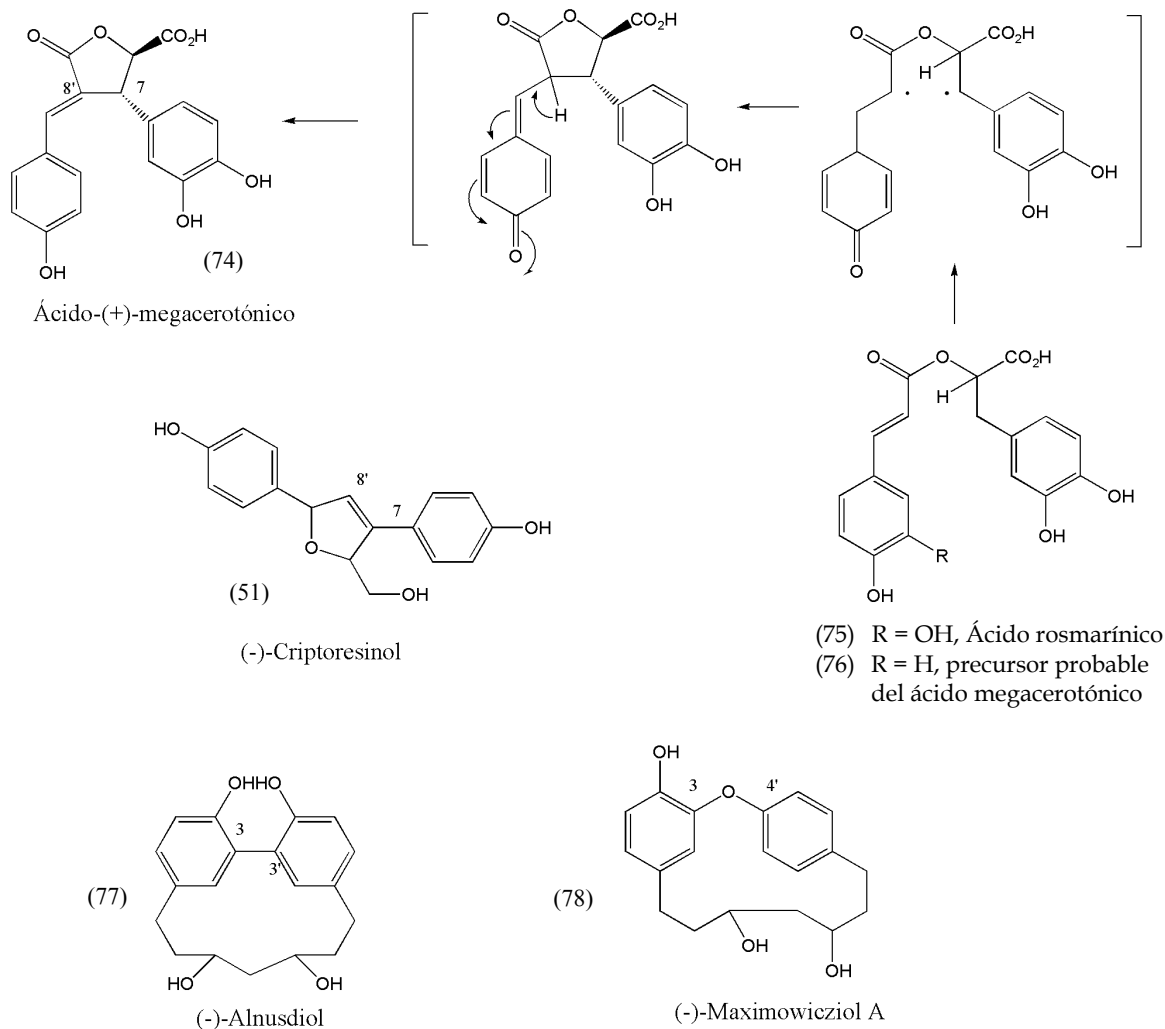
²⁹ Núñez M. J. Tesis Doctoral, Universidad de La Laguna, (2003)

³⁰ Takeda R., Hasegawa J., Sinozaki K., in "Bryophytes: Their Chemistry and Chemical Taxonomy", eds. Zinsmeister H.D. and Mues R, Clarendon Press, Oxford, p. 201, (1990)

³¹ Takeda R., Hasegawa J., Shinozaki M. *Tetrahedron Lett*, **31** (29), 4159-62, (1990)

³² Brown E., Dhal R., Papin N. *Tetrahedron*, **51** (47), 13061-72, (1995)

(51) de *Cryptomeria japonica* (Pinaceae)³³ y los diarilheptanoides (-)-alnusdiol (77) y (-)-maximowiczol A (78) de *Betula maximowicziana* (Betulaceae)³⁴.



Esquema 24. Otros ejemplos de dímeros mixtos

Se cree que el ácido-(+)-megacerotónico (74) se biosintetiza a partir de un compuesto (76) (Esq. 24) relacionado con el ácido rosmarínico (75) que también está presente en *Megaceros flagellaris*. Según esta idea, se formaría una especie birradical de transición derivada del precursor 76, seguido del cierre del anillo y de una rearomatización.

³³ Takahashi K., Yasue M., Ogiyama K. *Phytochemistry*, **27**(5), 1550-2, (1988)

³⁴ Hanawa F., Shiro M., Hayashi Y. *Phytochemistry*, **45** (3), 589-95, (1997)

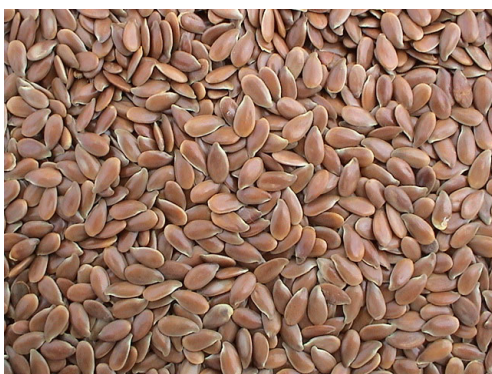
Los lignanos y la evolución de las plantas

La adaptación evolutiva de las plantas desde el medio acuático al terrestre vino acompañada de la elaboración masiva de productos por la vía de los fenilpropanoides¹⁹. Estos productos eran necesarios para funciones de defensa (lignanos), soporte estructural (lignina), pigmentos florales (flavonoides) y para evitar la pérdida de agua (suberina). Conjuntamente, estos metabolitos suponen más del 30% del carbono en plantas vasculares. Por otra parte, no se ha aislado ni lignanos ni lignina en algas.

Los lignanos están presentes en un amplio número de plantas terrestres, desde antoceros y hepáticas hasta las plantas vasculares: helechos y espermatófitos (fanerógamas) con sus dos niveles de organización: gimnospermas y angiospermas.

Se han encontrado lignanos en todas partes de las plantas: tallos, rizomas, raíces, semillas, aceites, exudados, resinas, flores, hojas, frutos y cortezas, pero sus cantidades varían ampliamente entre tejidos y entre especies. En algunos casos, pueden encontrarse de forma masiva, como es el caso de las semillas de lino (*Linum usitatissimum*) con altas concentraciones del diglucósido del secoisolariciresinol (SDG) (141)³⁵.

Otro ejemplo es el duramen del cedro rojo occidental (*Thuja plicata* (Cupressaceae)) en donde los lignanos y oligómeros mayores pueden constituir hasta el 20% de la planta seca¹⁹.



Semillas de lino (*Linum usitatissimum*)



Cedro rojo occidental (*Thuja plicata*)

³⁵ Wang L.-Q. *Journal of Chromatography B*, 777 (1-2), 289-309, (2002)

La localización dentro de la planta es también variable, dependiendo del tejido y de la especie en cuestión. Así, por ejemplo, en el cedro rojo parece que se acumulan principalmente en forma de depósitos sin estructura en la madera prelignificada³⁶; mientras que en el lino están en las semillas, como se señaló anteriormente, unidos covalentemente a carbohidratos. Por otra parte, en *Linum flavum*, los lignanos se acumulan en vacuolas¹⁹.

Lignanos en Criptógamas

Los briófitos (Bryophyta), que incluyen a hepáticas (Hepaticae), antoceros (Anthocerotae) y musgos (Bryatae), aparecen en el registro fósil en el periodo Devónico³⁷, hace más de 350 millones de años. Estos fósiles son muy similares a los briófitos actuales.

Los lignanos se encuentran tanto en hepáticas como en antoceros, pero hasta ahora no se han encontrado en musgos. El conocimiento de sus estructuras es interesante ya que puede servir para dilucidar el modo en que han evolucionado sus rutas biosintéticas.

En el Esquema 25 se muestran lignanos aislados de las hepáticas: *Pellia epiphylla*^{38,39} (compuestos 79-82), *Jamesoniella autumnalis*⁴⁰ (compuestos 83-88) y *Scapania undulata*⁴¹ (compuesto 88). Se trata de lignanos ópticamente activos que parecen derivar del ácido cafeico (89). El compuesto 81 está unido a un resto de ácido sikímico (90).

Por otra parte, los compuestos 91 y 92 aislados de *Riccardia multifida* subsp. *decrescens*^{42,43} y *Jackiella javanica*⁴⁴, respectivamente, parecen derivar de la unión C₈-C_{5'} de los alilfenoles eugenol (93), isoeugenol (94) y *p*-hidroxiarilpropeno (95).

³⁶ Hergert H. L. Lignins-Occurrence, Formation, Structure and Reactions, eds. Sarkanen K. V., Ludwig C. H., Wiley-Interscience, New York, 267, (1971)

³⁷ Curtis. H. Biología. Ed. Panamericana. 4ª edición. 1987

³⁸ Cullmann F., Adam K.P. and Becker H. *Phytochemistry*, **34** (3), 831-4, (1993)

³⁹ Cullmann F., Adam K.P., Zapp J. and Becker H. *Phytochemistry*, **41** (2), 611-5, (1996)

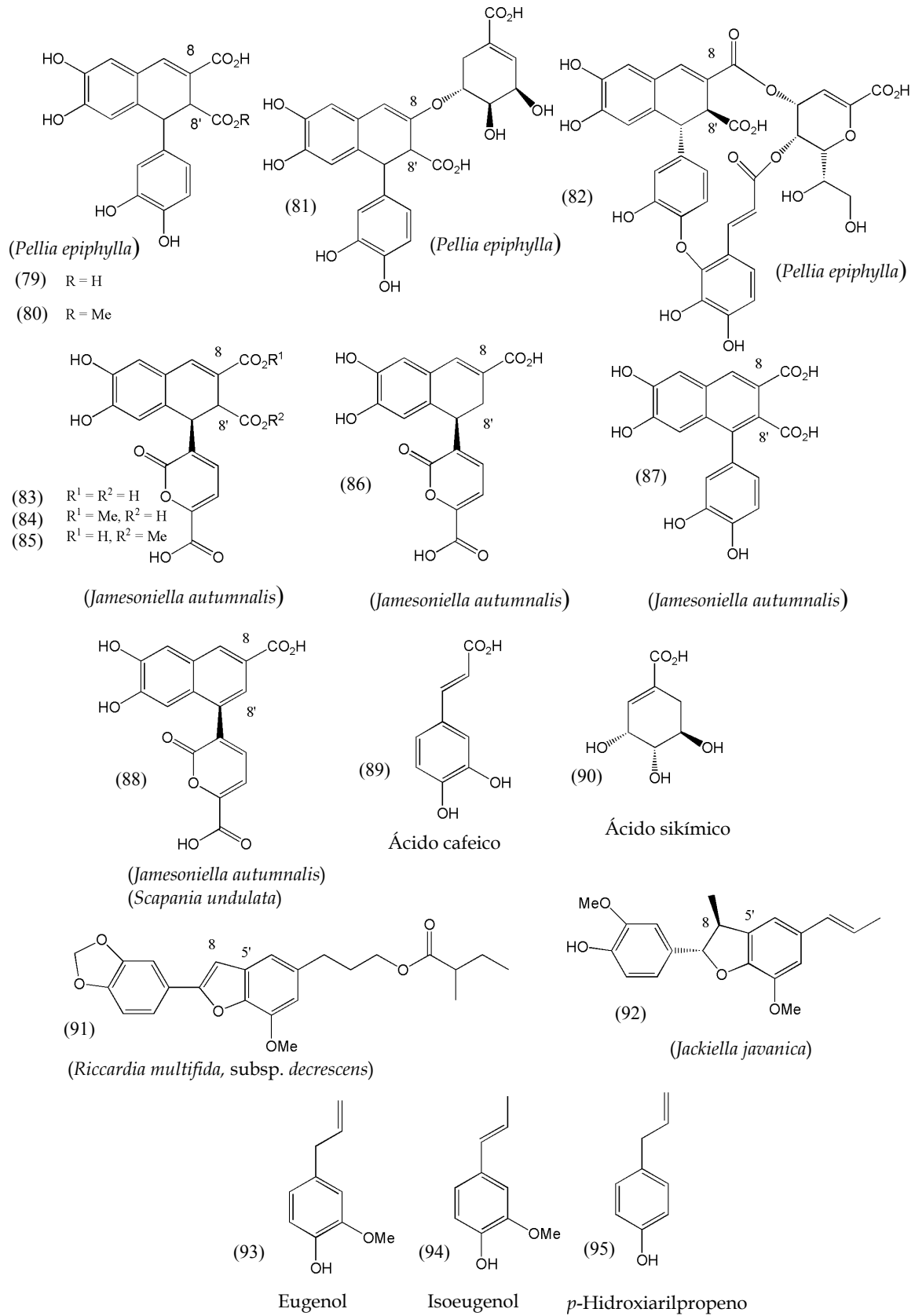
⁴⁰ Tazaki H., Adam K.P. and Becker H. *Phytochemistry*, **40** (6), 1671-5, (1995)

⁴¹ Mues R., Huneck S., Connolly J.D. and Rycroft D.S. *Tetrahedron Lett.*, **29** (51), 6793-6, (1988)

⁴² Yoshida T., Toyota M. and Asakawa Y. *J. Nat. Prod.*, **60** (2), 145-7, (1997)

⁴³ Asakawa Y. *Heterocycles*, **46** (1), 795-848, (1997)

⁴⁴ Nagashima F., Toyota M. and Asakawa Y. *Phytochemistry*, **29** (7), 2169-74, (1990)



Esquema 25. Lignanos de Criptógamas

El compuesto 91 posee dos aspectos interesantes: la ausencia de C₉ y la introducción del grupo metilendioxi, que hasta ahora se creía que surgía en las rutas biosintéticas de los lignanos con la aparición de las gimnospermas.

De antoceros sólo se conoce hasta la fecha el ácido (+)-megacerotónico (74) aislado de *Megaceros flagellaris*¹⁵.



Jamesionella autumnalis (Hepaticae)



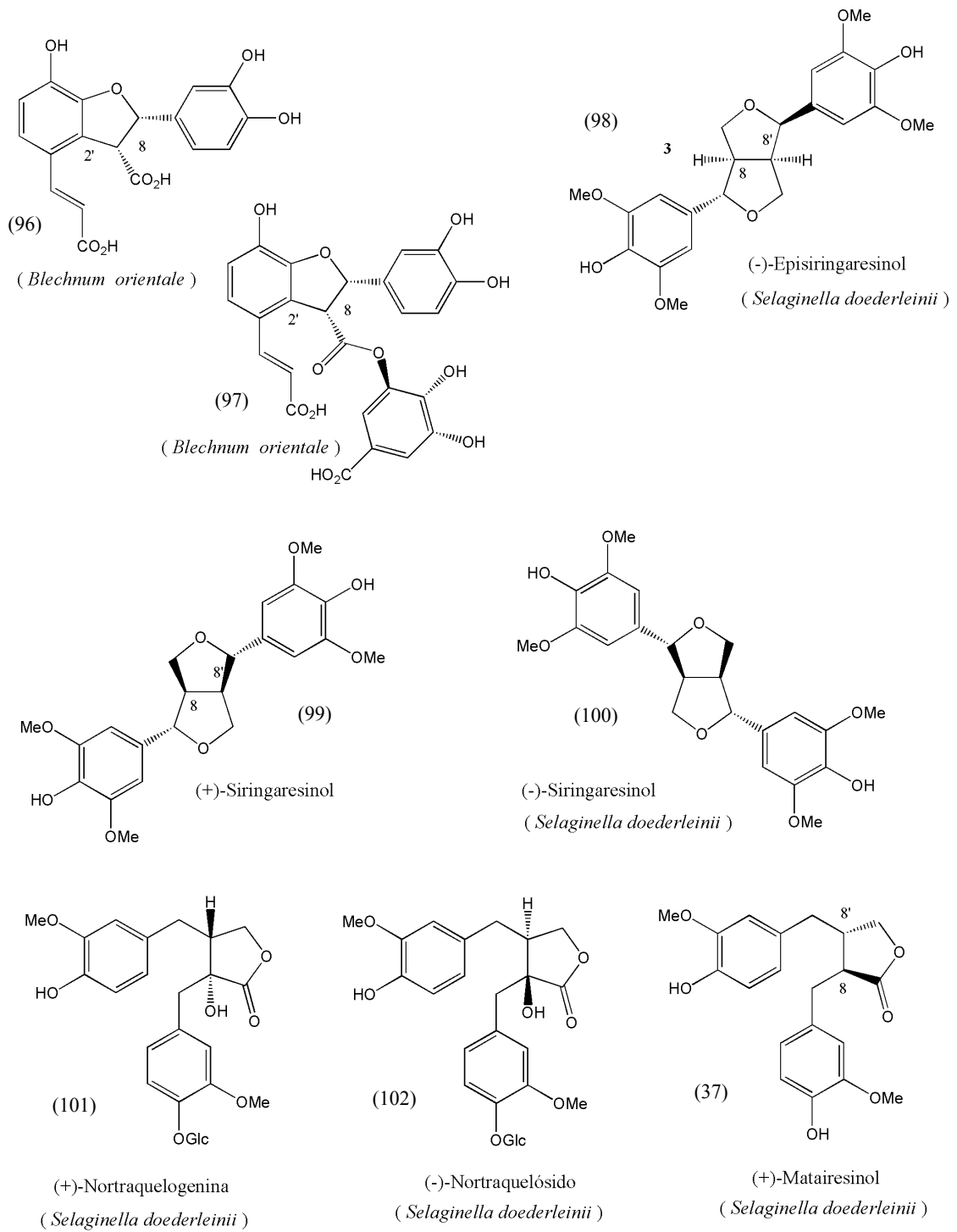
Scapania undulata (Hepaticae)

Los lignanos también aparecen en los helechos (Pterydophyta) e incluyen a los compuestos 96 y 97 (Esq. 26), presumiblemente derivados del ácido cafeico con las uniones C₈-C_{2'} y aislados de *Blechnum orientale*, *Struthiopteris amabilis*, *Struthiopteris niponica*, *Woodwardia orientalis*, *Woodwardia prolifera* y *Brainea insignis* (Blenchnaceae)⁴⁵.

Además, (-)-episiringaresinol (98), (-)-siringaresinol (100), (+)-nortraquelogenina (101), (-)-nortraquelósido (102) y (+)-matairesinol (37) están presentes en *Selaginella doederleinii* (Selaginellaceae), una pequeña pteridofita perenne que se encuentra a baja altitud en el sur y sudoeste de China⁴⁶.

⁴⁵ Wada H., Kido T., Tanaka N., Murakami T., Saiki Y., and Chen C.M. *Chem. Pharm. Bull.*, **40** (8), 2099-101, (1992)

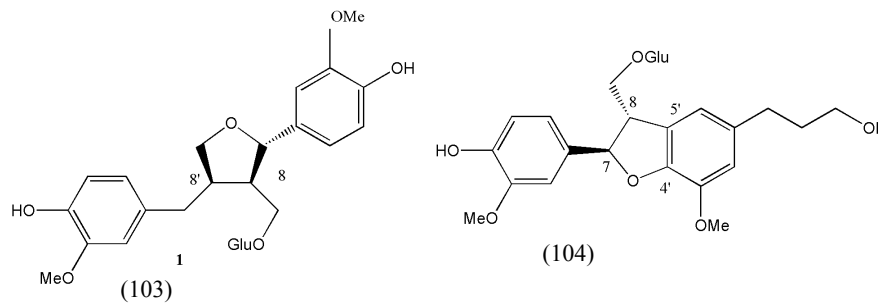
⁴⁶ Lin R.C., Skaltsounis A.L., Seguin E., Tillequin F. and Koch M. *Planta Medica*, **60** (2), 168-70, (1994)



Esquema 26. Lignanós de helechos

En el helecho *Pteris vittata* (Pteridaceae) se encuentran los glucósidos del lariciresinol (103) y del (-)-alcohol dihidrodeshidrodiconiferílico (104)⁴⁷ (Esq. 27).

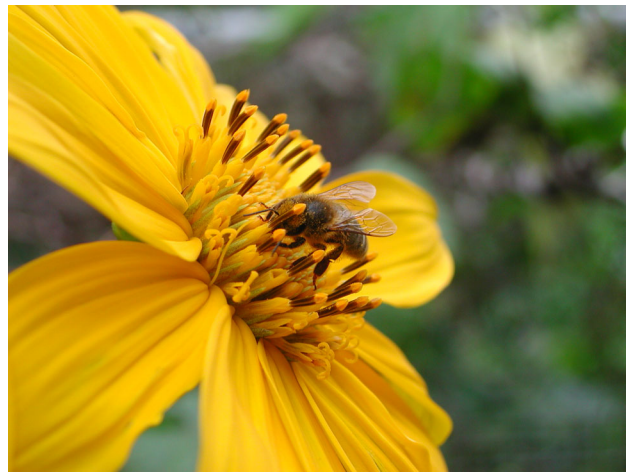
En criptógamas no se han encontrado otros lignanos que los diméricos. Oligómeros mayores no se han descrito hasta la fecha.



Esquema 27. Lignanos de *Pteris vittata* (Pterydophyta)

Lignanos en fanerógamas

En el Pérmico (225-280 m.a.) ocurrieron cambios drásticos en el clima del planeta que desarrollaron una enorme presión selectiva sobre los seres vivos. Aquellos que fueron capaces de desarrollar estrategias adaptativas ventajosas predominaron sobre los que no lo hicieron. Este fue el caso de las plantas capaces de producir semillas (espermatófitos o fanerógamas).

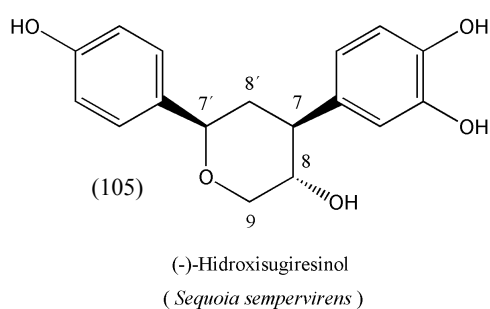


Los espermatófitos, que ya existían desde finales del Carbonífero (el periodo anterior al Pérmico), se dividen en dos grandes grupos, las gimnospermas que poseen semillas desnudas y las angiospermas que tienen semillas protegidas por un pericarpo, es decir en el interior de un fruto. A estas últimas se las conoce comúnmente como plantas con flores.

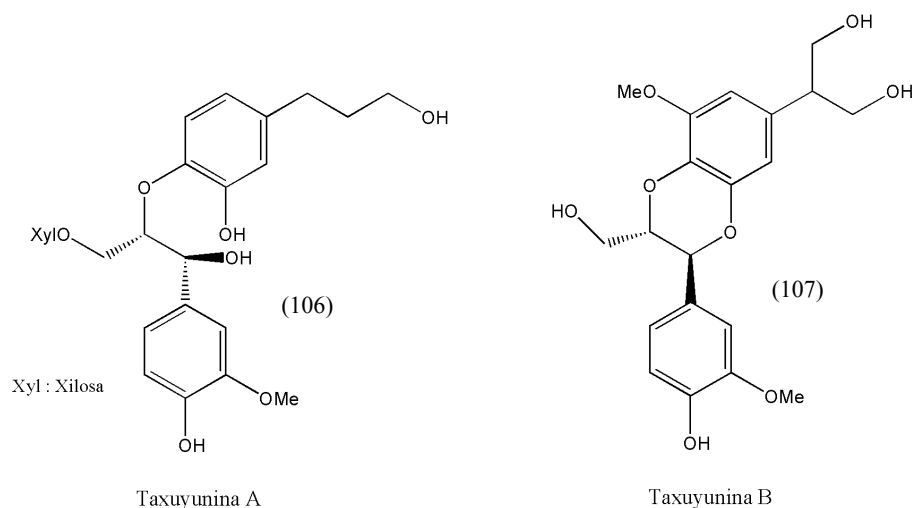
⁴⁷ Satake T., Murakami T., Saiki Y. and Chen C.M. *Chem. Pharm. Bull.*, **26** (5), 1619-22, (1978)

En contraste con los relativamente pocos ejemplos de lignanos encontrados en criptógamas, la aparición de las gimnospermas fue acompañada por un incremento masivo en la diversidad estructural de los lignanos, particularmente las formas ópticamente activas del tipo de los tetrahidrofuranos, dibencilbutanos, dibencilbutirolactonas, ariltetrahidronaftalenos y arilnaftalenos¹⁹. La inmensa mayoría de los lignanos de gimnospermas son dímeros derivados del alcohol coniferílico. No obstante, se han descrito trímeros y oligómeros mayores.⁴⁸

También hay neolignanos en gimnospermas con las uniones C₈-C₅' y C₈-O-C₄' ó C₇-C₈' como en el norlignano (-)-hidroxisugiresinol (105) de *Sequoia sempervirens* (Taxodiaceae) o los neolignanos denominados taxuyuninas A (106) y B (107) aislados de *Taxus yunnanensis*⁴⁹ (Taxaceae).



Sequoia sempervirens



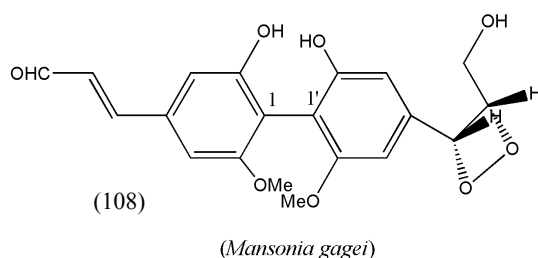
Esquema 28. Lignanos de gimnospermas

⁴⁸ Barrero A.F., Haïdour A., Dorado M. M. And Cuerva J. M. *Phytochemistry*, **41** (2), 605-9, (1996)

⁴⁹ Sheng-Hong Li., Hong-Jie Z., Ping Y., Xue-Mei N., Wei X., Han-Dong S. *Chinese Journal of Chemistry*, **21** (7), 926-30, (2003)

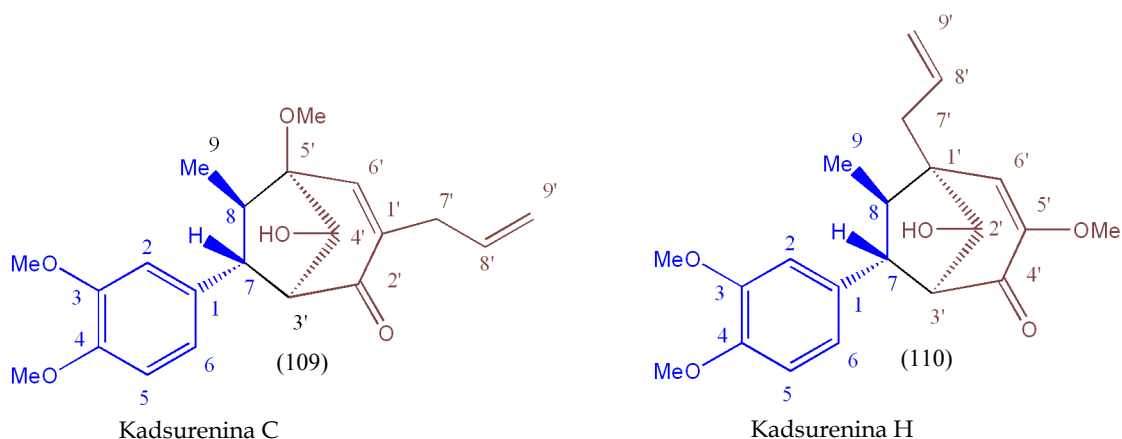
La aparición de las angiospermas condujo a un enorme aumento de los tipos de estructuras de los lignanos. De nuevo, las formas más extendidas fueron las ópticamente activas con unión C₈-C_{8'}, pero también aparecieron, y especialmente en dicotiledóneas (Magnoliatae), otros acoplamientos (C₈-C_{1'}, C₈-C_{5'}, C₅-C_{5'}, C₇-C_{1'}, C₈-C_{7'}, C₁-C_{5'}, C₈-O-C_{4'}, C₂-O-C_{3'}, C₃-O-C_{4'}) que diversificaron los tipos de neolignanos.

El mansoxetano (108) (Esq. 29) es un neolignano aislado de *Mansonia gagei* (Sterculiaceae)⁵⁰.



Esquema 29. Mansoxetano

Los biciclo-(3.2.1)-octanoide neolignanos se caracterizan por la fusión de la cadena lateral (C₃) de una de las unidades C₆-C₃ con la parte C₆ de la otra unidad C₆-C₃. Kadsurenina C (109) y kadsurenina H (110) son dos lignanos de este tipo aislados de la parte aérea de *Piper kadsura* (Piperaceae), una hierba tradicional china empleada en el tratamiento de la inflamación y enfermedades reumáticas⁵¹.

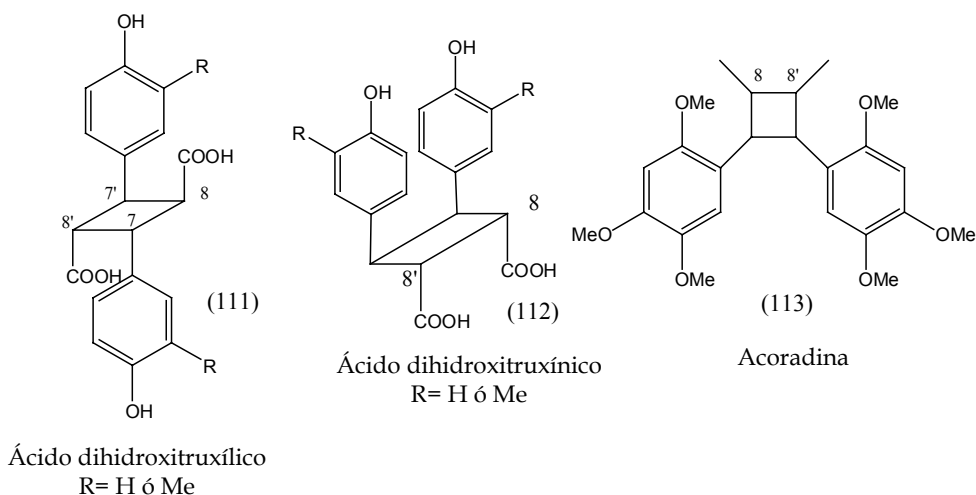


Esquema 30. Neolignanos de *Piper kadsura*

⁵⁰ Tiew P., Takayama H., Kitajima M., Aimi N., Kokpol U., Chavasiri W. *Tetrahedron Letters*, **44** (35), 6759-61, (2003)

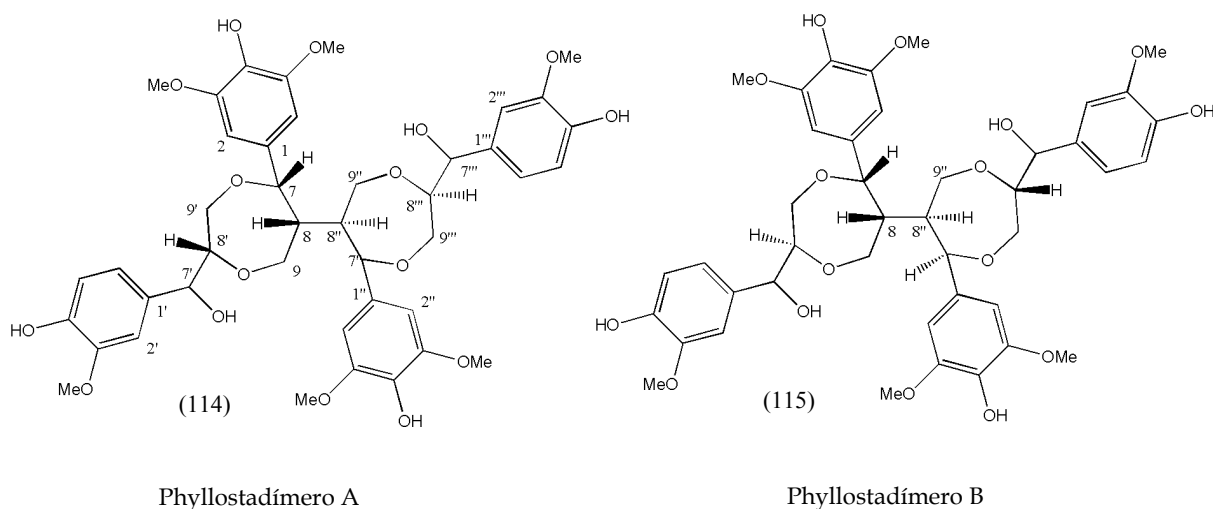
⁵¹ Jiang R.-W., Mak T.C.W., Fung K.-P. *Journal of Molecular Structure*, **654** (1-3), 177-82, (2003)

Se han descrito relativamente pocos lignanos de cada tipo en las monocotiledóneas (Liliatae). Algunos ejemplos son el ácido dihidroxitruxílico (111) (Esq. 31), un cicloneolignano (uniones C₇-C_{8'} y C_{7'}-C₈) y los ciclolignanos ácido dihidroxitruxínico (112), aislado de *Setaria anceps* (Poaceae)^{52,53} y acoradina (113) de *Acorus calamus* (Araceae)⁵⁴.



Esquema 31. Dímeros de monocotiledóneas

Los phyllostadímeros A (114) y B (115) son dos dímeros de neolignanos aislados por Suga et al.⁵⁵ del tallo del bambú (*Phyllostachys edulis* (Poaceae)).



Esquema 32. Dímeros de neolignanos aislados de *Phyllostachys edulis*

⁵² Hartley R. D. and Ford C.W. in "Plant Cell Wall Polymers. Biogenesis and Biodegradation," eds. Lewis N.G. and Paice M. G., ACS Symposium Series, Washington, DC, vol. 399, p. 137, (1989)

⁵³ Ford C.W. and Hartley R.D. *J. Sci. Food Agric.*, **50** (1), 29-43, (1990)

⁵⁴ Patra A. and Mitra A.K. *Indian J. Chem.*, **17B** (4), 412-14, (1979)

⁵⁵ Suga A., Yoshihisa T., Goto S., Munakata T., Yamauchi I., Kogure K. *Phytochemistry*, **64** (5), 991-6, (2003)

A continuación se muestra una clasificación simplificada de las fanerógamas desde la categoría taxonómica de división hasta la de familia según Strasburger⁵⁶ y Scagel et al.⁵⁷. Se han omitido los grupos extintos y se indica en color aquellas familias que presentan especies de las que se han aislado lignanos en sentido amplio (lignanos, neolignanos, dímeros mixtos, etc.).

Div. **Magnoliophyta** (= Spermatophyta)
(Fanerógamas)

Subdiv.: **Coniferophytina**: Gimnospermas de hoja dicótoma o acicular

Clase	Subclase	Orden	Familia
Ginkgoatae		Ginkgoales	Ginkgoaceae
Pinatae	Coniferae (Coníferas)	Pinales	Araucariaceae (<i>Araucaria</i> ^{58,59})
			Cupresasaceae (<i>Thuja</i>)
			Pinaceae (<i>Cedrus</i> ⁶⁰ , <i>Pseudotsuga</i>)
			Podocarpaceae
			Taxodiaceae
	Taxidae	Taxales	Taxaceae ⁴⁹

■ Ref.19

Subdiv. **Cycadophytina**: Gimnospermas de hoja pinnada

Clase	Orden	Familia (<i>especies</i>)
Cycadatae	Cycadales	Cycadaceae
		Stangeriaceae
		Zamiaceae
Chlamydospermae	Weltwitschiales	Weltwitschiaceae
	Ephedrales	Ephedraceae (<i>Ephedra</i> ⁶¹)
	Gnetales	Gnetaceae

⁵⁶ Strasburger. "Lehrbuch der Botanik". 32ª edición, 7ª edición española. Ed Omega, (1988)

⁵⁷ Scagel R. E., Bandoni R. J., Rouse G. E., et al. "El Reino vegetal". Ed. Omega, (1987)

⁵⁸ Fonseca S. F., Nielsen L.T., Ruveda E.A. *Phytochemistry*, **18** (10), 1703-8, (1979)

⁵⁹ Ohashi H., Kawai S., Sakurai Y., Yasue M. *Phytochemistry*, **31** (4), 1371-3, (1992)

⁶⁰ Agrawal P.K., Rastogi R.P. *Phytochemistry*, **21** (6), 1459-61, (1982)

⁶¹ Nawwar M.A.M., Barakat H.H., Buddrus J., Linscheidt M. *Phytochemistry*, **24** (4), 878-9, (1985)

Subdiv.: **Magnoliophytina** (Angiospermas)Clase: **Magnoliatae** (Dicotiledóneas)

Subclase	Orden	Familia
Magnoliidae (Magnólidas)	Magnoliales	Annonaceae Degeneriaceae Eupomatiaceae Himantandraceae Magnoliaceae (<i>Magnolia</i> ^{62,63}) Myristicaceae Winteraceae
	Aristolochiales	Aristolochiaceae
	Laurales	Austrobaileyaceae Chloranthaceae Hernandiaceae Lauraceae (<i>Apollonia</i> ⁶⁴ , <i>Lindera</i> ⁶⁵) Monimiaceae (<i>Laurelia</i> ⁶⁶)
	Piperales	Piperaceae
	Nymphaeales	Cabombaceae Ceratophyllaceae Nymphaeaceae (<i>Nymphaea</i> ⁶⁷)
	Nelumbonales	Nelumbonaceae

■ Ref.16

■ Ref.19

⁶² Miyazawa M., Kasahara H., Kameoka H. *Phytochemistry*, **42** (2), 531-3, (1996)

⁶³ Ma Y.L., Han G.Q. *Chinese Chemical Letters*, **5** (10), 847-8, (1994)

⁶⁴ Pérez C, Almonacid L.N., Trujillo J.M., González A.G. Alonso S.J., Navarro E. *Phytochemistry*, **40** (5), 1511-3, (1995)

⁶⁵ Kwon H.C., Choi S.U., Lee J.O., Bae K.H., Zee O.P., Lee K.R. *Archives of Pharmacal Research*, **22** (4), 417-22, (1999)

⁶⁶ Adjaye A.E., Dobberstein R.H., Venton D.L., Fong H.H.S. *Journal of Natural Products*, **47** (3), 553-4, (1984)

⁶⁷ Zhang Z., Elsohly N.E., Li X.-C., Khan S.I., Broedel S.E., et al. *Journal of Natural Products*, **66** (4), 548-50, (2003)

Ranunculidae (Ranuncúlidas)	Illicianales	Illiciaceae Schizandraceae	
	Ranunculales	Berberidaceae Ranunculaceae	
	Papaverales	Papaveraceae Fumariaceae	
Caryophyllidae (Cariofilidas)	Caryophyllales	Aizoaceae Amaranthaceae Basellaceae Cactaceae (<i>Opuntia</i> ⁶⁸) Caryophyllaceae Chenopodiaceae Dideraceae Molluginaceae Nyctaginaceae Phytolaccaceae (<i>Phytolacca</i> ⁶⁹) Portulacaceae	
		Polygonales	Poligonaceae
		Plumbaginales	Plumbaginaceae
Hamamelididae (Hamamelídias)	Hamamelidales	Hamamelidaceae Platanaceae	
	Fagales	Betulaceae Fagaceae	
	Myricales	Myricaceae	
	Juglandales	Juglandaceae	
	Urticales	Cannabinaceae Moraceae (<i>Brosimum</i> ⁷⁰ , <i>Ficus</i> ⁷¹) Ulmaceae Urticaceae	

■ Ref.16

■ Ref.19

⁶⁸ Osamu S., Morihiko K., Setsuko S., Motoyoshi S. *Natural Medicines* (Tokyo), **51** (3), 281, (1997)

⁶⁹ Woo W.S., Kang S. S. *Tetrahedron Letters*, **21** (44), 4255-8, (1980)

⁷⁰ Takashima J., Asano S., Ohsaki A. *Planta Med.*, **68** (7), 621-5, (2002)

⁷¹ Li Y.-C., Kuo Y.-H. *Chem. Pharm. Bull.*, **48** (12), 1862-1865, (2000)

Rosidae (Rósidas)	Saxifragales	Crassulaceae, Cunoniaceae, Grossulariaceae, Saxifragaceae
	Rosales	Rosaceae
	Fabales	Caesalpinaceae Fabaceae (= Papilionaceae) Mimosaceae
	Proteales	Proteaceae
	Myrtales	Combretaceae Lythraceae, Melastomataceae, Onagraceae, Punicaceae, Rhizophoraceae Myrtaceae Sonneratiaceae, Trapaceae
	Haloragales	Haloragaceae
	Rutales	Anacardiaceae Burseraceae Rutaceae Simaroubaceae (<i>Brucea</i> ⁷²)
	Sapindales	Aceraceae, Hippocastanaceae, Sapindaceae, Staphyleaceae
	Geraniales	Balsaminaceae, Erythroxylaceae, Geraniaceae Linaceae Oxalidaceae Zygophyllaceae
	Polygalales	Polygalaceae
	Celastrales	Celastraceae (<i>Salacia</i> ⁷³ , <i>Crossopetalum</i> ²⁹)
	Rhamnales	Rhamnaceae, Vitaceae
	Santalales	Loranthaceae , Santalaceae, Viscaceae
	Balanophorales	Balanophoraceae , Cynomoriaceae
	Rafflesiales	Hydnoraceae, Rafflesiaceae
	Euphorbiales	Buxaceae, Euphorbiaceae ,
	Thymelaeales	Thymelaeaceae
Elaeagnales	Elaeagnaceae	
Araliales	Araliaceae , Apiaceae (= Umbelliferae) (<i>Bupleurum</i> ⁷⁴)	

■ Ref.16

■ Ref.19

⁷² Luyengi L., Suh N., Fong H.H.S., Pezzuto J.M., Kinghorn A.D. *Phytochemistry*, **43** (2), 409-12, (1996)

⁷³ Kishi A., Morikawa T., Matsuda H. and Yoshikawa M. *Chem. Pharm. Bull.*, **51** (9), 1051-5, (2003)

⁷⁴ Estévez-Reyes R., Estévez-Braun A., González A.G. *Journal of Natural Products*, **56** (7), 1177-81, (1993)

Subclase	Orden	Familia
Dilleniidae (Dilénidas)	Dilleniales	Dilleniaceae, Paeoniaceae.
	Theales	Clusiaceae (=Guttiferae) , (<i>Psorospermum</i> ²⁸) Dipterocarpaceae, Hypericaceae, Theaceae
	Serraceniales	Sarraceniaceae
	Violales	Caricaceae, Cistaceae, Flacourtiaceae Passifloraceae, Tamaricaceae, Violaceae
	Capparales	Brassicaceae (= Cruciferae), Capparaceae (<i>Cleome</i> ²⁷) Resedaceae
	Tropaeolales	Tropaeolaceae
	Salicales	Salicaceae
	Begoniales	Begoniaceae
	Cucurbitales	Cucurbitaceae
	Malvales	Bombacaceae, Malvaceae, Sterculiaceae, Tiliaceae
	Ebenales	Ebenaceae, Sapotaceae, Styracaceae , Symplocaceae
	Primulales	Myrsinaceae, Primulaceae, Theophrastaceae
	Cornales	Aquifoliaceae, Cornaceae, Hydrangaeaceae, Nyssaceae
	Ericales	Clethraceae, Ericaceae , Monotropaceae Pyrolaceae
Lamiidae (Lámidas)	Dipsacales	Adoxaceae, Caprifoliaceae, Dipsacaceae, Sambucaceae, Valerianaceae
	Oleales	Oleaceae
	Gentianales	Apocynaceae , Asclepiadaceae, Gentianaceae, Loganiaceae, Menyanthaceae, Rubiaceae
	Solanales	Convolvulaceae , Cuscutaceae, Polemoniaceae, Solanaceae
	Boraginales	Boraginaceae, Hydrophyllaceae
	Scrophulariales	Acanthaceae , Bignoniaceae, Gesneriaceae, Globulariaceae , Lentibulariaceae, Orobanchaceae, Pedaliaceae , Plantaginaceae, Scrophulariaceae
	Hippuridales	Hippuridaceae
	Lamiales	Callitrichaceae, Lamiaceae (=labiatae) , Phrymaceae , Verbenaceae
	Campanulales	Campanulaceae, Lobeliaceae
	Asterales	Asteraceae (=compositae) , Cichorioideae

■ Ref.16
■ Ref.19

Clase: **Liliatae** (Monocotiledóneas)

Subclase	orden	Familia
Alismatidae	Alismatales	Alismataceae, Butomaceae
	Hydrochartiales	Hydrochartiaceae
	Zosterales	Juncaginaceae, Najadaceae, Potamogetonaceae, Scheuchzeriaceae, Zannichelliaceae, Zosteraceae
	Dioscoreales	Discoreaceae, Trilliaceae
	Asparagales	Agavaceae, Alliliaceae, Amaryllidaceae, Asphodelaceae, Convallariaceae, Dracaenaceae, Hyacinthaceae, Phormiaceae, Smilacaceae
	Liliales	Colchicaceae, Iridaceae, Liliaceae, Elanthaceae,
	Orchidales	Orchidaceae
	Pontederiales	Pontederiaceae
	Bromeliales	Bromeliaceae
	Zingiberales	Cannaceae, Marantaceae, Musaceae, Zingiberaceae
	Juncales	Juncaceae
	Cyperales	Cyperaceae
	Typhales	Typhaceae
	Commelinales	Commelinaceae
	Eriocaulales	Eriocaulaceae
	Poales	Poaceae , Restionaceae
Arecidae	Arecales	Arecaceae (=Palmae)
	Pandales	Pandaceae
	Arales	Araceae, Lemnaceae

■ Ref.16

■ Ref.19

El metabolismo de los lignanos

Limitaciones de la hipótesis del acoplamiento aleatorio de radicales libres:

La proteína dirigente de *Forsythia* spp.

Aunque la lignina y los lignanos, ambos derivados del acoplamiento de monolignoles, suponen cerca del 30% del carbono orgánico circulante de toda la biosfera, su biosíntesis ha sido escasamente comprendida durante mucho tiempo⁷⁵. Inicialmente, el acoplamiento aleatorio de radicales libres era el único mecanismo postulado para explicar la biosíntesis de lignanos^{76,77}. Según esta hipótesis, los monolignoles sufrirían un proceso oxidativo, catalizado por una oxidasa, formando así radicales que se unirían entre sí de un modo aleatorio. Por tanto el único paso catalizado por una enzima sería la formación del radical libre. Dado que este acoplamiento podría ocurrir de múltiples maneras (Esq. 12), se formarían mezclas racémicas de diferentes lignanos.

De acuerdo con la hipótesis, no se requeriría ningún otro tipo de enzima adicional para explicar la formación de lignina. El ensamblaje de este biopolímero sería el resultado de la reoxidación de los lignanos y posterior polimerización. Por lo tanto, al contrario que cualquier otro biopolímero, la lignina podría ser duplicada satisfactoriamente *in vitro* a partir del acoplamiento aleatorio de sus correspondientes precursores. No obstante, mediante este mecanismo de ensamblaje aleatorio nunca se ha obtenido una estructura duplicada de la lignina. Tampoco se ha podido explicar el hecho de que se aislen numerosos lignanos con actividad óptica de una amplia variedad de especies vegetales.

Esto indica claramente que algún otro mecanismo bioquímico debe ser el responsable *in vivo* de controlar tanto la regioquímica como la estereoquímica del acoplamiento de los radicales libres.

⁷⁵ Gang D.R., Costa M.A., Fujita M., Dinkova-Kostova A.T., Wang H.-B., Burlat V., Martín W., Sarkanen S., Davin L.B., Lewis N.G. *Chemistry & Biology*, **6** (3), 143-51, (1999)

⁷⁶ Freudenberg K. *Science*, **148** (3670), 595-600, (1965)

⁷⁷ Freudenberg K., in "Constitution and Biosíntesis of Lignin", eds. Freudenberg K. and Neish A.C., Neish, Springer-Verlag, New York, p. 47, (1968)

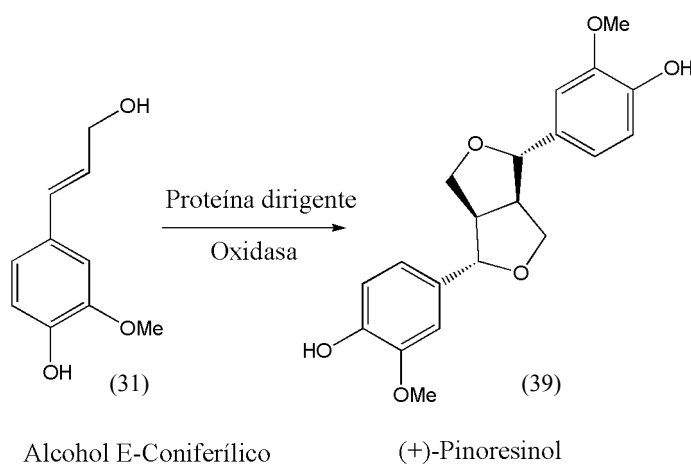
Las investigaciones iniciales sobre este tema se llevaron a cabo con especies del género *Forsythia* debido a que estas plantas son una fuente abundante de los lignanos (+)-pinoresinol (39) y (-)-matairesinol (134).

Al contrario de lo que ocurre en el acoplamiento aleatorio de radicales fenóxido, se vio que fragmentos de tallo de *Forsythia spp.* eran capaces de convertir estereoselectivamente alcohol E-coniferílico (31) en (+)-pinoresinol con un 60% de exceso enantiomérico⁷⁸.

Se ha demostrado que la formación de (+)-pinoresinol *in vitro* a partir del alcohol E-coniferílico es el resultado de la acción conjunta de dos proteínas diferentes¹⁹. La primera de ellas es una proteína de unos 78 kDa, que carece de actividad catalítica por sí misma (como oxidante) y, por lo tanto, es incapaz de transformar el alcohol E-coniferílico en (+)-pinoresinol.

La segunda enzima no cataliza estereoselectivamente el acoplamiento, aunque cataliza la conversión del alcohol coniferílico en la mezcla racémica de los lignanos alcohol deshidrodiconiferílico (36), pinoresinol y guayacilglicerol β-coniferileter (35) en las proporciones 4:2:1, tal como se muestra en el Esquema 12.

Cuando ambas proteínas se encuentran juntas, forman un sistema capaz de catalizar la conversión del alcohol E-coniferílico en (+)-pinoresinol. Así se introdujo el término proteína dirigente (dirigent protein) para describir a la proteína de 78 kDa⁷⁹.



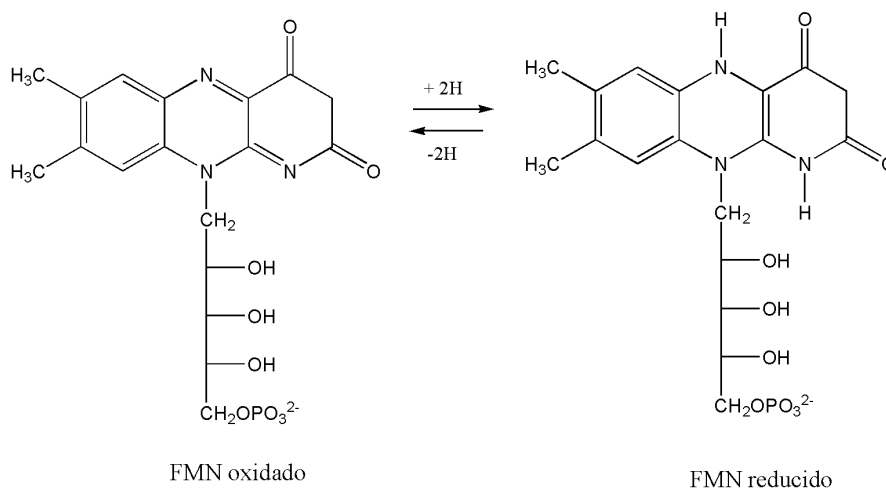
Esquema 33. Acoplamiento estereoselectivo del alcohol coniferílico mediado por la proteína dirigente

⁷⁸ Davin L.B., Bedgar D.L., Katayama T., Lewis N.G. *Phytochemistry*, **31** (11), 3869-74, (1992)

⁷⁹ Davin L.B., Wang H.B., Crowell A.L., Bedgar D.L., Martín D.M., Sarkanen S. and Lewis N.G. *Science*, **275** (5298), 362-6, (1997)

Se cree que la proteína es realmente un trímero que resulta de la glucosilación de una subunidad de 18kDa para dar una subunidad de 26 kDa que entonces es capaz de formar el trímero funcional de 78 kDa.

El acoplamiento estereoselectivo tiene lugar independientemente de si se emplea una oxidasa como la lacasa o un oxidante como FMN (flavina mononucleótido, Esq. 34) conjuntamente con la proteína dirigente. Sólo se ha observado esta estereoselectividad con el alcohol E-coniferílico (31) como sustrato, pero no con los alcoholes E-*p*-cumarílico (32) o E-sinapílico (33).



Esquema 34. FMN oxidado y reducido

FMN (flavina mononucleótido) es el grupo prostético de la NADH deshidrogenasa, un componente de la cadena de transporte electrónico de la mitocondria. Se le considera un nucleótido por la analogía en la secuencia estructural con las unidades que forman los ácidos nucleicos (base nitrogenada-azúcar-fosfato). El FMN puede unirse al AMP dando lugar a otro coenzima denominado flavina-adenina-dinucleótido (FAD) que también es empleado por otras oxidorreductasas.

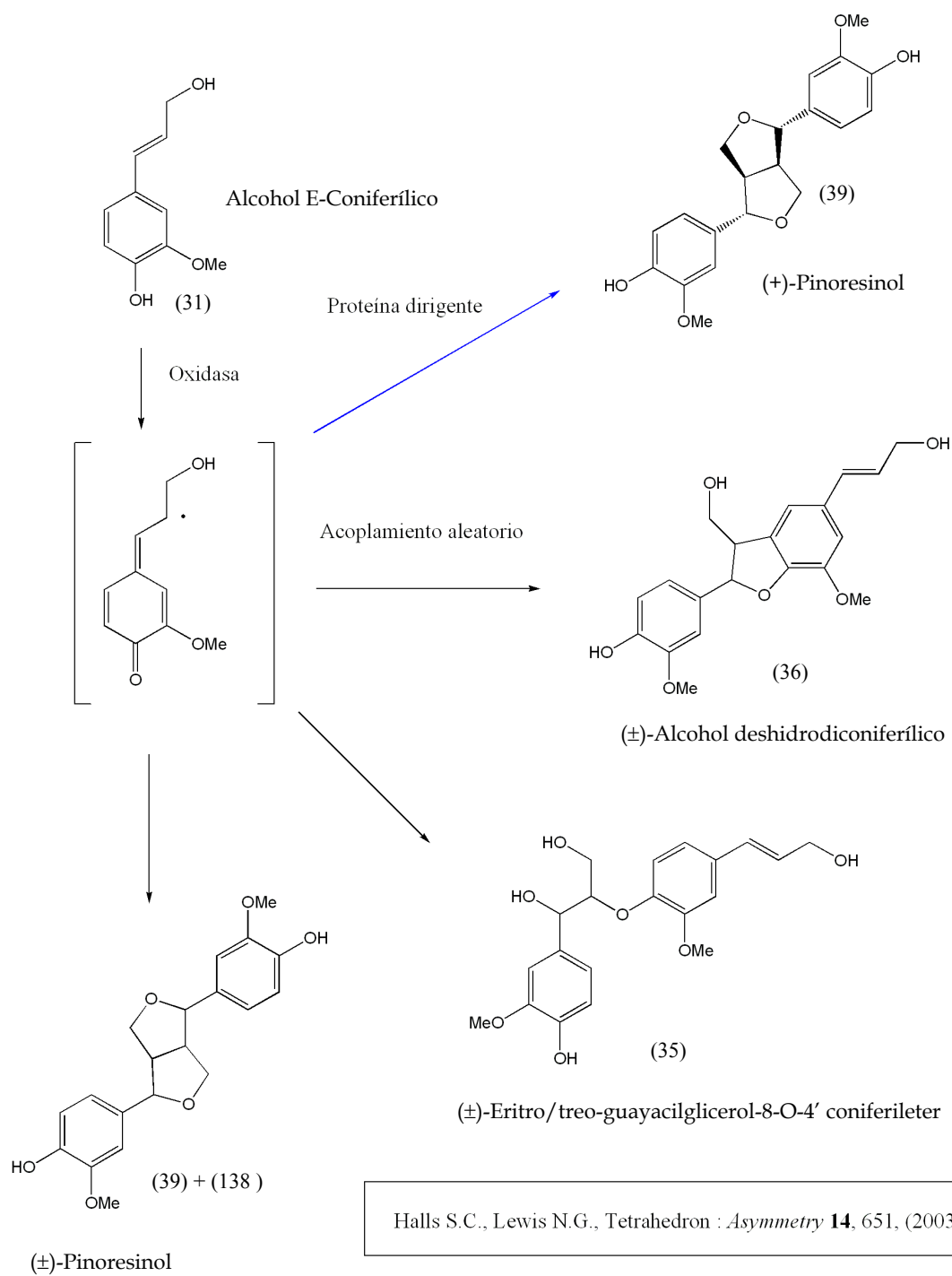
El descubrimiento de las proteínas dirigentes, capaces de determinar tanto la regioselectividad como la estereoquímica del acoplamiento entre los radicales del alcohol E-coniferílico, proporciona una nueva perspectiva para comprender cómo ocurre *in vivo* el control de las reacciones que implican radicales libres.

Estas proteínas han sido identificadas en angiospermas y gimnospermas, tanto a nivel bioquímico como genético y no presentan secuencias homólogas con ningunas otras proteínas de función conocida; por lo tanto, su origen evolutivo es, por el momento, desconocido⁷⁵.

Estos resultados podrían explicarse mediante el siguiente mecanismo⁷⁹: los radicales libres que se formarían a partir del alcohol E-coniferílico, por acción de una oxidasa u oxidante no específico, serían capturados por la proteína dirigente que los orientaría del modo apropiado antes de que tuviera lugar el acoplamiento para formar (+)-pinoresinol (39).

En un mecanismo alternativo, el alcohol E-coniferílico sería orientado por la proteína dirigente antes de que tuviera lugar la oxidación. Dentro de este mecanismo habría a su vez dos posibilidades: podría ser que el papel de la proteína dirigente fuera el de orientar el alcohol E-coniferílico de modo apropiado para el oxidante u oxidasa, o podría existir un mecanismo de transporte de electrones entre el sitio aceptor o sitios aceptores de electrones de la proteína dirigente y el oxidante o la oxidasa.

Ni la velocidad de desaparición del sustrato ni la de aparición del producto se ven afectadas por la presencia de la proteína dirigente. Esto es consistente con el mecanismo de captura de los radicales fenóxido por la proteína dirigente, que afectaría sólo a la estereoselectividad del acoplamiento, mientras que la oxidación del alcohol E-coniferílico por parte del oxidante u oxidasa sería la etapa determinante de la velocidad.



Esquema 35. Acoplamiento aleatorio de radicales y acoplamiento controlado por proteína dirigente.

Metabolismo del pinoresinol

El pinoresinol (39) es un intermedio central en el metabolismo de los lignanos que, dependiendo de la especie vegetal de que se trate, puede ser convertido en un número bastante amplio de productos naturales de importancia fisiológica para la planta y con actividades farmacológicas.

Se ha llevado a cabo un bosquejo de las rutas bioquímicas asociadas a este lignano, empleando para ello varias especies vegetales tales como *Sesamum indicum* (sésamo), *Magnolia kobus*, *Forsythia spp*, *Linum usitatissimum* (lino), *Thuja plicata* (cedro rojo), *Linum flavum* y especies del género *Podophyllum*¹⁹. Conjuntamente, estas especies contienen muchos tipos de lignanos (C₈-C₈) y por lo tanto proporcionan la oportunidad de estudiar la formación de sus distintos esqueletos.

Sesamum indicum

Las semillas de sésamo (*Sesamum indicum* (Pedaliaceae)) son ricas en lignanos furofuránicos de los cuales la (+)-sesamina (116) y la (+)-sesamolina (117), un derivado oxigenado poco frecuente, son los más abundantes. Estos lignanos difieren del (+)-pinoresinol (39) en la presencia de un grupo metilendioxi y en el caso de la (+)-sesamolina en la existencia de un oxígeno entre el anillo furofuránico y uno de sus anillos aromáticos (Esq. 36).

Estos lignanos parecen comportarse fisiológicamente como antioxidantes, ayudando por lo tanto a estabilizar el aceite de la semilla de sésamo protegiéndola de un prematuro envejecimiento^{80,81,82}.



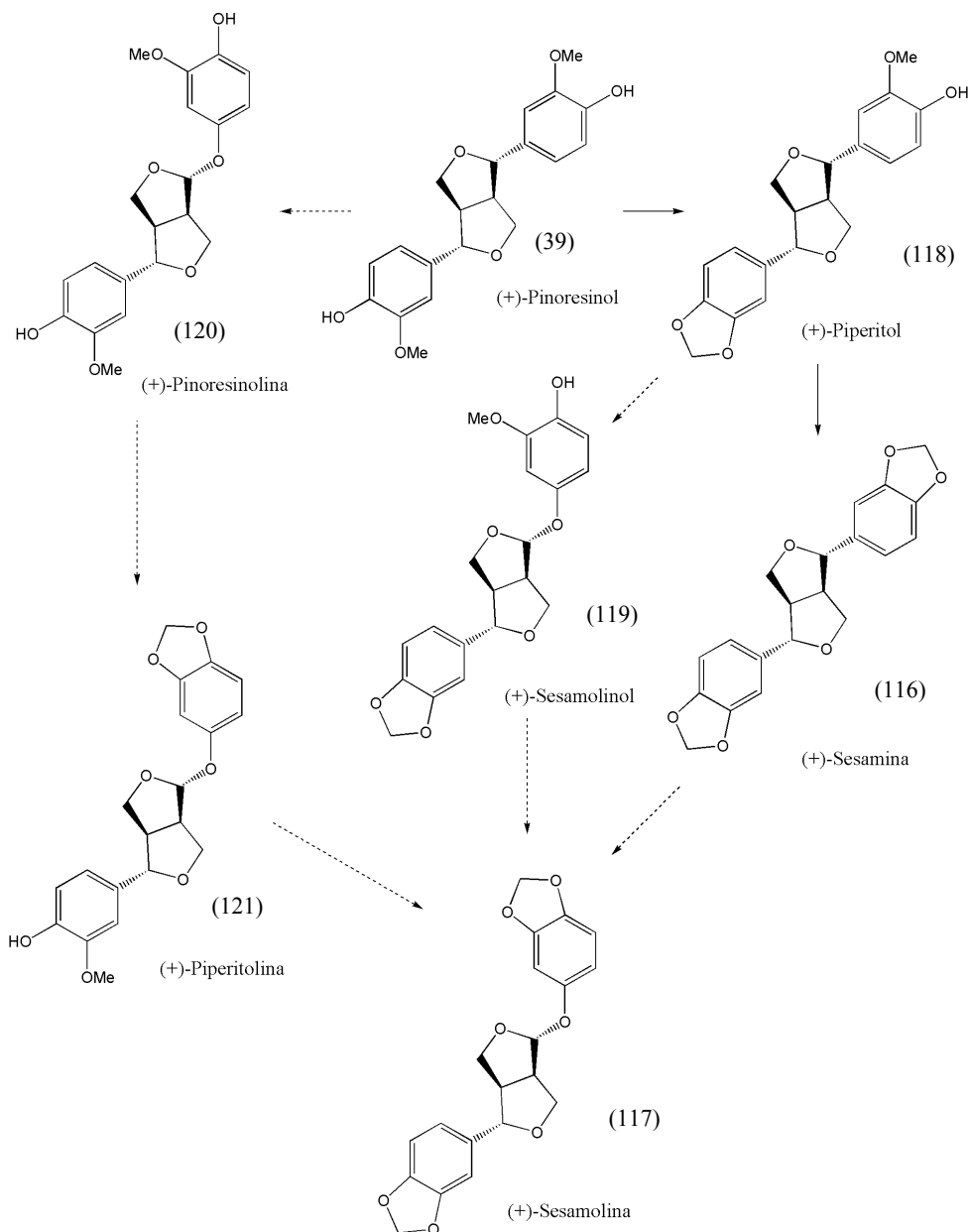
Sesamum indicum L.

⁸⁰ Fukuda Y., Osawa T., Namiki M., Ozaki T. *Agric. Biol. Chem.*, **49** (29), 301-6, (1985)

⁸¹ Fukuda Y., Nagata M., Osawa T., Namiki M. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **63** (8), 1027-31, (1986)

⁸² Osawa T., Nagata M., Namiki M., Fukuda Y. *Agric. Biol. Chem.*, **49** (11), 3351-2, (1985)

Empleando lignanos marcados con isótopos estables y radioactivos se encontró que las semillas maduras sintetizaban *de novo* y enantioespecíficamente (+)-piperitol (118), (+)-sesamina y (+)-sesamolina^{83,84} a partir de (+)-pinoresinol. Así mismo, se observó que al suministrar a las semillas de sésamo ambos enantiómeros del pinoresinol, sólo fue procesada la forma (+). Una posible ruta biosintética para estos lignanos se muestra en el Esquema 36.



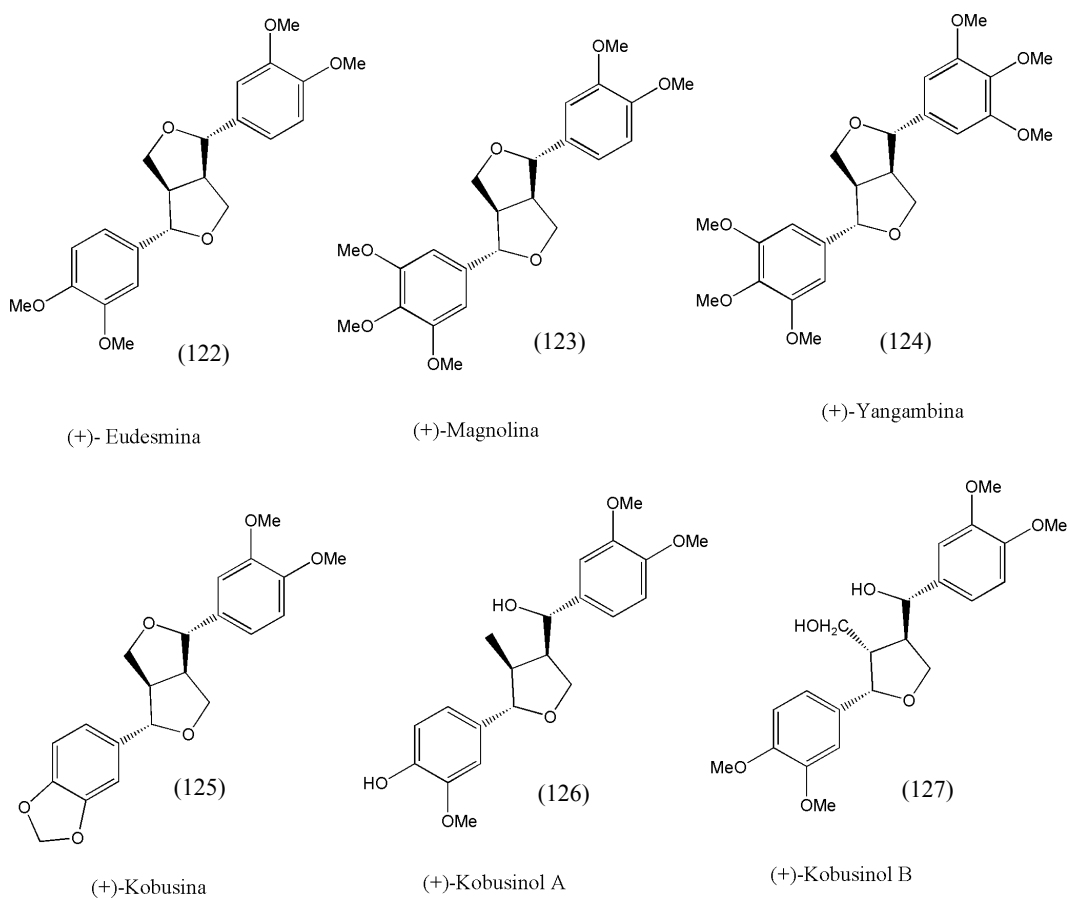
Esquema 36 . Posible ruta biosintética para (+)-sesamolina

⁸³ Kato M.J., Chu A., Davin L.B., Lewis N.G. *Phytochemistry*, **47** (4), 583-91, (1998)

⁸⁴ Jiao Y., Davin L.B., Lewis N.G. *Phytochemistry*, **49** (2), 387-94, (1998)

Magnolia kobus

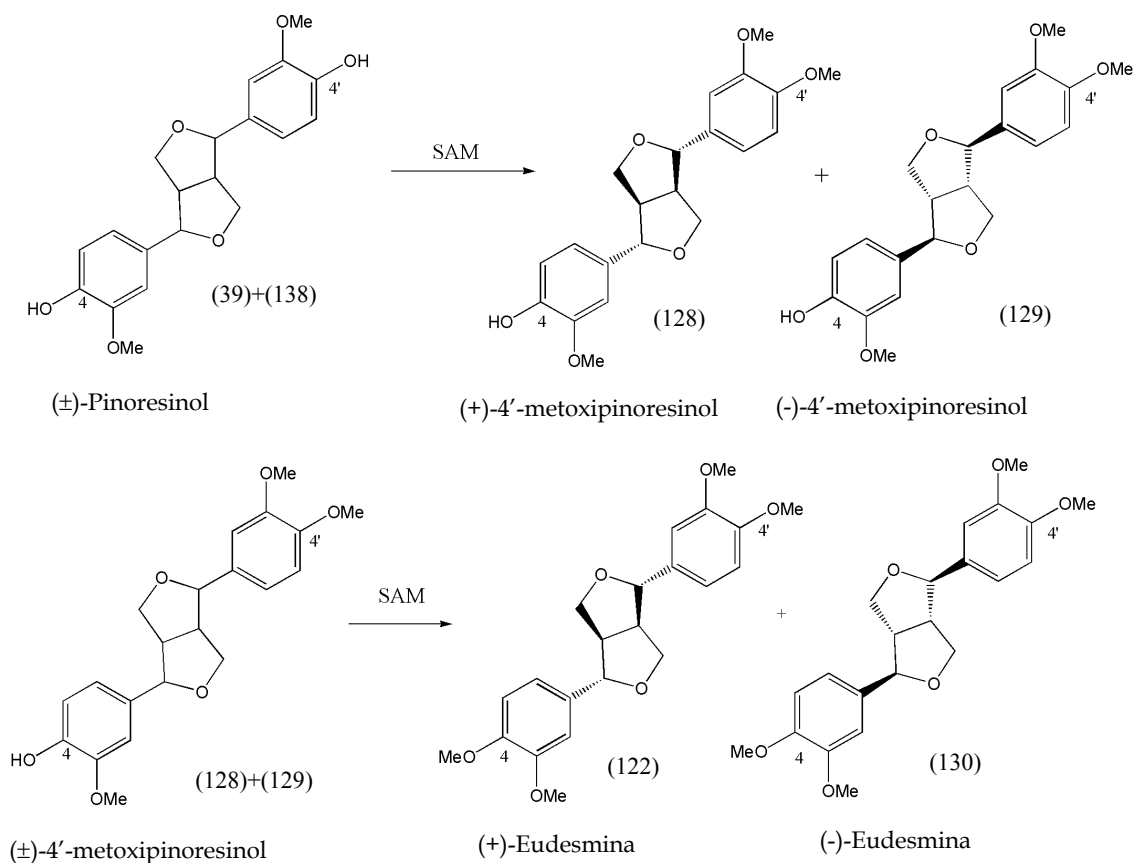
Magnolia kobus var. *borealis* (Magnoliaceae) acumula en sus hojas lignanos furofuránicos y tetrahydrofuránicos tales como la (+)-eudesmina (122), (+)-magnolina (123), (+)- yangambina (124), (+)-kobusina (125), (+)-kobusinoles A (126) y B (127), que difieren del pinosresinol en el grado de metoxilación, en la presencia de grupos metilendioxi en sus anillos aromáticos y en modificaciones reductivas.



Esquema 37. Lignanos de *Magnolia kobus*

Miyauchi et al.⁸⁵ emplearon extractos libres de células procedentes de hojas de *Magnolia kobus* con el objeto de estudiar las lignano *o*-metiltransferasas.

Para averiguar si estas enzimas eran enantioespecíficas o no, incubaron dicho extracto individualmente con pinoresinol racémico y pinoresinol monometileter también racémico (128, 129) en presencia de *S*-adenosilmetionina (SAM) marcada con ¹⁴C. Con (±)-pinoresinol como sustrato se obtuvieron ambos enantiómeros marcados del monometileter del pinoresinol (Esq. 38) en la proporción 3:1 con predominio de la forma (+). Utilizando (±) pinoresinol monometileter como sustrato obtuvieron (+) y (-)-eudesmina (122, 130) en la proporción aproximada de 2:1 con predominio de nuevo de la forma (+). Por tanto, la enzima parece tener una enantioespecificidad limitada o más probablemente el extracto contiene varias *o*-metiltransferasas con diferentes especificidades para cada enantiómero.

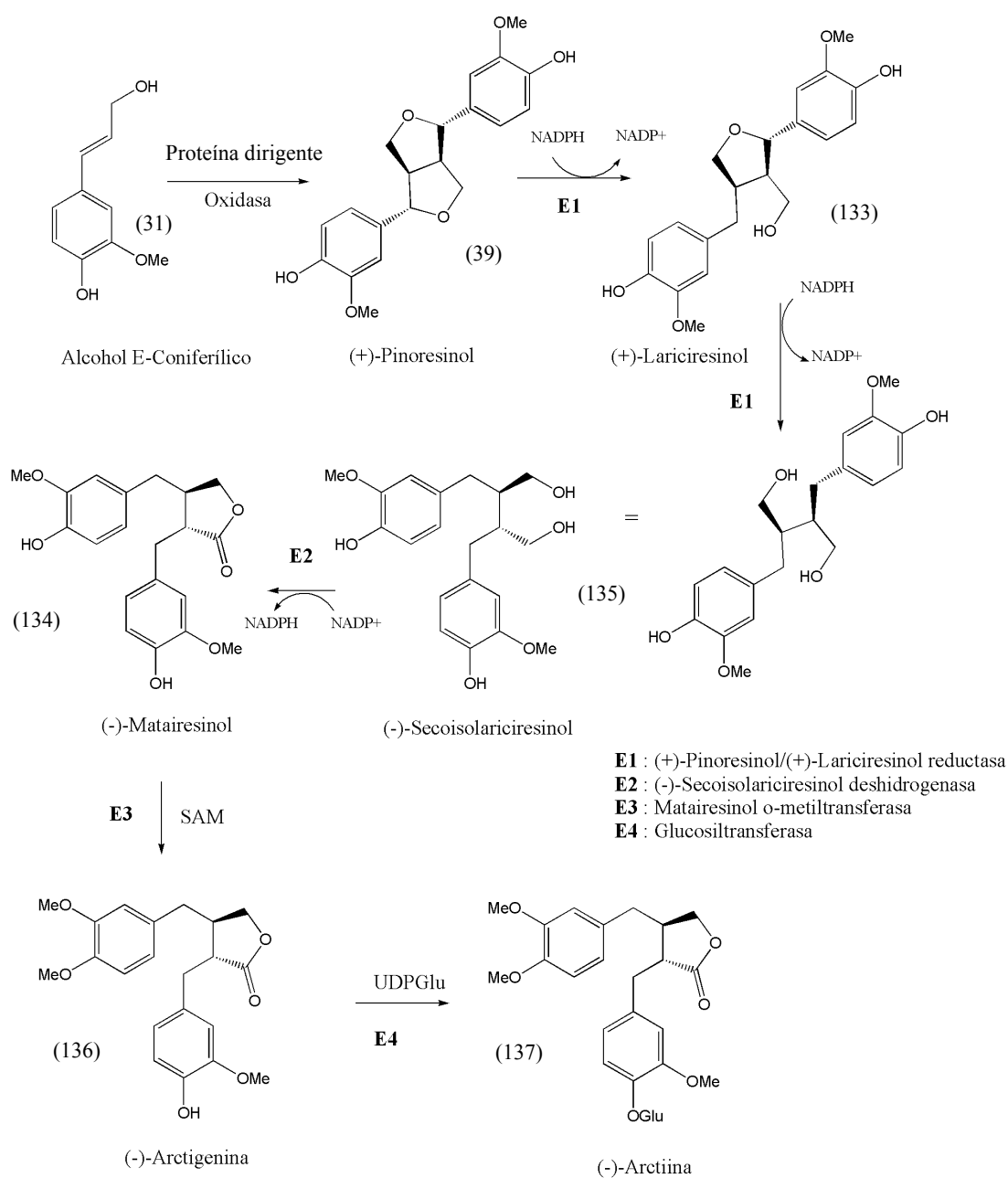


Esquema 38. Experimento de Miyauchi et al.

⁸⁵ Miyauchi T. and Ozawa S. *Phytochemistry*, **47** (4), 665-670, (1998)

Las especies del género *Forsythia*

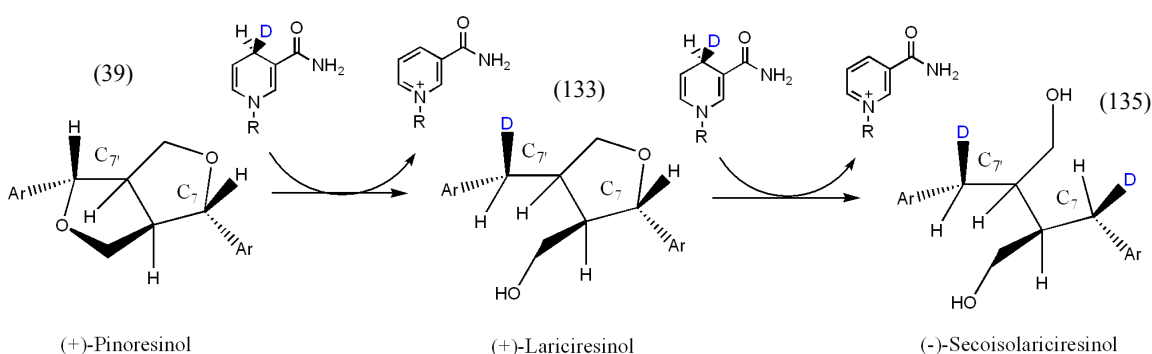
Las especies del género *Forsythia* acumulan varios lignanos en diferentes cantidades: (+)-pinoresinol, (+)-filigenina y (+)-filirina están presentes en *F. suspensa*, mientras que (-)-matairesinol (134), (-)-arctigenina (136) y (-)-arctiina (137) están en *F. viridissima*. El híbrido *F. intermedia* (*F. suspensa* x *F. viridissima*) contiene todos estos lignanos. La ruta biosintética de lignanos definida para especies del género *Forsythia* se muestra en el Esquema 39¹⁹.



Esquema 39. Ruta biosintética de lignanos en *Forsythia* spp.

Como muestra el esquema anterior, (+)-pinoresinol se forma mediante el acoplamiento del alcohol coniferílico asistido por la proteína dirigente. La reducción enantioselectiva de (+)-pinoresinol a (+)-lariciresinol (133) y de éste a (-)-secoisolariciresinol (135) la lleva a cabo la misma enzima dependiente de NADPH: (+)-pinoresinol/(+)-lariciresinol reductasa, de unos 35 kDa.

Como se muestra en el Esquema 40, esta enzima transfiere el hidruro pro-R del anillo de nicotinamida del NADPH a (+)-pinoresinol y (+)-lariciresinol con inversión de las configuraciones en C-7 y C-7' de ambos productos⁸⁶.



Esquema 40. Mecanismo de la (+)-pinoresinol/(+)-lariciresinol reductasa

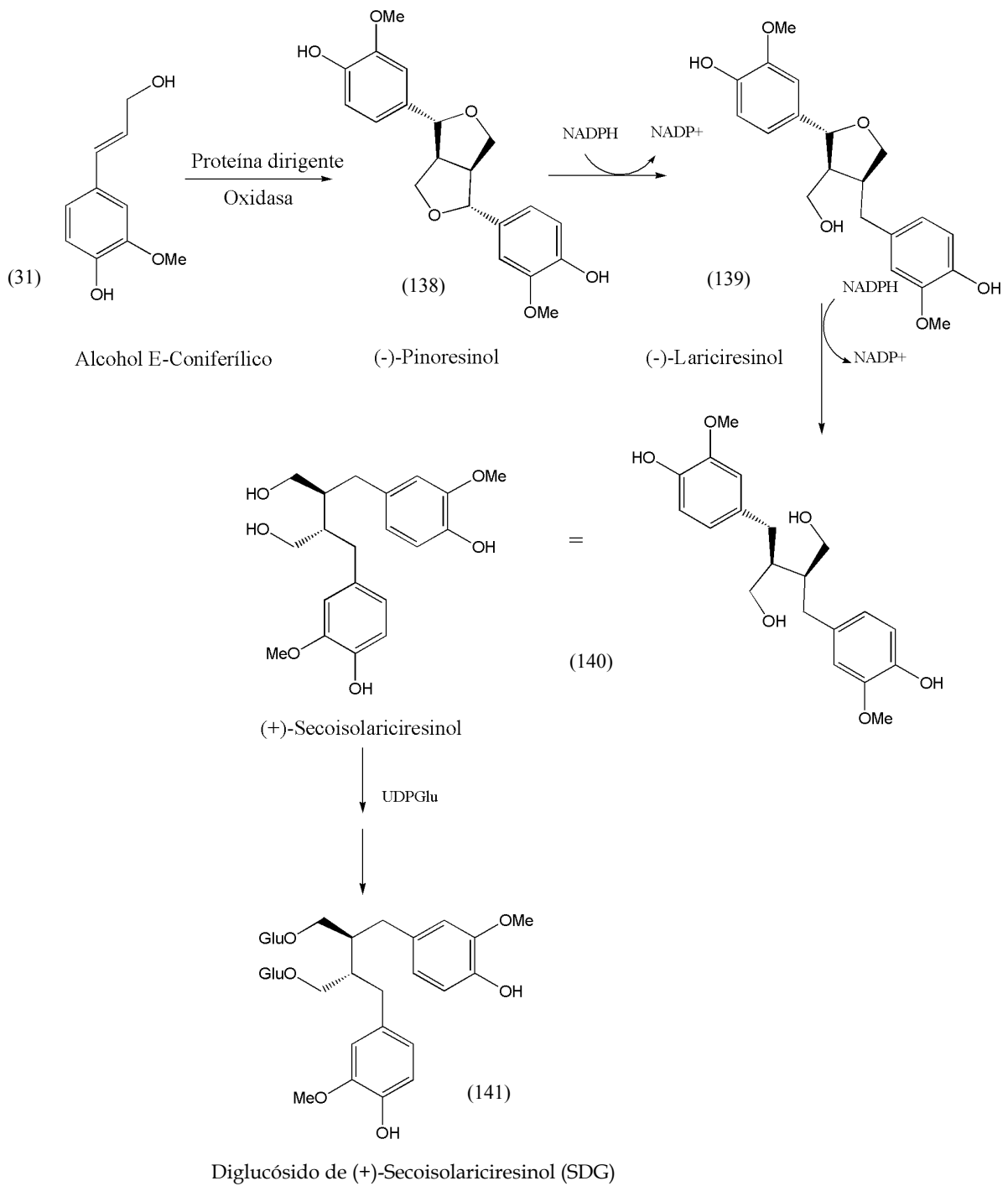
Linum usitatissimum

La semilla del lino (*Linum usitatissimum*, Linaceae) presenta un interés considerable por los altos niveles (3-3.5%) del diglucósido del secoisolariciresinol (SDG) (141) (Esq. 41) que, como se verá más adelante, tiene un importante papel en la dieta, debido a que indirectamente proporciona protección contra los cánceres de mama y próstata. La hidrólisis del diglucósido da lugar únicamente a la forma (+) de la aglicona ((+)-secoisolariciresinol).

En el siguiente esquema se muestra la ruta biosintética propuesta para SDG⁸⁷.

⁸⁶ Dinkova-Kostova A.T., Gang D.R., Davin L.B., Bedgar D. L., Chu A., Lewis N.G. *J. Biol. Chem.*, **271** (46), 29473-82, (1996)

⁸⁷ Ford J.D., Davin L.B. and Lewis N.G., in "Plant Polyphenols 2: Chemistry and Biology", eds. Gross G.G., Hemingway R.W. and Yoshida T, Plenum, New York, (1999)

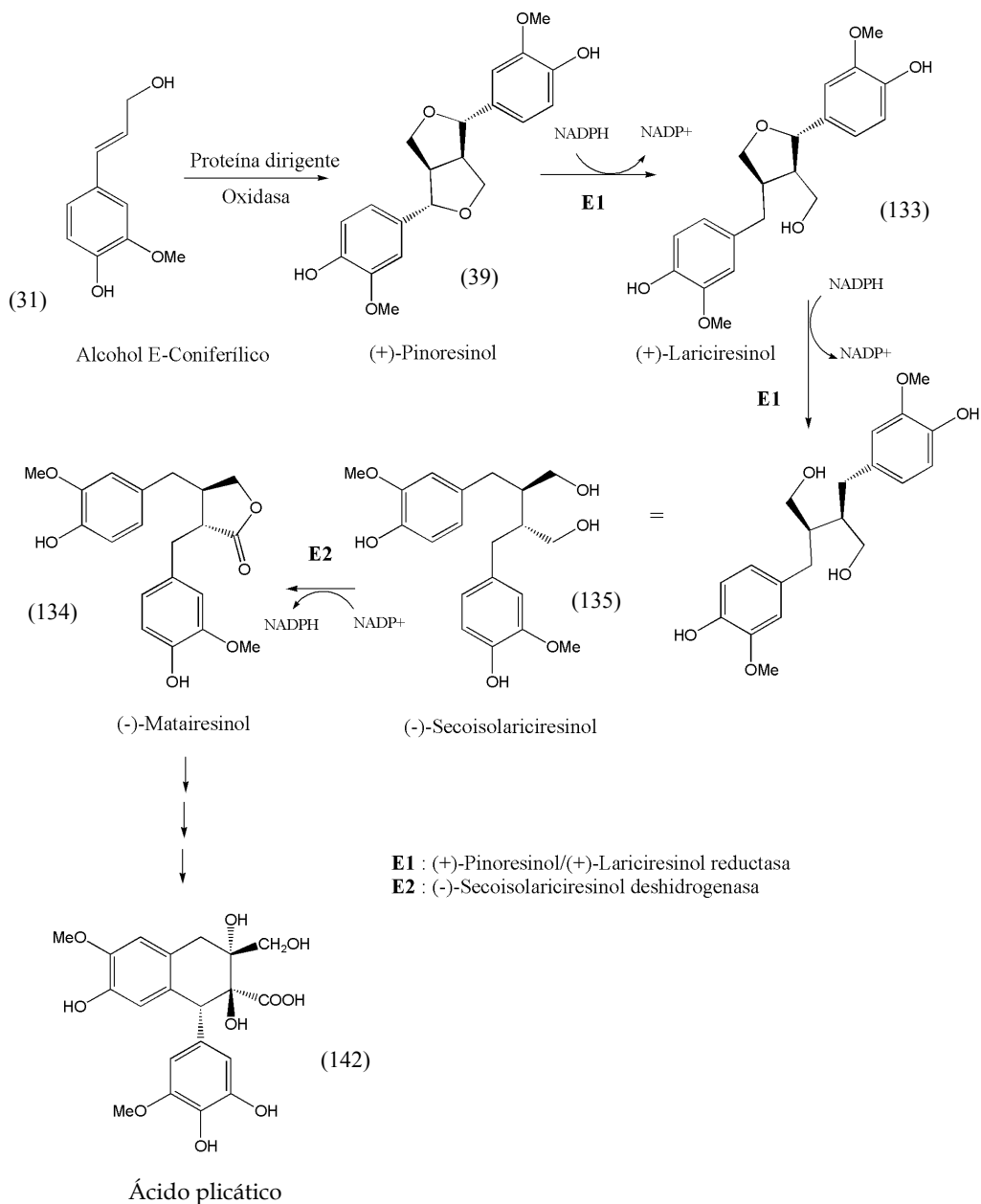


Esquema 41. Biosíntesis de SDG en *Linum usitatissimum*

Thuja plicata

El cedro rojo occidental (*Thuja plicata*), una gimnosperma cuya longevidad puede superar los 3000 años, posee un elevado interés comercial debido al color, durabilidad y textura de su madera. Esto es, en parte, debido a la acumulación masiva de lignanos derivados del ácido plicático (142). Estos metabolitos constituyen entre el 11 y 13% en peso del duramen.

En el Esquema 42 se muestra la ruta biosintética propuesta para el ácido plicático desde el (+)-pinoresinol¹⁹.



Esquema 42. Ruta biosintética para el ácido plicático.

El ácido plicático podría formarse a partir del matairesinol mediante ciclación para formar un ariltetrahidronaftaleno, seguido de hidroxilación tanto en posiciones alifáticas como aromáticas y apertura del anillo lactónico.

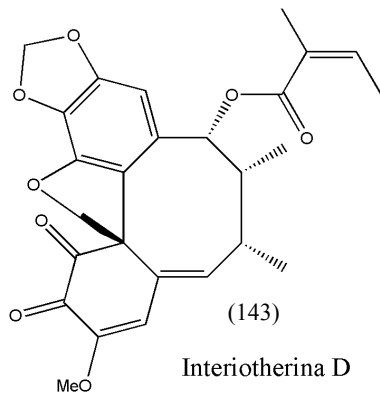
La familia Schizandraceae

Algunos tipos de lignanos parecen estar asociados, aunque no de un modo exclusivo, a determinadas familias o géneros de angiospermas. Así, la familia Schizandraceae presenta los dibencilciclooctenos, un tipo peculiar de lignanos. En la Tabla 1 se muestran algunos ejemplos de estos compuestos, indicándose la especie de la que han sido aislados.

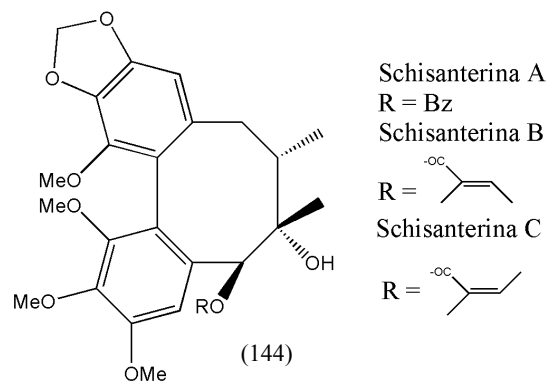
Compuesto	Especie	Ref.
schizarinas B, C, D, E	<i>Kadsura matsudai</i>	88
interiotherinas A, B, C, D (143) angeloilgomisina R, gomisinas A, C, G schisandrina C, kadsurina, neokadsuranina	<i>Kadsura interior</i>	89
kadsulignanos L, M, N	<i>Kadsura coccinea</i>	90
schisanterinas L-O acetilschisanterina L	<i>Kadsura coccinea</i>	91
acetilbinankadsurina A (147) angeloilbinankadsurina A (147) caproilbinankadsurina (147)	<i>Kadsura japonica</i>	92
gomisina N y O (145) gomisina E (146) epigomisina O (145)	<i>Schizandra chinensis</i>	93
pre-gomisina gomisina J (148)	<i>Schizandra chinensis</i>	94
angeloilgomisina H tigloilgomisina H benzoilgomisina H	<i>Schizandra chinensis</i>	95
schisanterinas A, B, C (144), D y E	<i>Schizandra sphenanthera</i>	96

Tabla 1. Lignanos de Schizandraceae

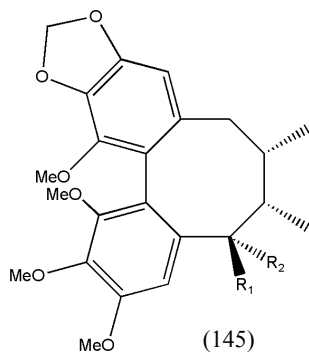
- ⁸⁸ Kuo Y.-H., Wu M.-D., Huang R.-L., Li S.-Y., Huang H.-C., Lee K.-H. *Journal of Natural Products*, **64** (4), 487-90, (2001)
- ⁸⁹ Chen D.-F., Zhang S.-X., Kozuka M., Sun O.-Z., Feng J., Wang O., et al. *Journal of Natural Products*, **65** (9), 1242-5, (2002)
- ⁹⁰ Liu J.-S., Li L. *Phytochemistry*, **38** (1), 241-5, (1995)
- ⁹¹ Liu J.-S., Li L. *Phytochemistry*, **32** (5), 1293-6, (1993)
- ⁹² Ookawa N., Ikeya Y., Taguchi H., Yosioka I. *Chem. Pharm. Bull.*, **29** (11), 123-7, (1981)
- ⁹³ Ikeya Y., Taguchi H., Yosioka I., Kobayashi H. *Chem. Pharm. Bull.*, **27** (11), 2695-709, (1979)
- ⁹⁴ Ikeya Y., Taguchi H., Yosioka I., Kobayashi H. *Chem. Pharm. Bull.*, **27** (7), 1583-8, (1979)
- ⁹⁵ Ikeya Y., Taguchi H., Yosioka I. *Chem. Pharm. Bull.*, **26** (1), 328-31, (1978)
- ⁹⁶ Liu C.-S., Fang S.-D., Huang M.-F., Kao Y.-L., Hsu J.-S. *Scientia Sinica*, **21** (4), 483-502, (1978)



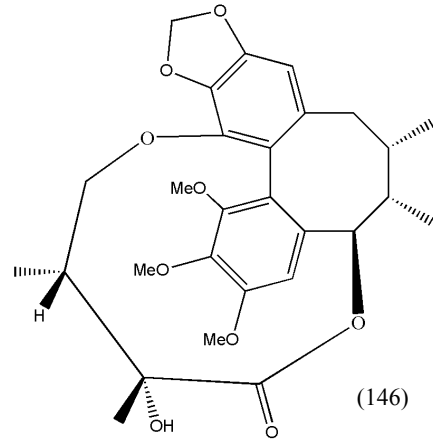
(*Kadsura interior*)



(*Shizandra sphenanthera*)

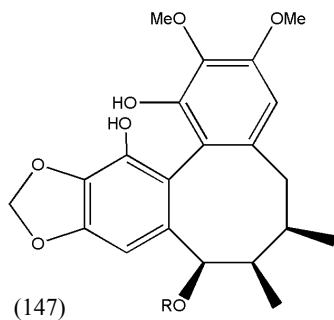


Gomisina N Gomisina O Epigomisina O
R1 = R2 = H R1 = OH, R2 = H R1 = H, R2 = OH
(*Schizandra chinensis*)



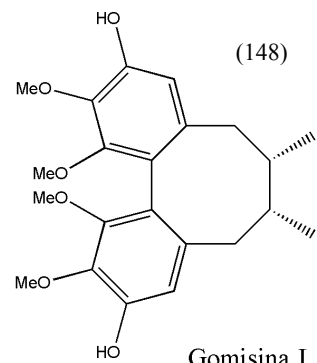
Gomisina E

(*Schizandra chinensis*)



(*Kadsura japonica*)

Acetilbinankadsurina A
R = Ac
Angeloilbinankadsurina A
R = OCCMe = CHMe
Caproilbinankadsurina
R = OC(CH₂)₄Me

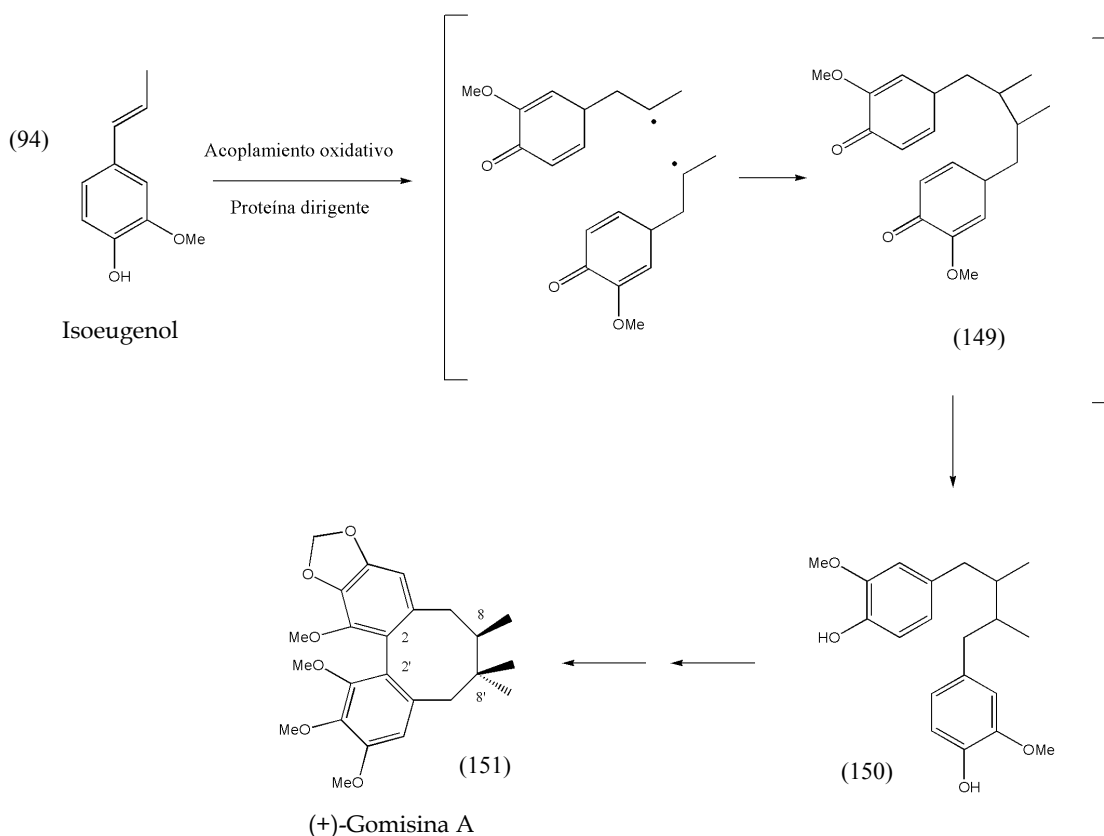


Gomisina J

(*Schizandra chinensis*)

Esquema 43. Lignanos de Schizandraceae

(+)-Gomisina A (151) (Esq. 44), sustancia aislada de *Schizandra chinensis*^{97,98}, parece derivar del acoplamiento estereoselectivo catalizado por proteínas dirigentes del isoeugenol (94). Inicialmente se formaría una quinona doble (149) que, mediante una reductasa, formaría el correspondiente dibencilbutano (150). Este último, o algún equivalente, podría sufrir la ciclación entre C₂ y C_{2'}, formándose así un anillo de 8 miembros. Las hidroxilaciones, metilaciones y formación de grupos metilendioxi serían los pasos posteriores que conducirían a (+)-gomisina A¹⁹.



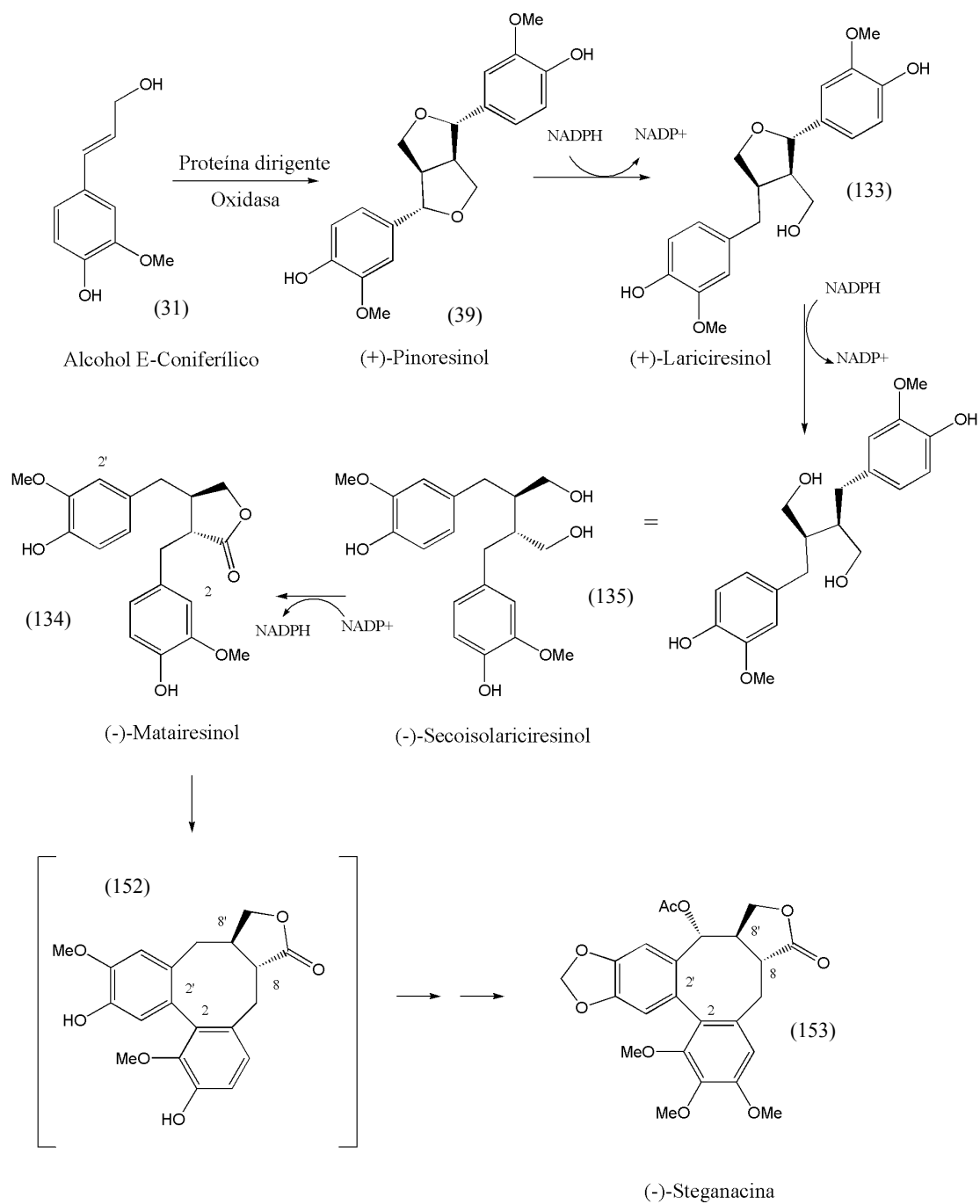
Esquema 44. Biosíntesis de (+)-gomisina A

(-)-Steganacina (153) (Esq. 45) es un lignano de este tipo presente en *Steganotaenia araliaceae*⁹⁹ (Apiaceae=Umbelliferae). Según Lewis et al.¹⁹, la formación de este lignano ópticamente activo resultaría del acoplamiento asistido por la proteína dirigente del alcohol coniferílico para dar (+)-pinoresinol que sería metabolizado a (-)-matairesinol, o una butirolactona equivalente, que luego sufriría la ciclación entre C₂ y C_{2'}. Las modificaciones posteriores conducirían a (-)-steganacina.

⁹⁷ Taguchi H. and Ikeya Y. *Chem. Pharm. Bull.*, **23** (12), 3296-8, (1975)

⁹⁸ Taguchi H. and Ikeya Y. *Chem. Pharm. Bull.*, **25** (2), 364-6, (1977)

⁹⁹ Kupchan S.M., Britton R.W., Ziegler M.F., Gilmore C.J., Restivo R.J. and Bryan R.F. *J. Am. Chem. Soc.*, **95** (4), 1335-6, (1973)



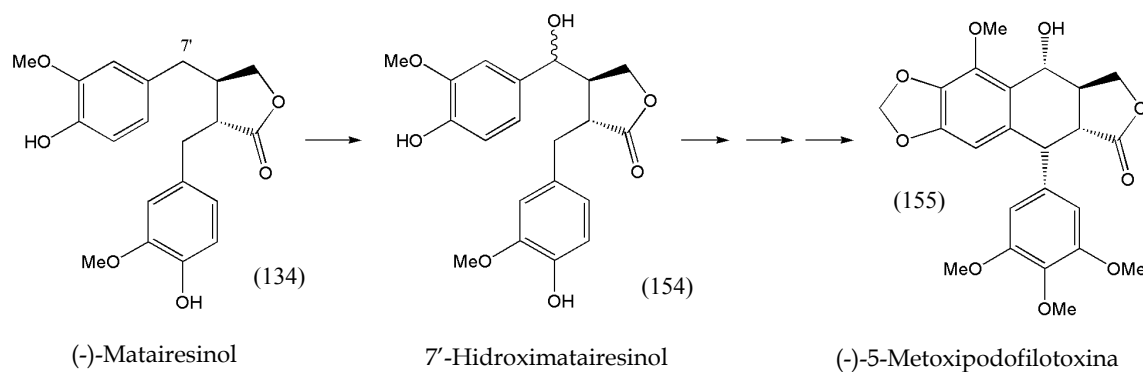
Esquema 45. Biosíntesis de (-)-steganacina

Podophyllum peltatum y *Linum flavum*: podofilotoxina

Podofilotoxina (12), aislada de especies del género *Podophyllum* (Berberidaceae) y 5-metoxipodofilotoxina (155), aislada de *Linum flavum*, son agentes antitumorales y antivíricos muy importantes. Debido a la limitada disponibilidad de los rizomas de *Podophyllum*, existe un considerable interés en establecer su ruta biosintética con el objeto de poder explotarla biotecnológicamente¹⁰⁰.

Estudios preliminares sugieren que (-)-matairesinol (134), cuya ruta biosintética ha sido rigurosamente establecida para especies del género *Forsythia*¹⁰⁰ (Esq. 39), podría ser el precursor de la podofilotoxina¹⁰¹.

Xia et al.¹⁰⁰ han demostrado que la ruta metabólica que conduce a (-)-matairesinol en *L. flavum* es la misma que la descrita para *Forsythia intermedia*. Este metabolito es hidroxilado en la posición 7' para dar 7'-hidroximatairesinol (154) que es luego convertido a 5-metoxipodofilotoxina (Esq. 46).



Esquema 46. Biosíntesis de 5-metoxipodofilotoxina

¹⁰⁰ Xia Z.-Q., Costa M.A., Proctor J., Davin L.B., Lewis N.G. *Phytochemistry*, **55** (6), 537-49, (2000)

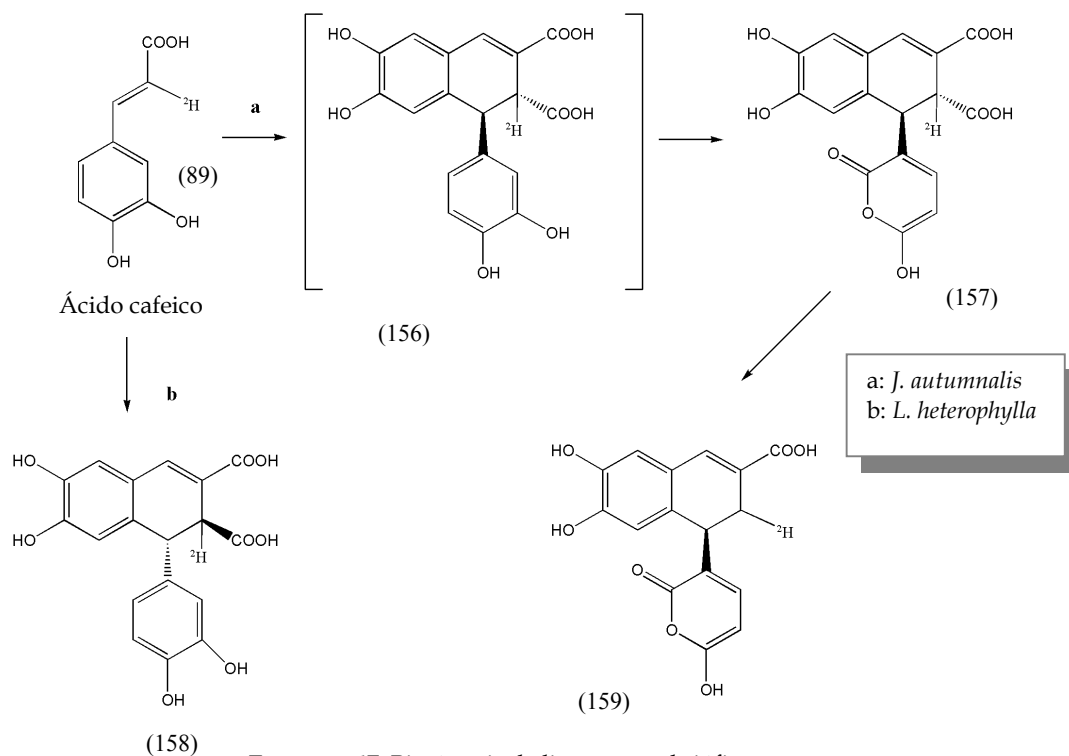
¹⁰¹ Broomhead A.J., Rahman M.M.A., Dewick P.M., Jackson D.E., Lucas J.A. *Phytochemistry*, **30** (5), 1489-92, (1991)

Biosíntesis de lignanos en briófitos

Como ya se ha visto, varios lignanos han sido aislados de hepáticas (*Jamesoniella autumnalis*, *Pellia epiphylla* y *Scapania undulata*). Se cree que estos lignanos son biosintetizados a partir del ácido cafeico (89), una unidad fenólica común en hepáticas. Muchos de ellos son ópticamente activos como es el caso de las estructuras 156, 157, 158, 159 mostradas en el Esquema 47 y aisladas de los gametofitos de *Pellia epiphylla*³⁸.

Esto sugiere que hay un mecanismo de control de la estereoquímica en la biosíntesis de lignanos en hepáticas que puede ser similar al de las plantas vasculares, diferenciándose en la naturaleza del precursor¹⁰².

Tazaki et al.¹⁰² suministraron ácido cafeico marcado con deuterio [8-²H] a los gametofitos de *Jamesoniella autumnalis* y tras 28 días de incubación aislaron dos derivados oxigenados de lignanos marcados: (+)-jamesopirona (157) y scapaniapirona (159) (Esq. 47). En un experimento similar con *Lophocolea heterophylla* fue aislado el compuesto 158. Basándose en estos resultados, los autores han propuesto una ruta biosintética para la síntesis de estos lignanos en *J. autumnalis* y *L. heterophylla*.



Esquema 47. Biosíntesis de lignanos en briófitos.

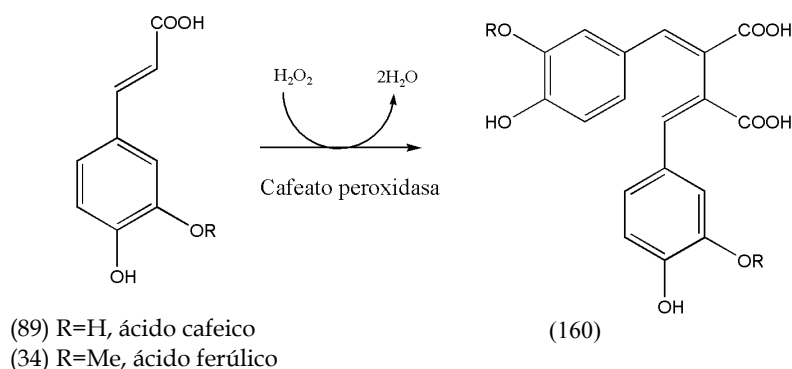
¹⁰² Tazaki H., Hayashida T., Ishikawa F., Taguchi D., Takasawa T., Nabeta K. *Tetrahedron Letters*, **40** (1), 101-4, (1999)

En *J. autumnalis* el compuesto 156 se forma a partir del ácido cafeico, la oxidación del resto dihidroxifenilo de 156 conduce a 157 que sufre una posterior descarboxilación para dar 159. Los autores consideran que la dificultad para aislar 156 en esta hepática radica en que su oxidación para dar 157 es muy rápida. Por otra parte, el compuesto 158 se forma a partir del ácido cafeico en *L. heterophylla*.

Además, los autores demostraron que incubando extractos libres de células de ambas especies de hepáticas y en presencia de H_2O_2 , se obtiene los compuestos 156 y 158 a partir del ácido cafeico. Esto demuestra claramente que estos compuestos se biosintetizan *de novo* y dado que no se forman sin H_2O_2 , la enzima responsable de su formación debe ser una peroxidasa.

Resulta interesante el hecho de que estas hepáticas formen un lignano arildihidronaftalénico directamente a partir del ácido cafeico, mientras que como hemos visto en *Forsythia intermedia* y otras plantas vasculares la formación del pinoresinol, un lignano furofuránico, a partir del alcohol (*E*)-coniferílico es el primer paso en la biosíntesis de lignanos.

No obstante, también se conocen peroxidases en plantas vasculares que son capaces de biosintetizar lignanos de un modo análogo al que hemos visto en hepáticas. Un ejemplo es la cafeato peroxidasa descubierta por Frías et al.¹⁰³ Esta enzima aislada de *Bupleurum salicifolium* (Apiaceae) es capaz de catalizar la dimerización del ácido ferúlico o cafeico mediante acoplamiento oxidativo.



Esquema 48. Cafeato peroxidasa de *Bupleurum salicifolium*

¹⁰³ Frías I., Siverio J.M., González C., Trujillo J.M., Pérez J.A. *Biochem. J.*, **273** (Pt 1), 109-13, (1991)

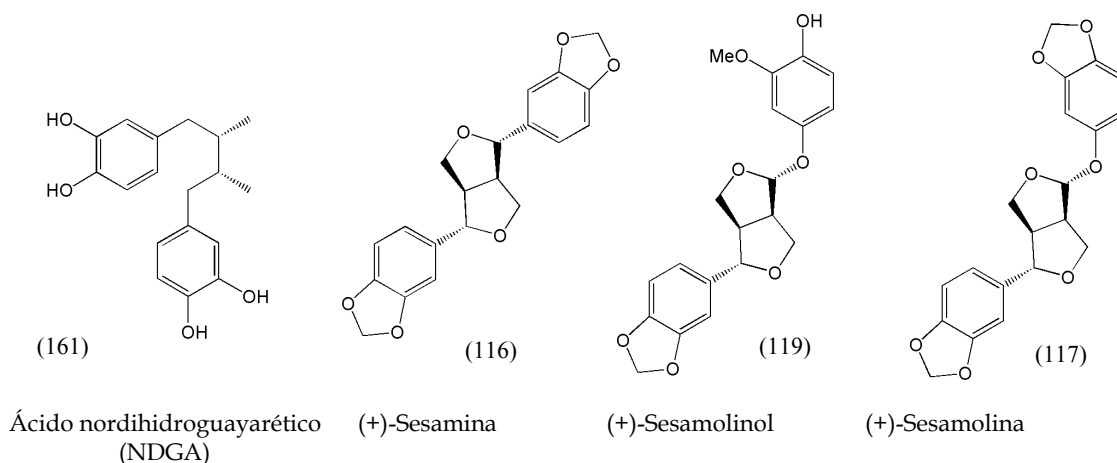
Funciones fisiológicas en las plantas

Aunque la asignación de funciones fisiológicas a estos compuestos dentro de la planta es un campo de investigación bastante poco desarrollado, se conocen varios ejemplos, la mayoría de los cuales están relacionados con funciones defensivas: actividades antioxidante, fungicida, antibacteriana, insecticida, nematocida, antialimentaria, alelopática y similar a las citoquininas.

Los lignanos también son, al menos en parte, responsables de las propiedades de durabilidad, calidad, color y textura de la madera noble de ciertas especies. Esto es consecuencia de la acumulación masiva de lignanos a nivel del duramen.

Propiedades antioxidantes

El ácido nordihidroguayarético (161) (NDGA) (Esq. 49), principal componente del exudado resinoso de *Larrea tridentata*, es uno de los más potentes antioxidantes conocidos^{104,105,106}. Este lignano es un inhibidor competitivo de la lipoxidasa, una enzima directamente implicada en la autooxidación de los ácidos grasos insaturados durante el procesamiento de vegetales y semillas. NDGA fue un antioxidante comúnmente usado en varios alimentos hasta 1972 en que se descubrió que tenía efectos tóxicos sobre el riñón.



Esquema 49. Lignanos con actividad antioxidante

¹⁰⁴ Lundberg W.O., Halvorson H.O. and Burr G.O. *Oil and Soap*, **21**, 33-5, (1944)

¹⁰⁵ Oliveto E.P. *Chem. Ind.*, (17), 677-9, (1972)

¹⁰⁶ Yasumoto K., Yamamoto A. and Mitsuda H. *Agric. Biol. Chem.*, **34** (8), 1162-8, (1970)

El NDGA se sigue empleando actualmente como estabilizador en otros productos no alimenticios tales como polímeros, gomas, perfumes y reactivos fotográficos.

Otros lignanos como sesamolina (117), sesamina (116) y sesamolinal (119) (Esq. 49) del sésamo (*Sesamum indicum*) muestran una menor, pero aún elevada, actividad antioxidante^{81,82}.

Se cree que esta es la razón por la que varias plantas productoras de semillas oleaginosas, tales como el lino o el sésamo, contienen altos niveles de lignanos que contribuyen a proteger los componentes lipídicos frente a la oxidación.

Actividad antifúngica

Muchos lignanos presentan actividad antifúngica y hay evidencias que sugieren que son producidos por los vegetales en respuesta al ataque por hongos, pudiendo desempeñar algún papel en la prevención de la degradación de la madera²⁰.

La infección de *Picea abies* por el hongo *Fomes annosus* induce la acumulación de altos niveles de (-)-matairesinol (134), 7'-hidroximatairesinol (154), α -conidendrina (166) (Esq. 50) y liovilo (164)^{16,19}. Esta observación puede ayudar a explicar la masiva acumulación de lignanos en *Thuja plicata* que, junto con las tropolonas, confieren protección a estas longevas plantas que pueden vivir más de 3000 años¹⁹.

Las especies del género *Prunus* producen isoliovilo (165) tras ser infectadas por hongos; *Liriodendron tulipifera* produce siringaresinol y su dimetileter¹⁶.

Terminalia bellerica (Combretaceae) es una planta medicinal tradicional de la India, de la que se ha aislado termilignano (162) y (-)-tannilignano (163) (Esq. 50), que tienen una actividad potente contra el hongo *Penicillium expansum*¹⁰⁷.

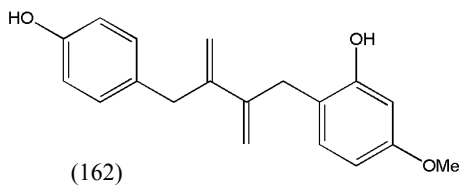
De *Podophyllum hexandrum* se han aislado 4'-O-desmetildeshidropodofilotoxina (167) y picropodofilona (168) que presentan actividad antifúngica contra *Epidermophyton floccosum*, *Curvularia lunata*, *Nigrospora oryzae*, *Microsporum canis*, *Allescheria boydii* y *Pleurotus ostreatus*¹⁰⁸.

¹⁰⁷ Valsaraj R., Pushpangadan P., Smitt U.W., Adersen A., Christensen S.B., et al. *J. Nat. Prod.*, **60** (7), 739-42, (1997)

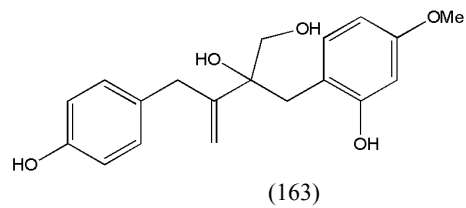
¹⁰⁸ Rahman A., Ashraf M., Choudhary M.I., Rehman H. and Kazmi M.H. *Phytochemistry*, **40** (2), 427-31, (1995)

En respuesta a la infección por *Fusarium solani*¹⁰⁹, *Cercidiphyllum japonicum* produce magnolol (45) que también es efectivo contra *Aspergillus niger* y *Tricophyton mentagrophytes*.

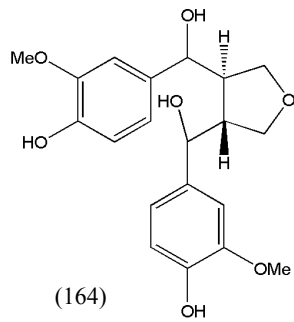
En parte, la actividad antifúngica de los lignanos se atribuye a la inhibición que ejercen sobre enzimas fúngicas extracelulares: celulasa, poligalacturonasa, aril- β -glucosidasa y laccasa¹¹⁰.



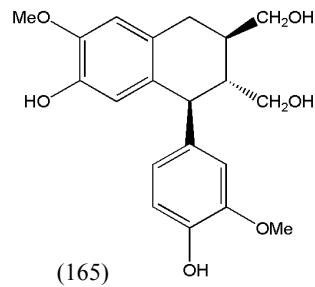
Termilignano



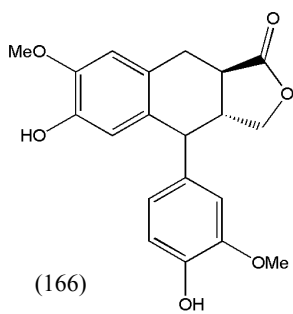
(-)-Tannilignano



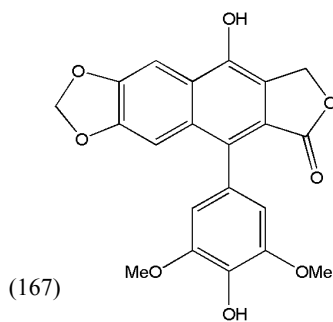
Liovilol



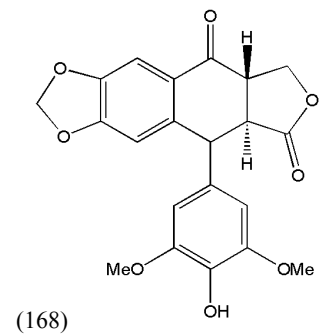
Isoliovilol



(-)- α -Conidendrina



4'-O-desmetildeshidropodofilotoxina



Esquema 50. Lignanos con actividad antifúngica

¹⁰⁹ Takasugi M., Katui N. *Phytochemistry*, **25** (12), 2751-2, (1986)

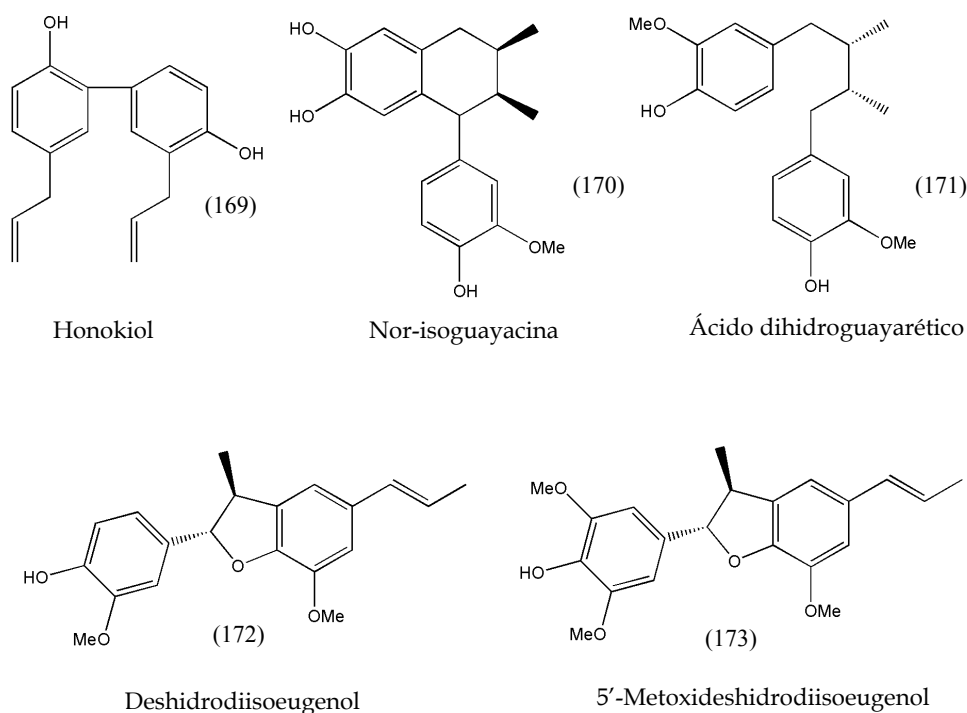
¹¹⁰ Takemoto T., Miyase T., Kusano G. *Phytochemistry*, **14** (8), 1890-1, (1975)

Actividad antibacteriana

Los lignanos también presentan actividad como antibacterianos: magnolol (45) y honokiol (169) (Esq. 51) inhiben el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Mycobacterium smegmatis* con una CMI de 5-10 $\mu\text{g/ml}$ que es comparable o incluso mejor que la actividad del sulfato de estreptomicina (CMI = 10, 10 y 2.5 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente)¹¹¹.

El ácido dihidroguayarético (171) y la nor-isoguayacina (170) (Esq. 51) inhiben el crecimiento de especies del género *Streptococcus* y de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y, en el caso de la nor-isoguayacina, también de *Pseudomonas aeruginosa*²⁰.

Los extractos de *Myristica fragrans* se utilizan en Sri Lanka para la prevención de la caries dental. Deshidrodiisoeugenol (172) (licarina A) y 5'-metoxideshidrodiisoeugenol (173) han sido identificados como sus principales componentes con actividad antimicrobiana. Ambos inhiben el crecimiento de *Streptococcus mutans*, principal responsable de esta patología, a concentraciones de 12.5 $\mu\text{g/ml}$ ¹¹².



Esquema 51. Lignanos con actividad antibacteriana

¹¹¹ Clark A.M., El-Feraly F.S. and Li W.S. *J. Pharm. Sci.*, **70** (8), 951-2, (1981)

¹¹² Hattori M., Hada S., Watahiki A., Ihara H., Shu Y.Z., Kakiuchi N., Mizumo T. and Namba T. *Chem. Pharm. Bull.*, **34** (9), 3885-93, (1986)

Actividad insecticida

(+)-Haedoxano A (174) (Esq. 52), aislado de las raíces de *Phyrma leptostachya*, es quizás el lignano con propiedad insecticida mejor conocido^{113,114,115,116}. En combinación con butóxido de piperonilo, que ejerce una acción sinérgica, posee una excelente actividad insecticida al ser administrado a larvas de lepidópteros y de *Musca domestica*, DL₅₀ = 0.25 ng/mosca, que es comparable a la actividad de productos comerciales sintéticos. Sus efectos fisiológicos son relajación muscular, cese de la alimentación, parálisis generalizada y muerte, causando por lo tanto efectos similares a las neurotoxinas de insectos nereistoxina, rianodina y reserpina.

La Tabla 2 muestra varios lignanos con actividad insecticida, la especie vegetal de la que se aíslan y los insectos sobre los que tienen actividad.

Lignano	Especie vegetal	Larva del insecto	Ref.
Licarina B (175)	<i>Myristica fragrans</i>	<i>Bombyx mori</i>	117
Sesamina (116)	<i>Sesamum indicum</i>	(gusano de seda)	118
Kobusina (125)			33
Magnolol (45)	<i>Magnolia virginiana</i>	<i>Aedes aegypti</i>	119
Compuesto 176		(mosquito transmisor de la fiebre amarilla y dengue)	
Compuesto 177			
(+)-Epimagnolina A (178)	<i>Magnolia fargesii</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	120
		(mosca del vinagre)	
Licarina A	<i>Machiulus japonica</i>	<i>Spodoptera litura</i>	121
(-)-Machilusina (179)		(Lepidóptero)	
Compuesto 180		(gusano gris del tabaco)	
Compuesto 181			
(+)-Sesamina (116)	<i>Sesamum indicum</i>	<i>Oncopeltus fasciatus</i>	122
(+)-Sesamolina (117)		(Hemíptero fitófago)	

Tabla 2. Actividad insecticida de varios lignanos

¹¹³ Taniguchi E., Imamura, K., Ishibashi F., Matsui T., and Nishio A. *Agric. Biol. Chem.*, **53** (3), 631-43, (1989)

¹¹⁴ Yamauchi S., Ishibashi F. and Taniguchi E. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56** (11), 1760-8, (1992)

¹¹⁵ Yamauchi S. and Taniguchi E. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56** (11), 1744-50, (1992)

¹¹⁶ Yamauchi S. and Taniguchi E. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56** (11), 1751-9, (1992)

¹¹⁷ Isogai A., Murakoshi S., Suzuki A. and Tamura S. *Agric. Biol. Chem.*, **37** (4), 889-95, (1973)

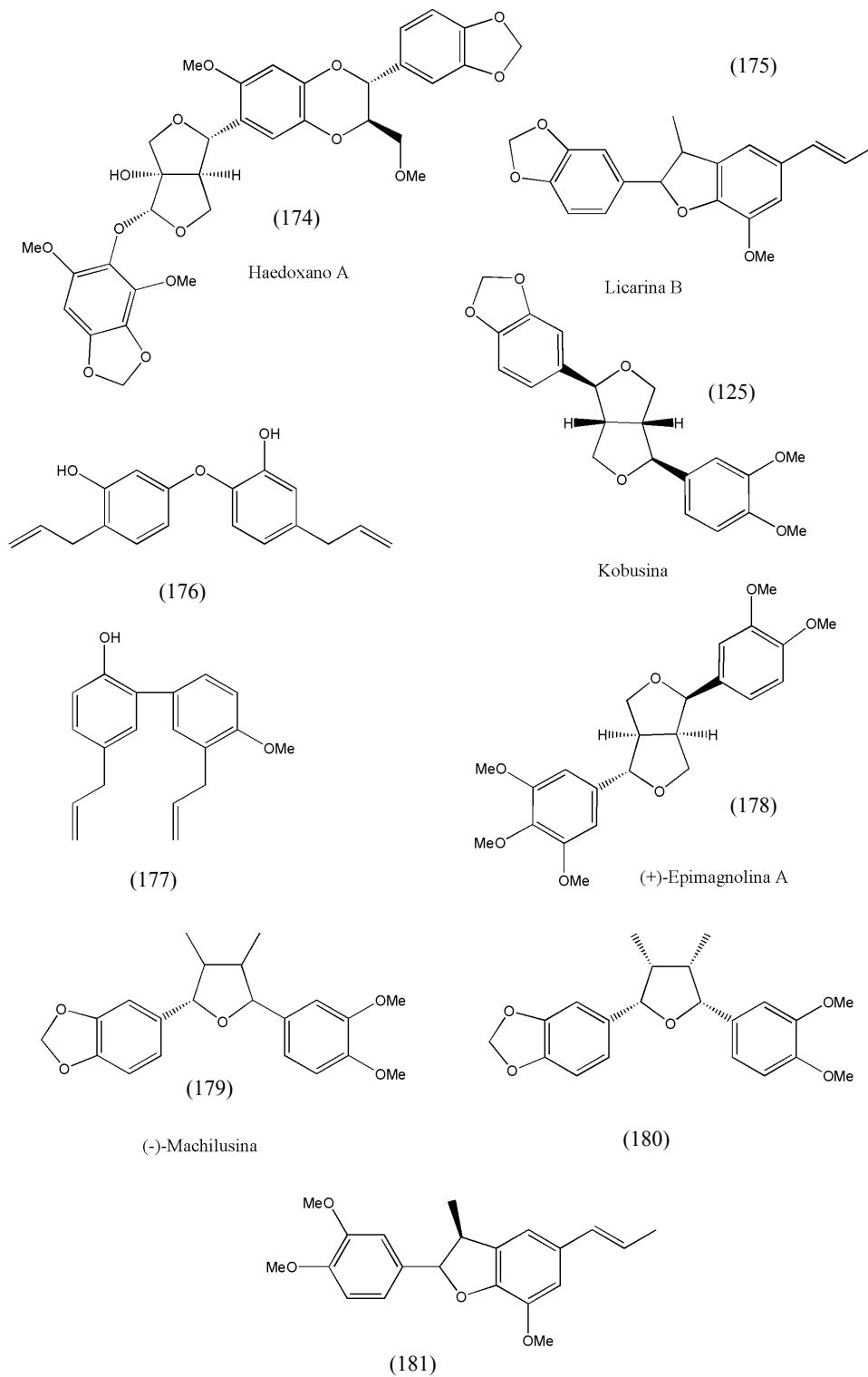
¹¹⁸ Kamikado T., Chang C.F., Murakoshi S., Sakurai A., et al. *Agric. Biol. Chem.*, **39** (4), 833-6, (1975)

¹¹⁹ Nitao J.K., Nair M.G., Thorogood D.L., Jonson K.S. and Scriber J.M. *Phytochemistry*, **30** (7), 2193-5, (1991)

¹²⁰ Miyazawa M., Ishikawa Y., Kasahara H., Yamanaka J.I., Kameoka H. *Phytochemistry*, **35** (3), 611-3, (1994)

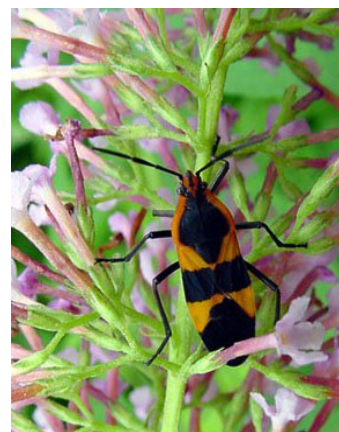
¹²¹ González-Coloma A., Escoubas P., Mizutani J. and Lajide L. *Phytochemistry*, **35** (3), 607-10, (1994)

¹²² Bowers W.S. *Science*, **161** (844), 895-7, (1968)



Esquema 52. Lignanos con actividad insecticida

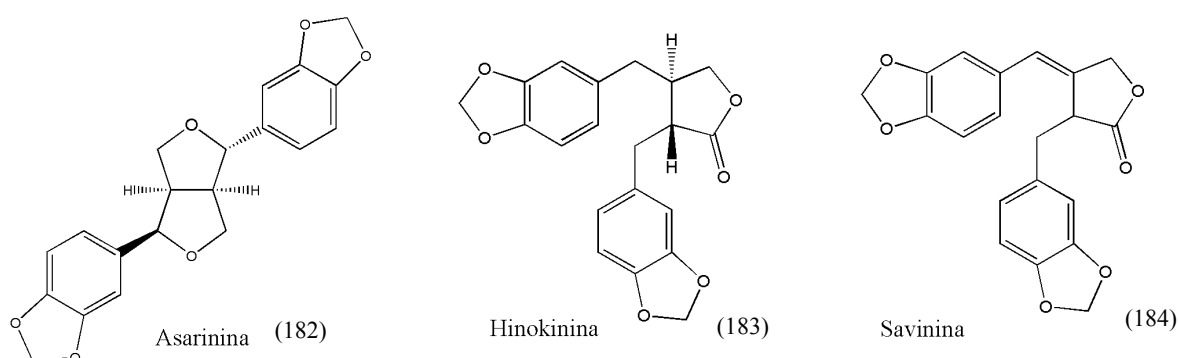
Sesamina (116) y sesamolina (117) tienen una débil actividad similar a la de la hormona juvenil y previenen la metamorfosis en *Oncopeltus fasciatus*, un hemíptero fitófago que parasita a especies del género *Asclepia* (Asclepiadaceae).



Oncopeltus fasciatus

Sesamina (116) y asarinina (182) (Esq. 53) son potenciadores efectivos de la toxicidad de una amplia variedad de insecticidas^{123,124}. Estos lignanos muestran la misma potencia que los sinergistas de insecticidas sintéticos comerciales.

El (+)-pinoresinol (39) y su dimetileter son inactivos. Estas observaciones apuntan hacia la importancia que para la actividad sinérgica tiene el sustituyente metilendioxi. Otros estudios han mostrado claramente que el grupo metilendioxi es responsable de la inhibición del sistema enzimático que lleva a cabo la oxidación e inactivación de la mayoría de las toxinas (sistema citocromo P450 oxigenasa)^{123,124}. Otros lignanos provistos de grupo metilendioxi, tales como savinina (184) e hinokinina (183) (Esq. 53), también muestran acción sinérgica con insecticidas¹²⁵. Es posible que estos compuestos compartan esta actividad común como resultado de la presencia del grupo metilendioxi. En cualquier caso matairesinol (134) y su dimetileter tienen actividad sinérgica con insecticidas pese a que ninguno posee metilendioxi¹²⁶.



Esquema 53. Lignanos con actividad insecticida

¹²³ Haller H.L., McGovran E.R., Goodhue L.D. and Sullivan W.N. *J. Org. Chem.*, **7**, 183-4, (1942)

¹²⁴ Haller H.L., LaForge F.B. and Sullivan W.N. *J. Org. Chem.*, **7**, 185-8, (1942)

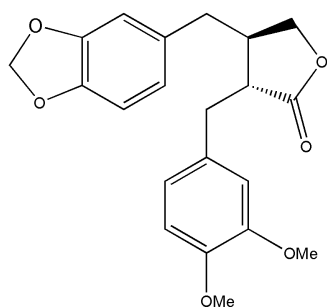
¹²⁵ Matsubara H. *Bull. Inst. Chem. Res. Kyoto Univ.*, **50** (3), 197-205, (1972)

¹²⁶ Kerr R.W. *Aust. CSIRO Bull.*, (261), 32-48 (1951)

Actividad nematocida

Ciertos lignanos confieren protección contra los nemátodos^{127,128}. Así por ejemplo (-)-matairesinol (134) y (-)-bursehernina (185) (Esq. 54) a concentraciones de 50 µg/ml inhiben la eclosión de los quistes de los nemátodos *Globodera pallida* y *Globodera rostochiensis* en un 55% y 70% respectivamente. Estos nemátodos son endoparásitos de las papas y presentan un elevado dimorfismo sexual, los machos son móviles y vermiformes mientras que las hembras son sésiles y esféricas. La pared del cuerpo de las hembras madura hasta formar un quiste resistente que contiene entre 200 y 500 huevos.

La presencia del grupo metilendioxi parece desempeñar un papel importante ya que cuando es sustituido por un grupo metoxilo y un grupo hidroxilo o dos grupos hidroxilo, la actividad inhibitoria se reduce considerablemente. Resulta interesante que lariciresinol 9-O-β-D-glucósido aislado de las raíces y estolones de *Solanum tuberosum*, se acumula en respuesta a la infección con *Globodera rostochiensis*.



(185)
Bursehernina



Hembra de *Globodera* sp en la raíz de *Solanum tuberosum*

Esquema 54. Actividad nematocida en *Solanum tuberosum*

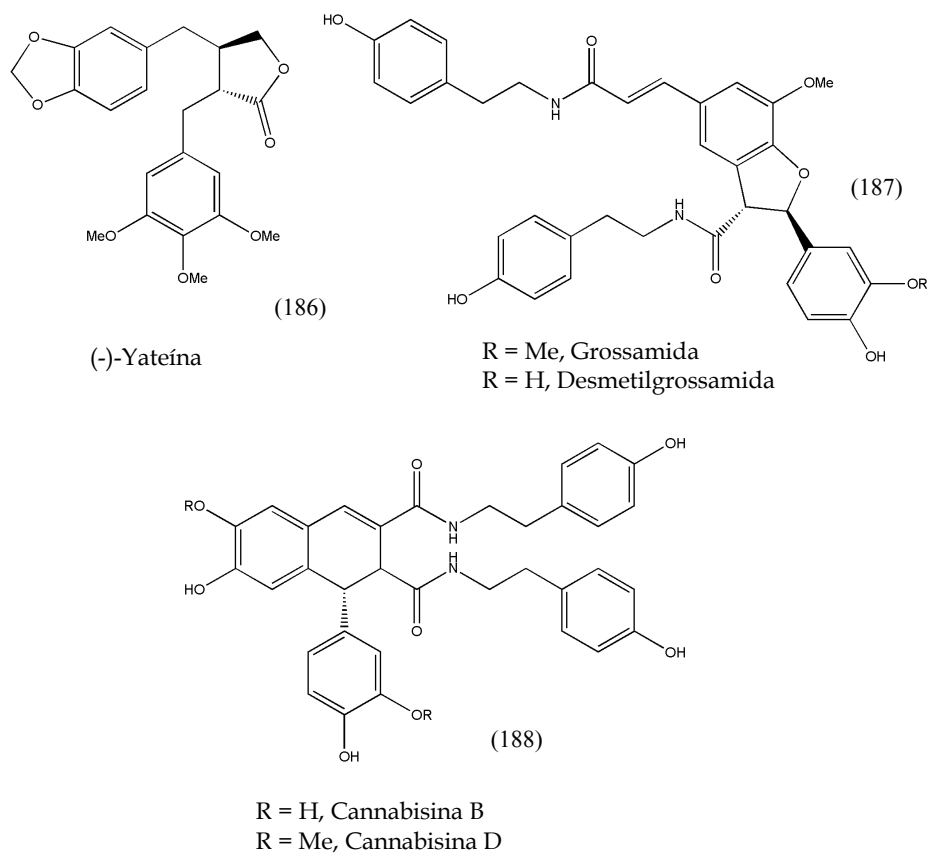
¹²⁷ González J.A., Estévez-Braun A., Estévez-Reyes R., Ravelo A.G. *J. Chem. Ecol.*, **20** (3), 517-524, (1994)

¹²⁸ González J.A., Estévez-Braun A., Estévez-Reyes R., Bazzocchi I.L., Moujir L., Jiménez I.A., Ravelo A.G. and González A.G. *Experientia*, **51** (1), 35-9, (1995)

Actividad antialimentaria

Varios lignanos muestran actividad antialimentaria. La (-)-yateína (186) (Esq. 55) muestra esta actividad sobre los coleópteros *Stiphilus granarius* (Curculionidae) y *Tribolium confusum* (Tenebrionidae) cuando es añadida a la dieta¹²⁹.

Las lignanamidas (\pm)-grossamida (187), (\pm)-desmetilgrossamida (187), (-)-cannabisina B (188) y (-)-cannabisina D (188) aisladas de *Xylopiya aethiopica* (Annonaceae) muestran actividad antialimentaria en la termita *Reticulitermes speratus*.



Esquema 55. Lignanos con actividad antialimentaria

¹²⁹ Harmatha J. and Nawrot J. *Biochem. Syst. Ecol.*, **12** (1), 95-8, (1984)

Actividad alelopática

Un agente alelopático es una sustancia que, producida por una especie vegetal y mayoritariamente liberada al suelo desde hojas caídas, es capaz de inhibir el crecimiento de otra especie vegetal diferente. Desde el punto de vista químico estas sustancias son muy diversas y entre las más conocidas están los fenoles y los aminoácidos no proteicos.

Estos aminoácidos no son incorporados a las proteínas de las plantas que los producen ya que las aminoacil-t-RNAs sintetasas los discriminan de los aminoácidos proteicos, pero esto no ocurre en la biosíntesis de proteínas de otras plantas que son sensibles y por tanto incorporan dichos aminoácidos a sus proteínas que resultan inactivas¹⁷.

Varios lignanos presentan poderosas propiedades alelopáticas. Por ejemplo el ácido nordihidroguayarático (161), suministrado a concentraciones de 20µg/l es capaz de reducir drásticamente el crecimiento de la raíz en plantas forrajeras jóvenes¹³⁰. También reduce el crecimiento del hipocotilo en la lechuga (*Lactuca sativa*) y en la cola de zorro (*Setaria viridis*).

Adicionalmente, el monoepoxilignanólido (189) (Esq. 56) de *Aegilops ovata* es inhibidor de la germinación de *Lactuca sativa*, siendo este efecto mayor en presencia de luz que en oscuridad¹³¹.

La arctiina (137) de *Arctium lappa* inhibe la germinación de 11 de 12 especies de plantas estudiadas a concentraciones de aproximadamente 5µg/µl.

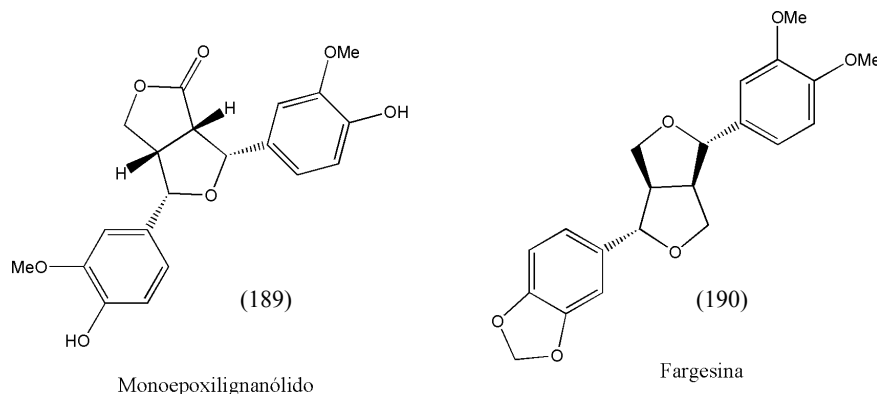
La fargesina (190) (Esq. 56) y la sesamina (116) son inhibidores de la germinación de las semillas de *Arachis hypogaea* (cacahuete), pero no de las de *Oryza sativa* (arroz)¹³². Dado que en el primer caso se trata de una semilla que almacena grasa mientras que la del arroz almacena carbohidratos, se cree que este efecto se puede ejercer sobre las enzimas que controlan el metabolismo de los lípidos.

¹³⁰ Elakovich S.D. and Stevens K.L. *J. Chem. Ecol.*, **11** (1), 27-33, (1985)

¹³¹ Lavie D., Levy E.C., Cohen A., Evenari M. and Guttermann Y. *Nature*, **249** (5455), 388, (1974)

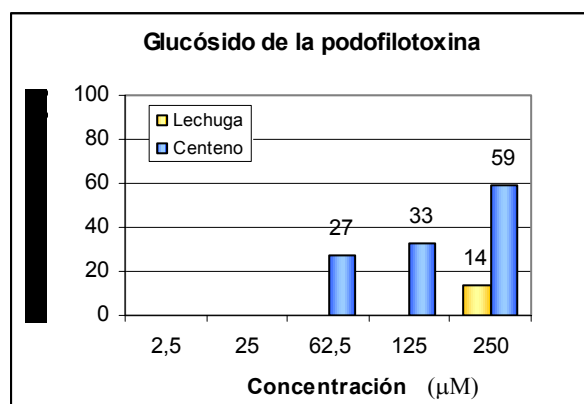
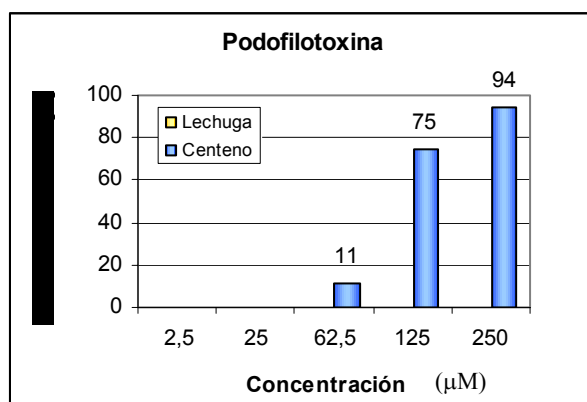
¹³² Bhiravamurty P.V., Kanakala R.D., Rao E.V. and Sastry K.V. *Curr. Sci.*, **48** (21), 949-50, (1979)

En este mismo estudio se comprobó que la eudesmina (122), que carece de grupo metilendioxi, es mucho menos activa, lo que sugiere que este grupo es necesario para desarrollar esta actividad.

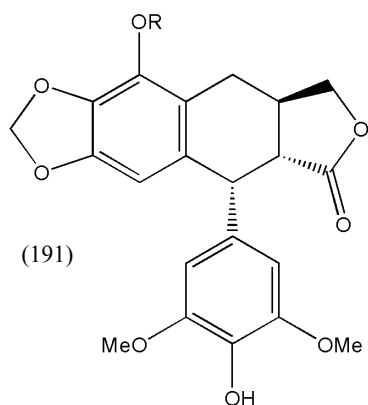
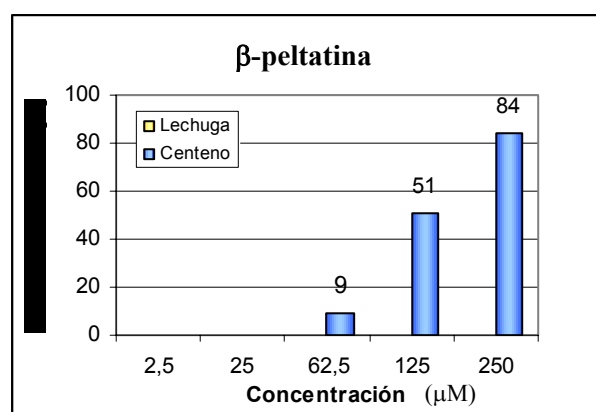
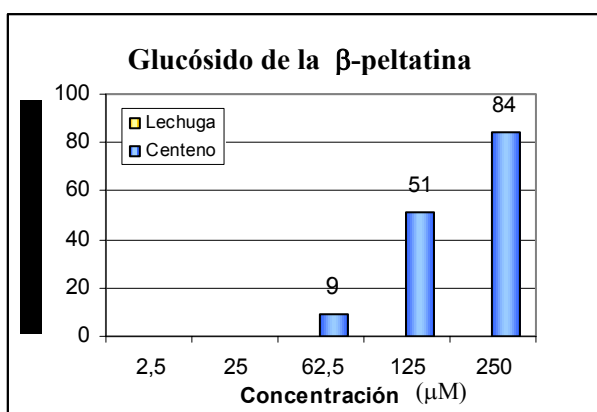
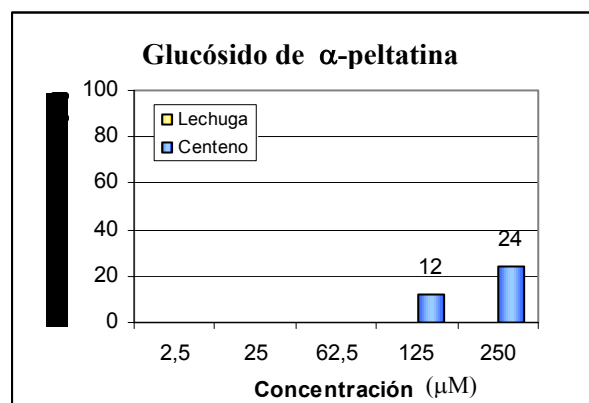
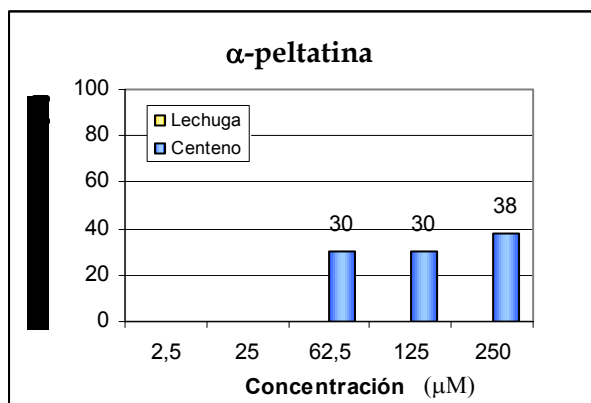


Esquema 56. Lignanos con actividad alelopática

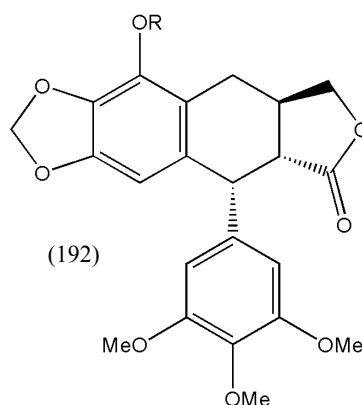
También se ha visto que determinadas ariltetralinas inhiben el crecimiento de plantas. Oliva et al.¹³³ ensayaron el posible efecto fitotóxico de la podofilotoxina (12), α -peltatina (191) (Esq. 57), β -peltatina (192), sus respectivos glucósidos y el etopósido (13) (Esq. 58) (derivado semisintético de la podofilotoxina) sobre dos especies vegetales: una dicotiledónea, *Lactuca sativa* (lechuga) y una monocotiledónea, *Lolium multiflorum* (centeno). El principal efecto observado fue la inhibición del crecimiento de la raíz. Los resultados se muestran en los siguientes gráficos.



¹³³ Oliva A., Moraes R.M., Watson S.B., Duke S.O. and Dayant F.E. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 72 (1), 45-54, (2002)

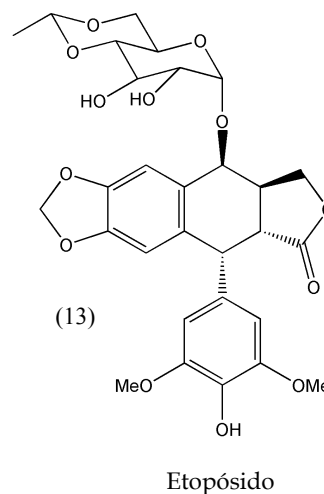
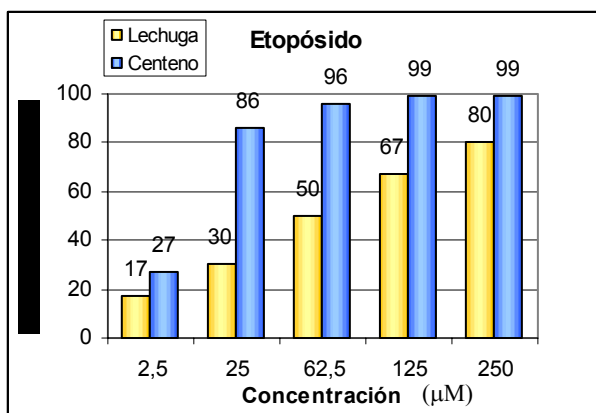


R = H, α -peltatina
 R = Glu, α -peltatina-5-O-D- β -glucósido



R = H, β -peltatina
 R = Glu, β -peltatina-5-O-D- β -glucósido

Esquema 57. Lignanos con actividad alelopática



Esquema 58. Actividad alelopática de etopósido

Las agliconas resultaron ser inhibidores más potentes que sus respectivos glucósidos, siendo la podofilotoxina el lignano natural más activo de los probados. El antineoplásico semisintético etopósido (13) (Esq. 58) resultó altamente tóxico para ambas especies y unas 10 veces más activo que la podofilotoxina sobre *Lolium multiflorum*.

A nivel celular, la podofilotoxina y el etopósido producen efectos similares en células meristemáticas de raíz de cebolla inhibiendo todas las fases de la mitosis en un 50% respecto de los controles. Estos compuestos afectan a la formación del huso acromático, una estructura microtubular fusiforme que se extiende de polo a polo de la célula y que es determinante en la separación de las cromátidas durante la anafase.

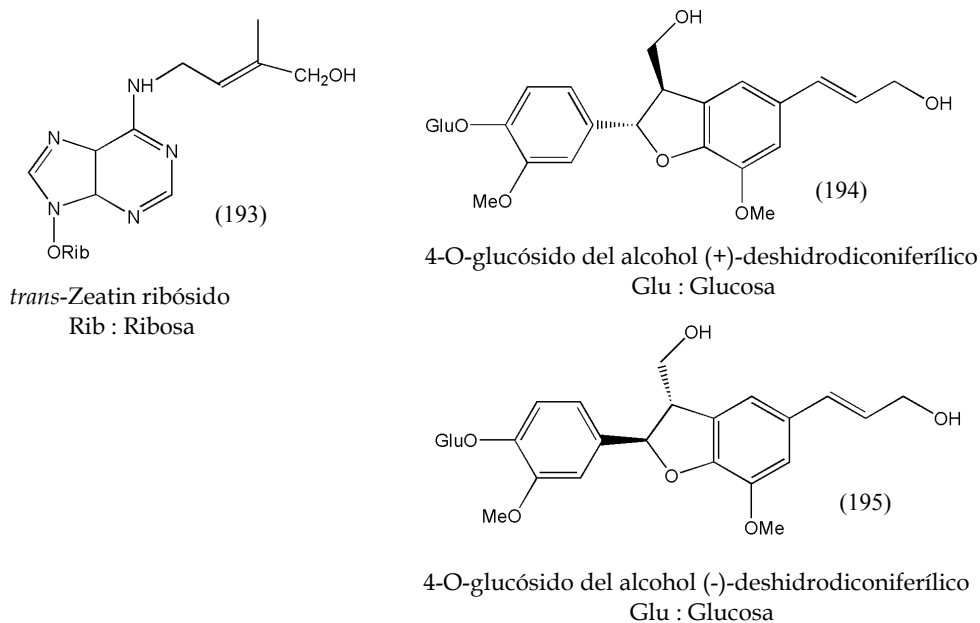
En lugar de un huso acromático normal se produce la formación de múltiples polos que pueden ser visualizados durante la metafase y que causan una separación anormal de las cromátidas en anafase.

Por lo tanto, las plantas que producen estos lignanos pueden tener efectos alelopáticos sobre otras especies vegetales que crecen en sus alrededores.

Actividad similar a las citoquininas

Las citoquininas son un conjunto de sustancias derivadas de la adenina que ejercen una extensa gama de acciones en las plantas, siendo las principales la estimulación de la división celular y la acción morfogénica, ya que inducen a la formación de órganos en una gran variedad de cultivos de tejidos en las condiciones apropiadas^{17,134}.

Ciertos lignanos parecen funcionar como citoquininas durante el crecimiento y desarrollo, aunque sólo son efectivos a muy altas concentraciones. Por ejemplo el 4-O-glucósido del alcohol (±)-deshidroconiferílico (194+195) (Esq. 59) presenta una actividad parecida a la de las citoquininas ya que puede estimular la división celular en *Nicotiana tabacum* y sustituir a las citoquininas en cultivos de médula y callos¹³⁵. Tanto la forma (+) como la (-) de este compuesto estimulan el crecimiento de médula a concentraciones de aproximadamente 10µM de un modo comparable a como lo hace la citoquinina *trans*-zeatin ribósido (193) a una concentración de 0.1 µM.



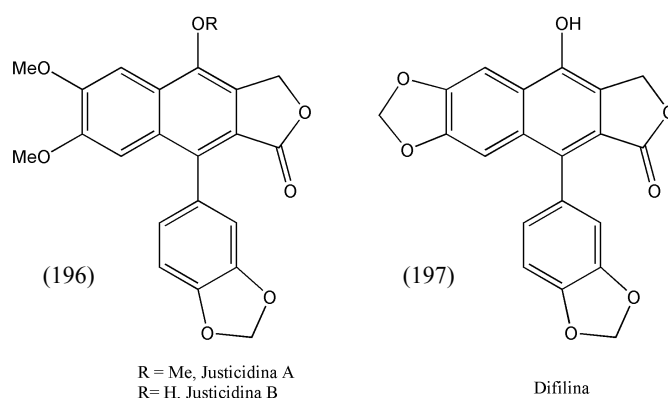
Esquema 59. *trans*-Zeatin ribósido y lignanos con actividad similar a las citoquininas

¹³⁴ Hill T.A. Hormonas reguladoras del crecimiento vegetal. Ed. Omega, S.A., (1984)

¹³⁵ Orr J.D., Lynn D.G. *Plant Physiol.*, **98** (1), 343-52, (1992)

Otras actividades: actividad piscicida y alergenicidad

Los lignanos arilnaftalénicos justicidina A (196), justicidina B (196) y difilina (197), aislados de *Justicia hayatai*, tienen una actividad piscicida muy potente^{136,137}. Esta planta ha sido empleada durante varios siglos por los pescadores nativos de Taiwán (islas Pung Fu) para capturar peces¹³⁸.



Esquema 60. Lignanos con actividad piscicida

El serrín del cedro rojo (*Thuja plicata*) produce asma y rinitis alérgica en ciertos individuos. Esta patología, conocida con el nombre de asma del cedro rojo occidental (WRCA), es un problema común en la industria maderera.

El compuesto responsable es el ácido plicático¹³⁹ (142) (Esq. 42). Desde un principio se pensó que se trataba de una respuesta alérgica y no el resultado de una irritación ya que dicha reacción se manifiesta sólo en determinados individuos¹⁴⁰. Actualmente se sabe que el ácido plicático induce broncoconstricción acompañada de niveles elevados de histamina y leucotrienos E₄¹⁴¹.

¹³⁶ Anjaneyulu A.S.R., Ramaiah P.A., Ramachandra R.L., Venkaterswarlu R., Pelter A., Ward R.S. *Tetrahedron*, **37** (21), 3641-52, (1981)

¹³⁷ Murakami T. and Matsushima A. *Japan. J. Pharm.*, **81**, 1596-600, (1961)

¹³⁸ Munakata K., Marumo S., Ota K., and Chen Y.L. *Tetrahedron Lett.*, (47), 4167-70, (1965)

¹³⁹ Chan-Yeung M., Barton G.M., MacLean L. and Grzybowski S. *Am. Rev. Resp. Dis.*, **108** (5), 1094-102, (1973)

¹⁴⁰ Chan-Yeung M. *Am. Rev. Resp. Dis.*, **108** (5), 1103-10, (1973)

¹⁴¹ Chan-Yeung M., Chan H., Tse K.S., Salari H., Lam S. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.*, **84** (5 Pt 1), 762-8, (1989)

Actividades biológicas de los lignanos

Efectos sobre la salud

Hace aproximadamente 400-600 años, tanto los nativos del Himalaya como los indios americanos de Maine, descubrieron que la resina producida a partir del extracto alcohólico de raíces y rizomas de especies del género *Podophyllum* tenían propiedades catárticas y venenosas. Además los indios americanos creían que el uso tópico de las raíces era un antídoto efectivo contra la mordedura de serpientes venenosas¹⁴².

Los colonizadores de América también usaron las raíces y rizomas de mandrágora americana (*Podophyllum peltatum*) como agente purgante, antihelmíntico, clorótico y vesicante^{143,144}.

Las plantas ricas en lignanos también fueron empleadas en la medicina tradicional china y japonesa. Así, por ejemplo, la corteza seca de *Fraxinus japonica* ha sido utilizada durante cientos de años en Japón como diurética, antipirética, analgésica y antirreumática¹⁴². La corteza de *Olea europaea* se ha empleado en Oriente como antipirético, antirreumático, tónico y como remedio para la escrofulosis, una afección tuberculosa de la piel, articulaciones, vasos linfáticos subcutáneos y ganglios linfáticos que generalmente se localiza en el cuello¹⁴⁵. Estas propiedades terapéuticas se atribuyen a lignanos que han sido aislados de esta planta¹⁴⁶. A continuación se describen las principales actividades de lignanos relacionadas con su empleo terapéutico. A excepción de los aislados de especies del género *Podophyllum* y el ácido nordihidroguayarático (161), los lignanos no parecen estar implicados en intoxicaciones humanas o animales¹⁴⁷.

¹⁴² Ayres D.C. "Lignans. Chemical, biological and clinical properties". Cambridge University Press. (1990)

¹⁴³ Kelly M., Hartwell J.L. *J. Nat. Canc. Inst.*, **14** (4), 967-1010, (1954)

¹⁴⁴ Hartwell J.L., Schrecker A.W. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. **15**, 83-166, (1958)

¹⁴⁵ Jacobi E. "Atlas de enfermedades de la piel". Tomo I. Traducción de la 5ª edición alemana. Ed. Saturnino Calleja Fernández, (1913)

¹⁴⁶ Tsukamoto H., Hisada S., Nishibe S. *Chem. Pharm. Bull.* **32** (7), 2730-5, (1984)

¹⁴⁷ Bruneton J. "Plantas Tóxicas". Edit. Acribia, S.A. Zaragoza, (2001)

Lignanos que actúan sobre la fosfodiesterasa del AMPc

Las hormonas (primeros mensajeros) no entran generalmente en sus células diana sino que se unen a receptores e inducen la liberación de los denominados segundos mensajeros que se encargan de transmitir la información hasta determinadas enzimas, desencadenándose así una respuesta muy amplificada. A todo el proceso se le conoce con el nombre de transducción de las señales¹⁴⁸.

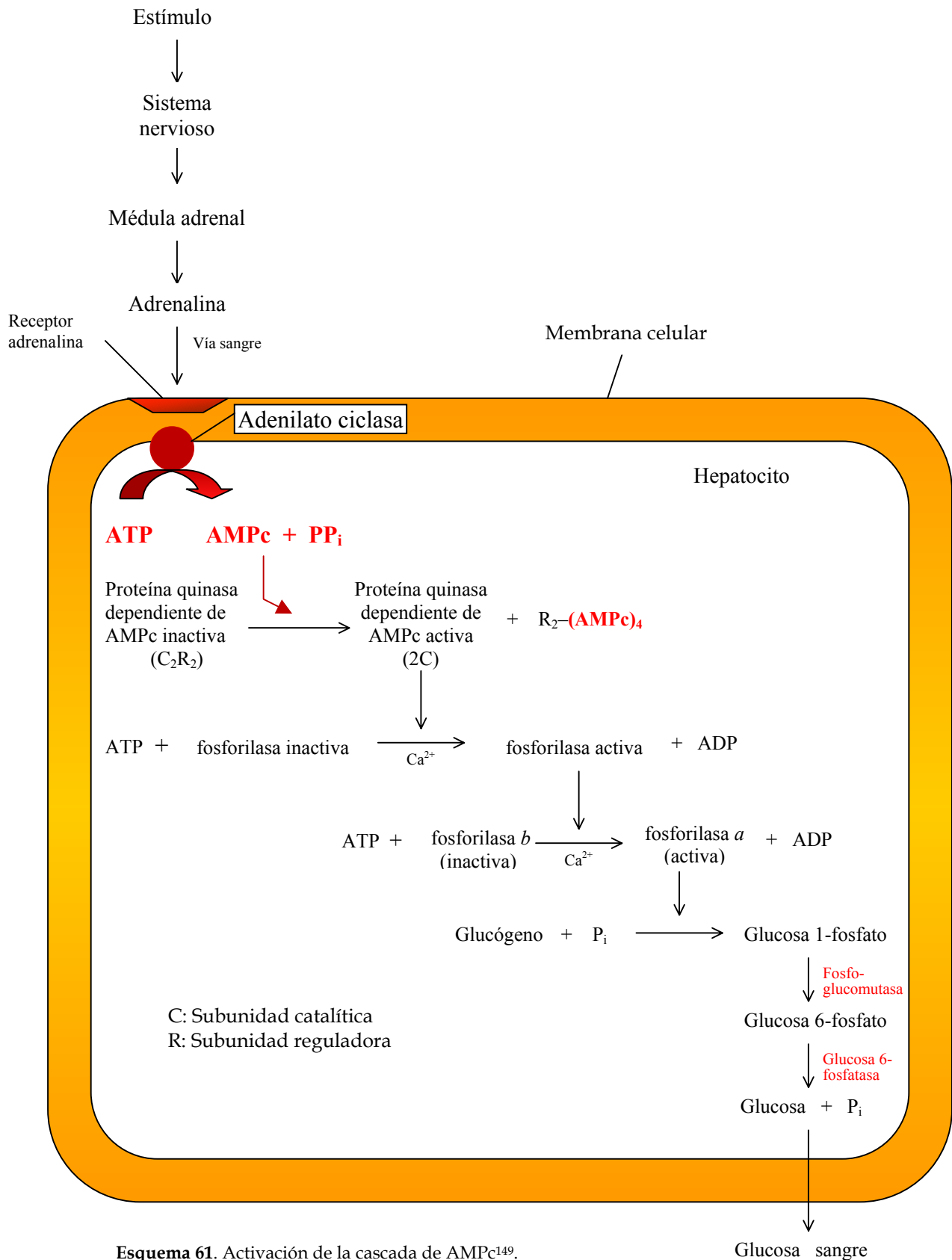
La adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPc), identificada por Sutherland y Ral en 1958, es uno de los segundos mensajeros más importantes. Cuando un animal experimenta cualquier tipo de amenaza, su Sistema Nervioso Central (SNC) estimula a la médula de sus glándulas suprarrenales para segregar adrenalina (epinefrina), hormona que dispara una cascada de amplificación en las células del hígado cuyo objetivo final es movilizar las reservas de glucógeno e inhibir su síntesis a partir de glucosa. La finalidad de estas dos acciones conjuntas es lograr una disponibilidad máxima de glucosa en sangre que permita la producción de la energía necesaria para generar una respuesta de lucha o huida¹⁴⁹. La señal es amplificada unos 25 millones de veces de forma que la unión de unas pocas moléculas de adrenalina a sus receptores produce la liberación de varios gramos de glucosa en sangre.

La unión de la adrenalina a su correspondiente receptor de membrana de la célula hepática produce un cambio de conformación en dicho receptor, que adquiere la capacidad de activar a una proteína G, la cual activa a su vez a la enzima adenilato ciclasa localizada en la hemimembrana interna (Esq. 61). Esta enzima cataliza la transformación del ATP en AMPc que cuadruplica su concentración en cuestión de segundos. El AMPc activa a una proteína quinasa dependiente de AMPc que a su vez completa el resto del mecanismo en cascada que termina con la liberación de glucosa desde el hepatocito a la sangre. Mientras se mantenga la situación de amenaza, la médula adrenal seguirá segregando adrenalina a la sangre, por lo que tanto la concentración de AMPc como la tasa de degradación del glucógeno se mantienen a niveles elevados. Cuando la situación de emergencia desaparece, la secreción de adrenalina cesa y su nivel en sangre baja rápidamente por su degradación en el hígado.

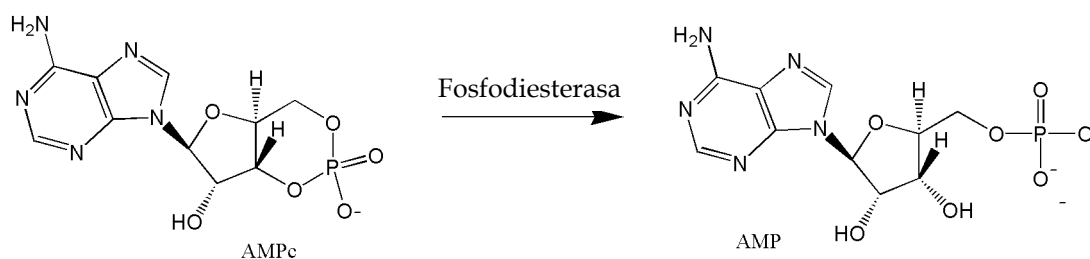
¹⁴⁸ Rawn J.D. "Bioquímica". Ed McGraw Hill-Interamericana. Madrid, pp 247-53, (1989)

¹⁴⁹ Lehninger A.L. Principios de bioquímica. pp 728-735. Ed. Omega, Barcelona, (1988)

La adenilato ciclasa vuelve a su forma inactiva y el AMPc es hidrolizado a AMP por la fosfodiesterasa, terminando así los efectos intracelulares de este nucleótido cíclico (Esq. 62).



Esquema 61. Activación de la cascada de AMPc¹⁴⁹.



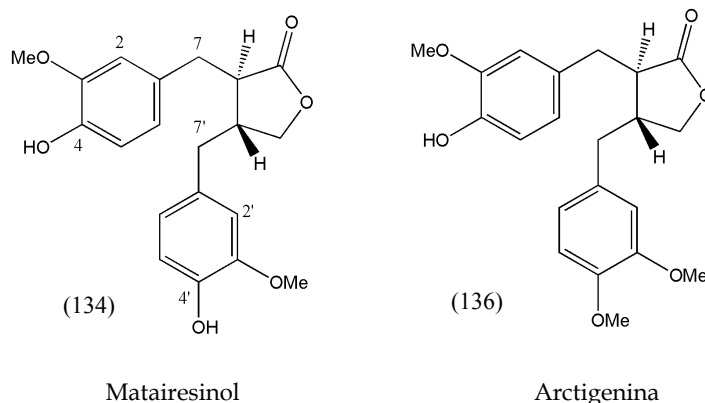
Esquema 62. Hidrólisis del AMPc por la fosfodiesterasa

Algunos lignanos de los grupos de las dibencilbutirolactonas y de los furofuranos inhiben la acción de la AMPc-fosfodiesterasa¹⁴² por lo que prolongan o intensifican la actividad de la adrenalina al disminuir la velocidad de degradación del AMPc.

Se trata del mismo mecanismo que explica los efectos estimulantes del té y del café, bebidas que contienen teofilina y cafeína respectivamente y que también inhiben la fosfodiesterasa del AMPc.

Los lignanos que muestran esta actividad, como el matairesinol (134) (Esq. 63) y la arctigenina (136), son potenciales agentes antiasmáticos ya que los niveles elevados de AMPc están implicados en la relajación del músculo liso de las vías respiratorias superiores, al prevenir la activación de las células mediadoras de la respuesta inflamatoria¹⁹.

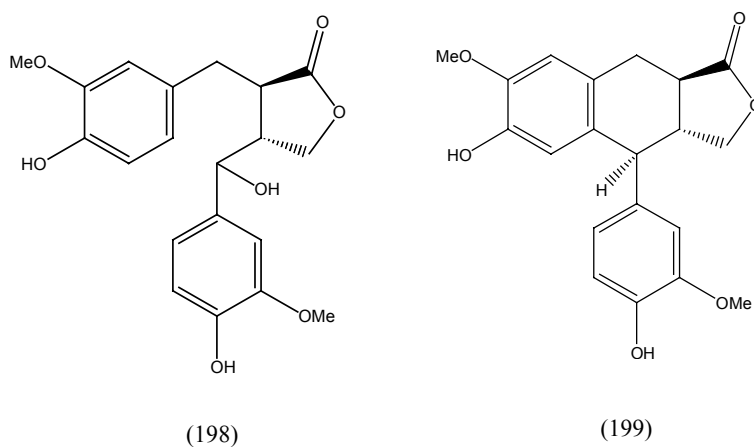
El matairesinol, que posee dos anillos de guayacilo (4-hidroxi-3-metoxifenilo) (Esq. 63), muestra una actividad elevada, mientras que la arctigenina, que consta de un anillo de guayacilo y otro de veratrilo (3,4-dimetoxifenilo), muestra una actividad menor. Por último, en otro compuesto de este tipo, en el que los dos anillos son de veratrilo, la actividad inhibitoria se ve reducida a la tercera parte de la del matairesinol. Por lo tanto, parece ser que el guayacilo es el sustituyente óptimo para los lignanos inhibidores de la fosfodiesterasa de AMPc¹⁶.



Esquema 63. Matairesinol y arctigenina

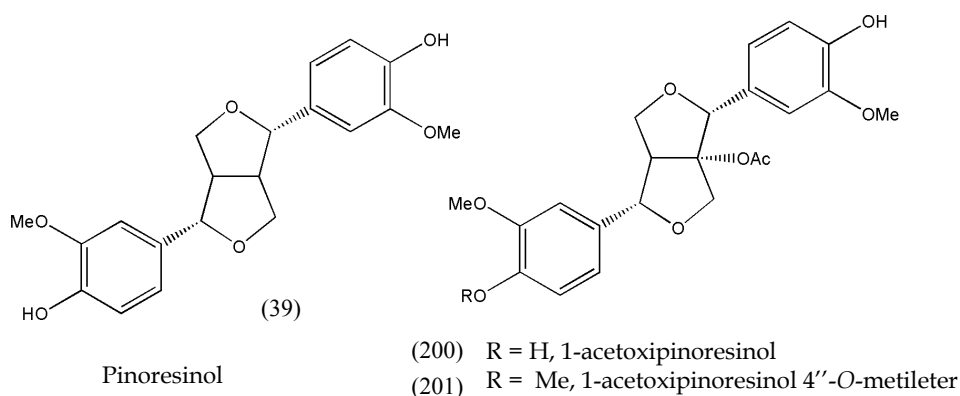
En cualquier caso, la relación estructura-actividad es compleja¹⁴². Así, la glucosilación en la posición 4 tanto de la arctigenina como del matairesinol, conduce a la pérdida de la actividad, pero ésta queda retenida en el caso del matairesinol si éste es glucosilado tanto en la posición 4' como 4, es decir que el diglucósido mantiene la actividad^{16, 142}.

La estereoquímica de la posición C-7' del matairesinol parece ser determinante en su actividad inhibitoria. Así pues, tanto la hidroxilación en C-7' como la ciclación de este lignano producen los derivados inactivos¹⁶ mostrados en el Esquema 64.



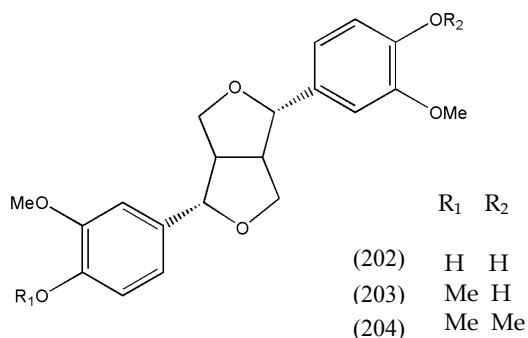
Esquema 64. Derivados inactivos del matairesinol

De los lignanos furofuránicos, hay que destacar el pinoresinol (39), un inhibidor muy efectivo de la fosfodiesterasa del AMPc¹⁴⁶. También los productos (+)-1-acetoxipinoresinol (200) y (+)-1-acetoxipinoresinol 4'-O-metileter (201) (Esq. 65) muestran *in vitro* una elevada actividad inhibitoria de esta enzima (CI₅₀ (3.2 x 10⁻⁵ M y 11.5 x 10⁻⁵ M) respectivamente)¹⁴⁶.



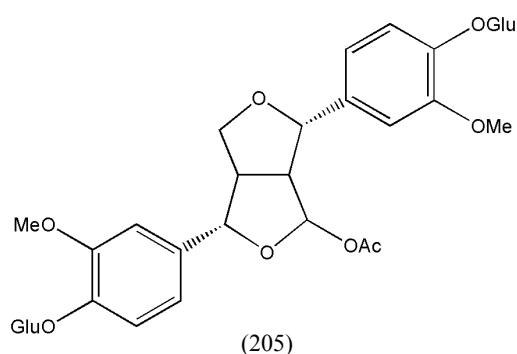
Esquema 65. Lignanos furofuránicos con actividad inhibitoria de la fosfodiesterasa del AMPc

Al igual que ocurría para los lignanos del grupo de las debencilbutirolactonas, el grupo guayacilo parece ser el óptimo para desarrollar la actividad inhibitoria. Así el compuesto 202, (Esq. 66) tiene una actividad mayor que 203 y éste mayor que 204¹⁶.



Esquema 66. La actividad inhibitoria óptima se consigue con el guayacilo como sustituyente en ambos anillos aromáticos.

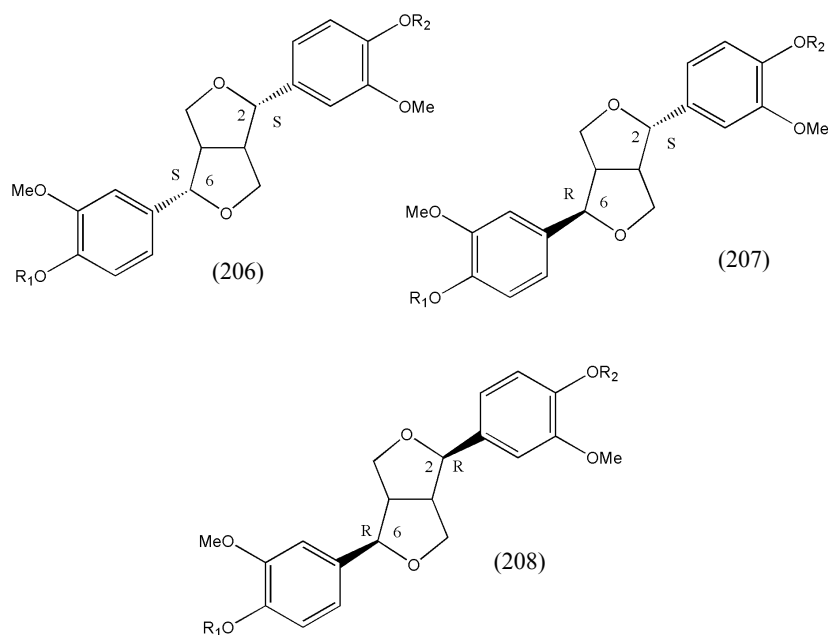
Al igual que se observa para matairesinol, la actividad del pinoresinol queda reducida para el monoglucósido y es reestablecida para el diglucósido¹⁴². Este patrón se repite para los lignanos de este tipo aislados del género *Eucommia* en los que se ha observado que la actividad inhibitoria del diglucósido es mayor que la de la aglicona y la de ésta mayor que la del monoglucósido. Por tanto, parece que son los diglucósidos de estos lignanos los que exhiben una acción inhibitoria más potente sobre la fosfodiesterasa del AMPc. De hecho, el mejor inhibidor de esta enzima es (+)-8-acetiloxipinoresinol-4',4''-di-*O*- β -D-glucopiranososa (205) (Esq. 67) con una CI_{50} de $1.1 \times 10^{-5} M$ ¹⁴².



Esquema 67. (+)-8-acetiloxipinoresinol-4',4''-di-*O*- β -D-glucopiranosido

La estereoquímica del enlace furano-fenilo es importante para la actividad inhibitoria¹⁶. Así por ejemplo (+)-pinoresinol y varios de sus derivados (206) (Esq. 68), en los que tanto C-2 como C-6 tienen la configuración *S*, son más efectivos inhibiendo a la fosfodiesterasa del AMPc que sus análogos (+)-epi-pinoresinoles (207), en los cuales C-2 tiene la configuración *S* y C-6 tiene configuración *R*.

(-)-Pinoresinol y sus derivados (208), en los cuales tanto C-2 como C-6 tienen configuración *R*, muestran una inhibición más de un orden de magnitud menor que (+)-pinoresinol o su glucósido. De un modo similar se ha visto que (+)-siringaresinol di- β -D-glucósido es mucho más activo que (-) siringaresinol di- β -D-glucósido.



Esquema 68. Importancia de la estereoquímica del enlace furano-fenilo en la actividad inhibidora de la fosfodiesterasa del AMPc.

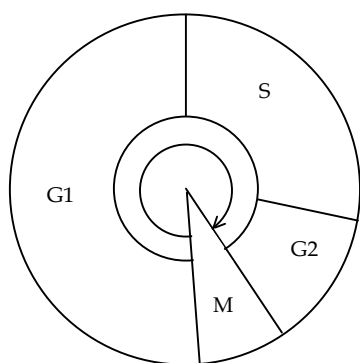
La capacidad que tienen estos lignanos para inhibir la fosfodiesterasa del AMPc también puede explicar otras propiedades fisiológicas de estos compuestos. Así por ejemplo el monoglucósido del pinoresinol es un agente hipertensivo¹⁵⁰, mientras que por otra parte, el diglucósido del siringaresinol y la episesartemina disminuyen el comportamiento agresivo en animales de laboratorio. Este último compuesto es uno de los cuatro lignanos presentes en la resina de *Virola elongata* que se ha utilizado para envenenar flechas¹⁴².

Lignanos con actividad antitumoral

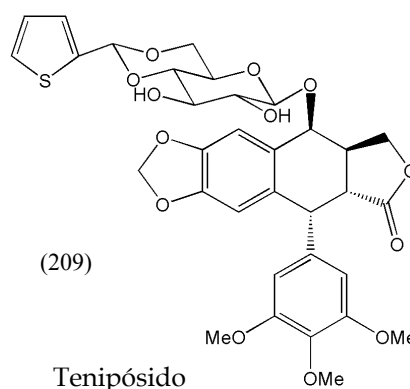
Gran parte del interés que han despertado los lignanos se debe a la actividad antitumoral mostrada por el grupo de la podofilotoxina (12) que se aísla de *Podophyllum peltatum* y *Podophyllum hexandrum*. No obstante, este lignano muestra una severa toxicidad gastrointestinal por lo que no es apto para uso clínico. En cambio sus derivados semisintéticos, etopósido (13) (Esq. 58) y tenipósido (209) (Esq. 69), se

¹⁵⁰ Kitagawa S., Hisada S. y Nishibe S. *Phytochemistry*, **23** (8), 1635-6, (1984)

emplean, bien solos o conjuntamente con otros fármacos, para el tratamiento del linfoma de Hodgkin, linfomas no Hodgkin, el carcinoma de células pequeñas o células de avena (oat-cell carcinoma) y la leucemia aguda^{151,152,153}. Esta actividad antitumoral es consecuencia de la capacidad de estos compuestos para formar complejos terciarios estables con la topoisomerasa II y con el DNA, lo que conduce a fracturas en la doble hélice, quedando el ciclo celular detenido en la fase G2, (Esq. 69). Esto produce en último término la muerte de la célula¹⁹.



Ciclo celular. **G1**, periodo metabólicamente muy activo que implica crecimiento y replicación de orgánulos citoplasmáticos. **S**, periodo de síntesis de DNA. **G2**, ensamblaje de estructuras implicadas en la fase M. **M**, mitosis o meiosis.



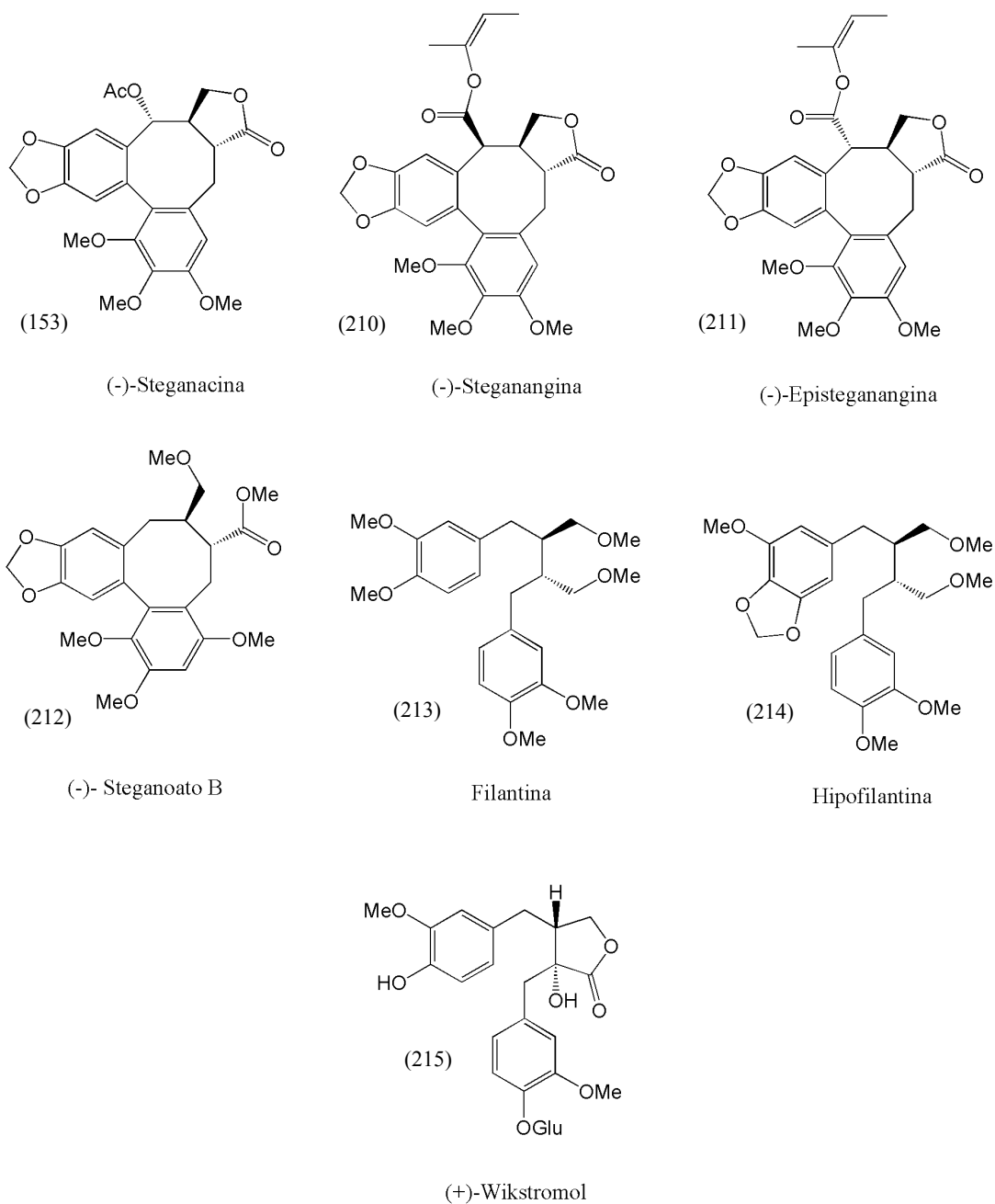
Esquema 69. Ciclo celular y tenipósido.

Otros lignanos también muestran actividad antitumoral como es el caso de (-)-steganacina (153) y (-)-steganangina (210) (Esq. 70) aisladas de la corteza y madera de *Steganotaenia araliacea* y que muestran actividad antileucémica *in vivo* contra cierto tipo de leucemia murina y también *in vitro* en células del carcinoma nasofaríngeo humano⁹⁹.

¹⁵¹ O'Dwyer P.J., Leyland-Jones B., Alonso M.T., Marsoni S., Wittes R.E. *N. Engl. J. Med.*, **312** (11), 692-700, (1985)

¹⁵² Williams S.D., Birch R., Einhorn L.H., Irwin L., Greco F.A., Loehrer P.J. *N. Engl. J. Med.*, **316** (23), 1435-40, (1987)

¹⁵³ Young R.C. *Semin. Oncol.*, **19** (6 Suppl. 13), 19-25, (1992)



Esquema 70. Lignanos con actividad antitumoral

Episteganangina (211) y steganoato B (212) tienen propiedades citotóxicas frente a diferentes líneas celulares de tumores humanos¹⁵⁴. Burserano (38) de *Bursera microphylla* muestra actividad antitumoral frente a células de carcinoma epidermoide

¹⁵⁴ Wickramaratne D.B., Pengsuparp T., Mar W. Chai. H.-B., Chagwedera T.E., et al. *J. Nat. Prod.*, **56** (12), 2083-90, (1993)

nasofaríngeo humano^{155,156}. (+)-Wikstromol (215) de *Wikstroemia foetida* var. *oahuensis* (Thymelaeaceae) es activo contra la leucemia linfocítica P-388¹⁵⁷.

Filantina (213) e hipofilantina (214) de *Phyllanthus amarus* (Euphorbiaceae) aumenta la respuesta citotóxica mediada por vinblastina en la línea celular KB multirresistente a fármacos¹⁵⁸.

El Esquema 71 muestra lignanos aislados de plantas superiores con actividad citostática o antitumoral *in vivo* o *in vitro*¹⁶. Observando estos compuestos, es difícil identificar una característica estructural común que explique su actividad. Muchos de ellos poseen un anillo lactónico de cinco miembros, dos fenilos sustituidos, (uno con tres metoxilos en las posiciones 3, 4 y 5 y otro con un grupo metilendioxi) separados por una cadena de cuatro carbonos. La importancia del anillo lactónico en la actividad de estos compuestos aún no se ha comprendido pues existen lignanos con actividad antitumoral que no lo poseen. Este es el caso de las estructuras 161, 216 y 227 y de burserano (38) (Esq. 13), diferenciándose este último del compuesto 217, que también es activo, en la presencia de un anillo furánico en lugar de lactónico.

Sólo aproximadamente la mitad de los compuestos del Esquema 71 poseen un grupo 3,4,5-trimetoxifenilo, lo que indica que no es absolutamente necesario. En cambio el grupo metilendioxi está presente en casi todos estos compuestos lo que sugiere la importancia de este grupo para producir esta actividad¹⁶.

La posición de los grupos fenilo no parece ser determinante ya que es diferente entre los lignanos del grupo de podofilotoxina (estructuras 12, 168, 191, 192, 219-227), los arilnaftalénicos (196, 197, 228-233) y los del grupo de la steganacina (234 y 235) (Esq. 71).

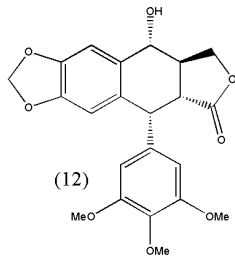
Otro ejemplo que ilustra la complejidad de la relación estructura-actividad en estos compuestos lo proporcionan las estructuras 161, 217, 218 y burserano (38) que son lignanos simples (no ciclados) y activos. Estos compuestos pueden tener varias conformaciones posibles, la mayor parte de las cuales no deben parecerse a la de los ciclolignanos.

¹⁵⁵ Cole J.R., Bianchi E., Trumbull E.R. *J. Pharm. Sci.*, **58** (2), 175-6, (1969)

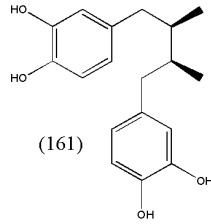
¹⁵⁶ Tomioka K., Ishiguro T., Koga K. *Chem. Pharm. Bull.*, **33** (10), 4333-7, (1985)

¹⁵⁷ Torrance S.J., Hoffmann J.J., Cole J.R. *J. Pharm. Sci.*, **68** (5), 664-5, (1979)

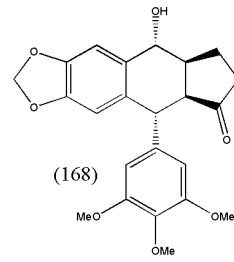
¹⁵⁸ Somanabandhu A., Nitayangkura S., Mahidol C., Ruchirawat S., Likhitwitayawuid K., et al. *J. Nat. Prod.*, **56** (2), 233-9, (1993)



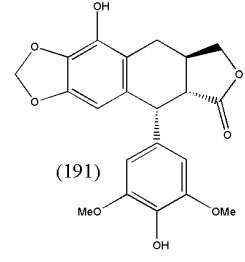
Podofilotoxina



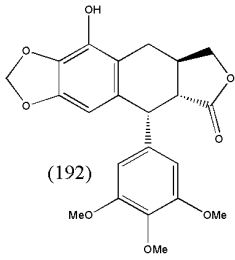
Ácido nordihidroguayarático



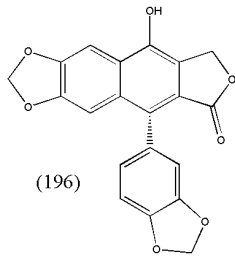
Picropodofilotoxina



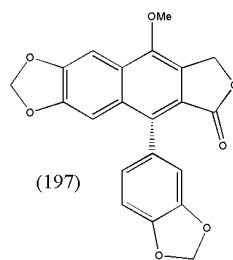
α-Peltatina



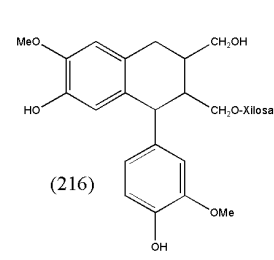
β-Peltatina



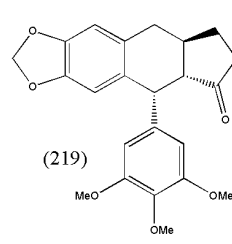
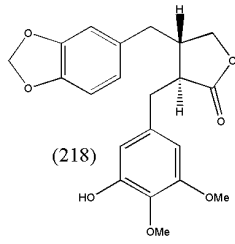
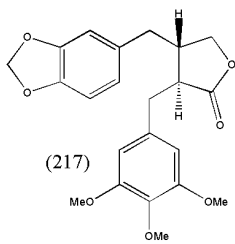
Difilina



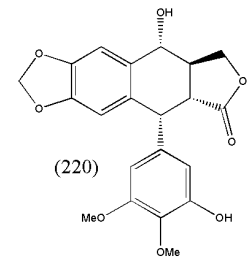
Justicidina A



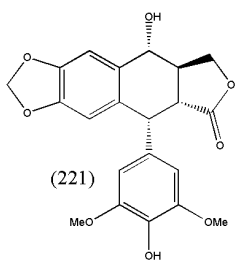
(+)-Dimetilsolariciresinol-2-α-xilosa



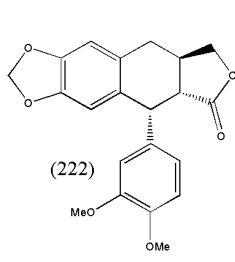
Desoxipodofilotoxina



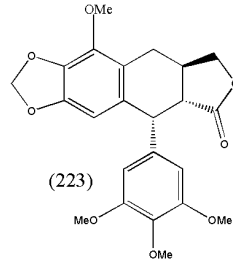
3'-Desmetilpodofilotoxina



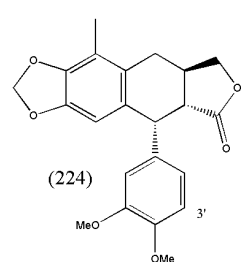
4'-Desmetilpodofilotoxina



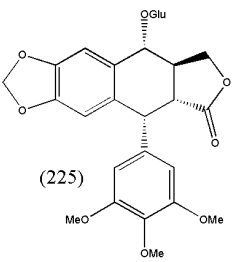
Morelsina



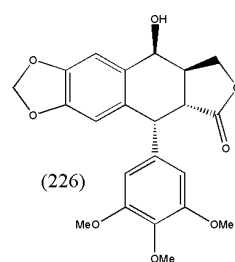
β-Peltatina-A-metil-éter



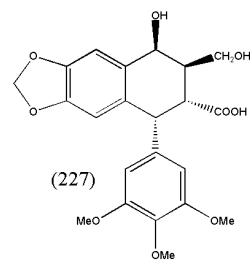
3'-Desmetoxi-β-Peltatina-A-metil-éter



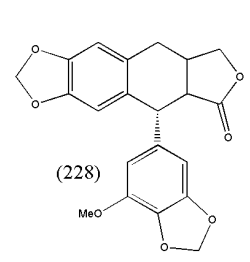
Glucósido de podofilotoxina



Epipodofilotoxina

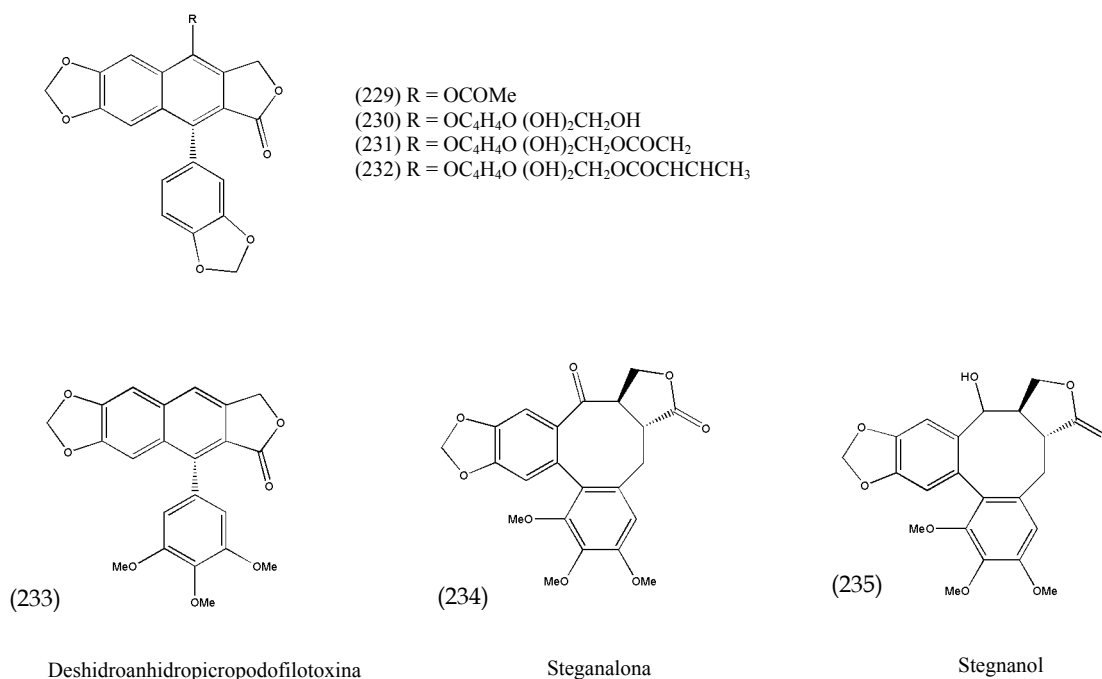


Ácido picropodófilico



Austrobailignano-1

Esquema 71a. Lignanos con actividad antitumoral o citostática según MacRae W. & Towers N¹⁶.



Esquema 71b. Lignanós con actividad antitumoral o citostática según MacRae W. & Towers N¹⁶.

Del estudio de la relación estructura-actividad de análogos de la podofilotoxina llevado a cabo por Kelleher¹⁵⁹, es posible concluir que la configuración del hidroxilo sobre C-7 (anillo B) es de alguna importancia para la actividad antitumoral, pero su comprensión no es sencilla. La epipodofilotoxina (226) (Esq. 71), que difiere de la podofilotoxina (12) en la estereoquímica de C-7, tiene una efectividad como agente citostático un orden de magnitud inferior. No obstante, cambiar el grupo hidroxilo a otra parte de la molécula no tiene un efecto tan drástico en la actividad. Por ejemplo β-peltatina (192), con el hidroxilo en C-2 (anillo A), es un agente antitumoral más activo que la podofilotoxina. Por otra parte desoxipodofilotoxina (219), que carece de grupo hidroxilo, es casi igual de efectiva.

Además se ha observado una reducción significativa de la actividad citotóxica cuando se reemplaza el grupo hidroxilo de β-peltatina por un sustituyente más voluminoso como un metoxilo o una glucosa¹⁵⁹. Aunque la glucosilación de podofilotoxina, para dar podofilotoxina β-D-glucopiranosido, produce una marcada reducción de la actividad, no desaparece por completo. De hecho, los derivados

¹⁵⁹ Kelleher J.K. *Cancer Treatment. Rep.*, **62** (10), 1443-7, (1978)

semisintéticos de la podofilotoxina usados en quimioterapia contra el cáncer han sido modificados precisamente de esta manera.

La disminución de la polaridad del resto glucosídico unido a C-7 por adición de un grupo fenilo, como en el caso de podofilotoxin-bencilideno-glucósido, produce un marcado incremento de la citotoxicidad¹⁵⁹. Esto indica que para la actividad antitumoral, la polaridad del sustituyente en C-7 es bastante más importante que su tamaño.

La configuración de C-8' parece tener un papel importante en la determinación de esta actividad. Picropodofilotoxina (168) difiere de podofilotoxina (12) únicamente en la estereoquímica de C-8' y muestra una marcada atenuación de su actividad como citostático. En cualquier caso, esta clase de modificaciones no son suficientes para eliminar completamente la actividad^{160,161}. La sustitución en la podofilotoxina del anillo lactónico por otro furánico reduce severamente la actividad antitumoral. El compuesto resultante, anhidropodofilolol, posee *in vitro* una toxicidad 3 órdenes de magnitud menor que la podofilotoxina¹⁵⁹.

Finalmente la sustitución 3,4,5-trimetoxi del anillo C no parece ser un requisito en la determinación de la actividad, así el compuesto (220) muestra una actividad casi equivalente a la de la podofilotoxina¹⁵⁹.

Por otra parte, se ha visto que la arctigenina (136) (Esq. 63) y su glucósido, arctiina (137) (Esq. 72) muestran actividad antitumoral relevante contra tumores epiteliales inducidos por 7,12-dimetilbenzantraceno en ratones. La arctigenina también presenta una actividad potente contra cáncer de pulmón inducido con 4-nitroquinolina-N-óxido en ratones¹⁶².

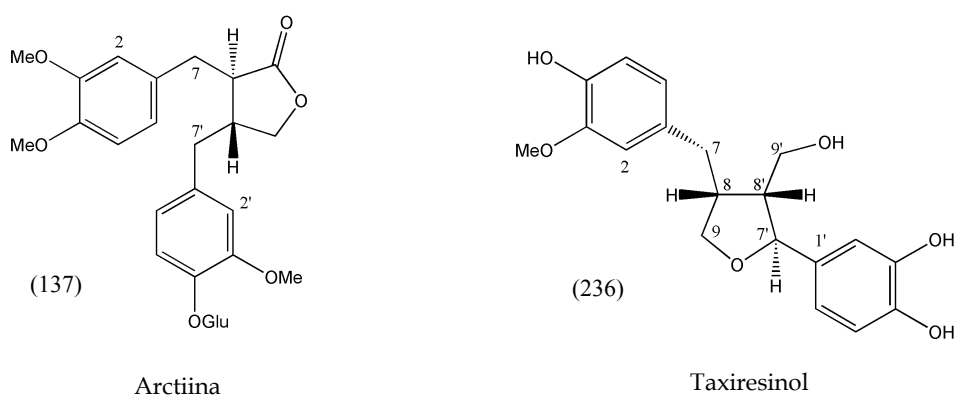
Recientemente, también se ha visto que taxiresinol (236), lignano aislado de *Taxus wallichiana*, muestra *in vitro* una actividad anticancerígena notable contra líneas celulares de cáncer de colon, hígado, ovario y mama¹⁶³.

¹⁶⁰ Hartwell J.L. *Cancer Treatment. Rep.*, **60** (8), 1031-67, (1976)

¹⁶¹ Staehelin H. *Planta Med.*, **22** (3), 336-47, (1972)

¹⁶² Takasaki M., Konoshima T., Komatsu K., Tokuda H., Nishino H. *Cancer Letters*, **158** (1), 53-59, (2000)

¹⁶³ Chattopadhyay S.K., Kumar T.R.S., Maulik P.R., Srivastava S., Garg A., Sharon A., et al. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **11** (23), 4945-4948, (2003)



Esquema 72. Arctiina y taxiresinol

Efectos sobre los ácidos nucleicos

La capacidad de podofilotoxina (12) y varios de sus derivados para influir en el metabolismo de los ácidos nucleicos ha sido estudiada. Tanto podofilotoxina como su derivado etopósido (13) inhiben la síntesis de DNA y RNA en células HeLa a concentraciones de 100 μM . Este efecto se debe a la capacidad que tienen estos compuestos para inhibir rápida y reversiblemente la entrada a la célula de timidina, adenosina, uridina y guanidina por difusión facilitada.

La capacidad de los lignanólidos para causar daños en el DNA ha quedado bien establecida. Se han observado daños en los cromosomas de células tratadas con un derivado de epipodofilotoxina (226) (Esq. 71)¹⁶⁴. Además, se ha visto que algunos análogos de podofilotoxina inducen la aparición de una fracción de DNA de bajo peso molecular, detectable después de la centrifugación en gradiente de densidad¹⁶⁵.

4'-desmetildesoxipodofilotoxina (221), 4-desmetildesoxipodofilotoxina, 4-desmetilepipedofilotoxina, α -peltatina (191), etopósido (13) y tenipósido (209) producen la fragmentación del DNA, mientras que podofilotoxina, desoxipodofilotoxina (219), epipodofilotoxina (226) y β -peltatina (192) no muestran este

¹⁶⁴ Huang C.C., Hou Yu., Wang J.J. *Cancer Res.*, **33** (12), 3123-9, (1973)

¹⁶⁵ Loike J.D., Horwitz S.B. *Biochemistry*, **15** (25), 5443-8, (1976)

efecto¹⁶⁵. Nótese que todos los compuestos que presentan esta actividad poseen un grupo hidroxilo en la posición C-4', mientras que los que no la presentan, no lo poseen.

La fragmentación del DNA por estos lignanos parece estar mediada por algún proceso celular como se desprende del hecho de que al tratar DNA aislado de célula HeLa o de origen viral con estos compuestos, no se detecta fragmentación alguna¹⁶⁵.

No se ha encontrado relación entre el efecto que ejercen estos lignanos sobre la captación de nucleósidos y la fragmentación del DNA, lo que sugiere que estos dos procesos tienen lugar por mecanismos diferentes¹⁶⁵.

Actividad protectora frente a hepatotoxinas

Algunos lignanos de los frutos de *Schizandra chinensis* atenúan los efectos dañinos que tienen ciertas toxinas sobre el hígado, a la vez que facilitan la función y regeneración hepáticas¹⁶. Extractos de esta planta son empleados en la medicina tradicional asiática como tónico, antitumígeno⁹⁵ y en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares¹⁶⁶. Además, los frutos se han empleado en Japón y este de Asia como tratamiento contra la hepatitis aguda¹⁶⁷.

Los frutos de *Schizandra* spp. contienen lignanos del tipo de los dibencilciclooctenos (unión C₈-C₈ y C₂-C₂), como la gomisina A (151) (Esq. 75) que parece tener la capacidad de proteger de un modo eficiente el hígado del daño provocado por compuestos hepatotóxicos tales como tetracloruro de carbono, galactosamina y lipopolisacáridos. Este efecto hepatoprotector se ha correlacionado con varios procesos enzimáticos, como la inhibición de la biosíntesis de leucotrienos al impedir la liberación del ácido araquidónico¹⁶⁸ (Esq. 73). Estos mediadores de origen lipídico, que reciben este nombre al ser descritos por primera vez en leucocitos¹⁶⁹, pueden calificarse de hormonas tisulares ya que ejercen potentes efectos locales¹⁷⁰. Los leucotrienos son constrictores muy poderosos del músculo liso¹⁷¹ y se cree que LTC₄,

¹⁶⁶ Li P.C., Mak D.H.F., Poon M.K.T., Ip S.P., Ko K.M. *Phytomedicine*, **3** (2), 217-21, (1996)

¹⁶⁷ Yamada S., Murawaki Y., Kawasaki H. *Biochemical Pharmacology*, **46** (6), 1081-5, (1993)

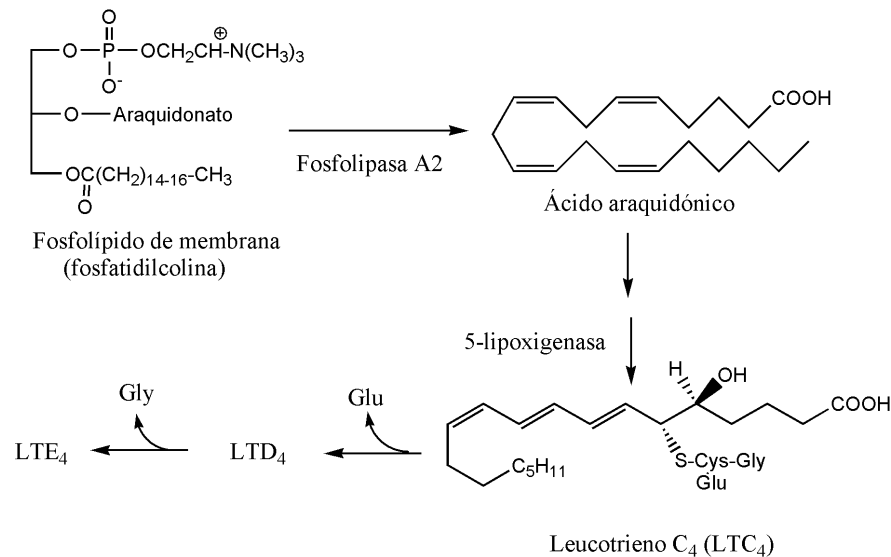
¹⁶⁸ Ohkura Y., Mizoguchi Y., Morisawa S., Takeda S., Aburada M., Hosoya E. *Japan. J. Pharmacol.*, **52** (2), 331-6, (1990)

¹⁶⁹ Rosen F.S., Steiner L.A., Unanue E.R. "Diccionario de inmunología". Ed. Serono. (1992)

¹⁷⁰ Thibodeau G.A., Patton K.T. "Anatomía y Fisiología". Ed. Mosby-Doyma Libros S.A. Segunda edición. (1995)

¹⁷¹ Bohinski R.C. "Bioquímica". Ed. Addison-Wesley Iberoamericana. Quinta edición. (1991)

LTD₄ y LTE₄ son los principales mediadores de la broncoconstricción asmática¹⁷². No obstante, se cree que al igual que otros derivados del ácido araquidónico como prostaglandinas, tromboxanos y lipoxinas, actúan también en el aparato digestivo, respiratorio, reproductor, etc. Su papel parece ser de carácter modulador de otras acciones reguladoras¹⁷³.



Esquema 73. Biosíntesis de leucotrienos. Bohinski¹⁷¹ y Abbas et al¹⁷².

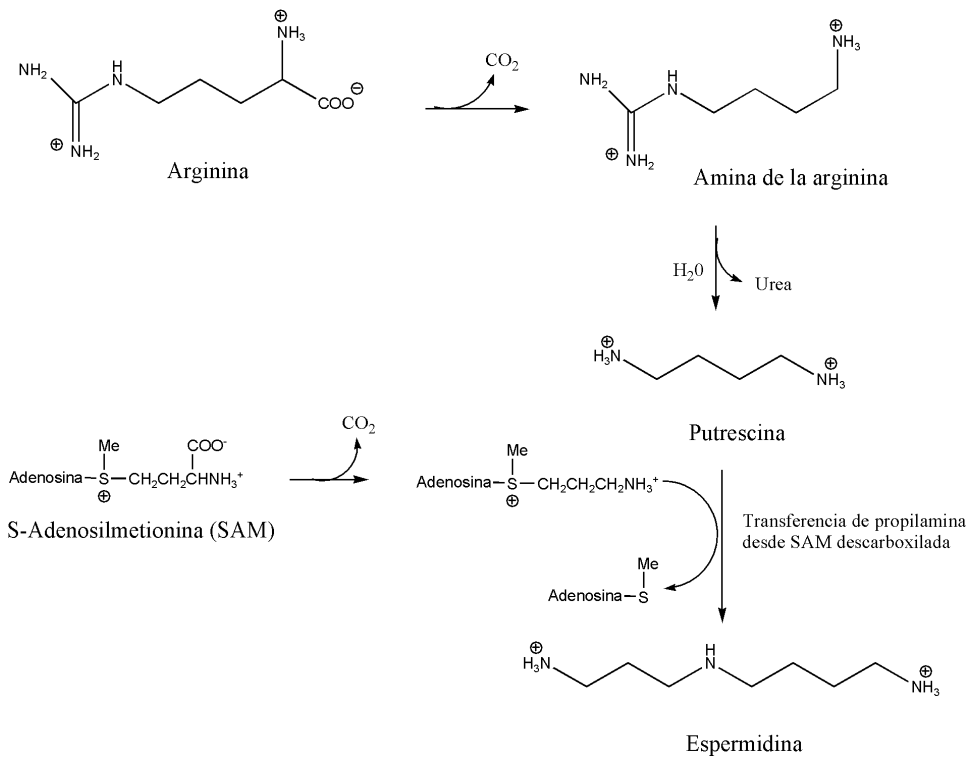
Se ha visto que gomisina A previene el daño hepático en ratas inducido por hepatotoxinas (paracetamol)¹⁶⁷. También estimula la regeneración hepática después de una hepatectomía parcial y se cree que esto ocurre por estimulación de la biosíntesis y acumulación de putrescina y espermidina, poliaminas que desempeñan un papel bioquímico importante en la regeneración hepática¹⁷⁴, así como en la biosíntesis de DNA y RNA¹⁷⁵.

¹⁷² Abbas A.K., Lichtman A.H., Pober J.S. "Inmunología Celular y Molecular". Ed. Interamericana McGraw-Hill. Segunda edición. (1995)

¹⁷³ Barber A., Ponz F. "Principios de Fisiología Animal". Ed. Síntesis S.A. (1998)

¹⁷⁴ Kubo S., Matsui-Yuasa I., Otani S., Morisawa S., Kinoshita H., Sakai K. *J. Surg. Res.*, **41** (4), 401-9, (1986)

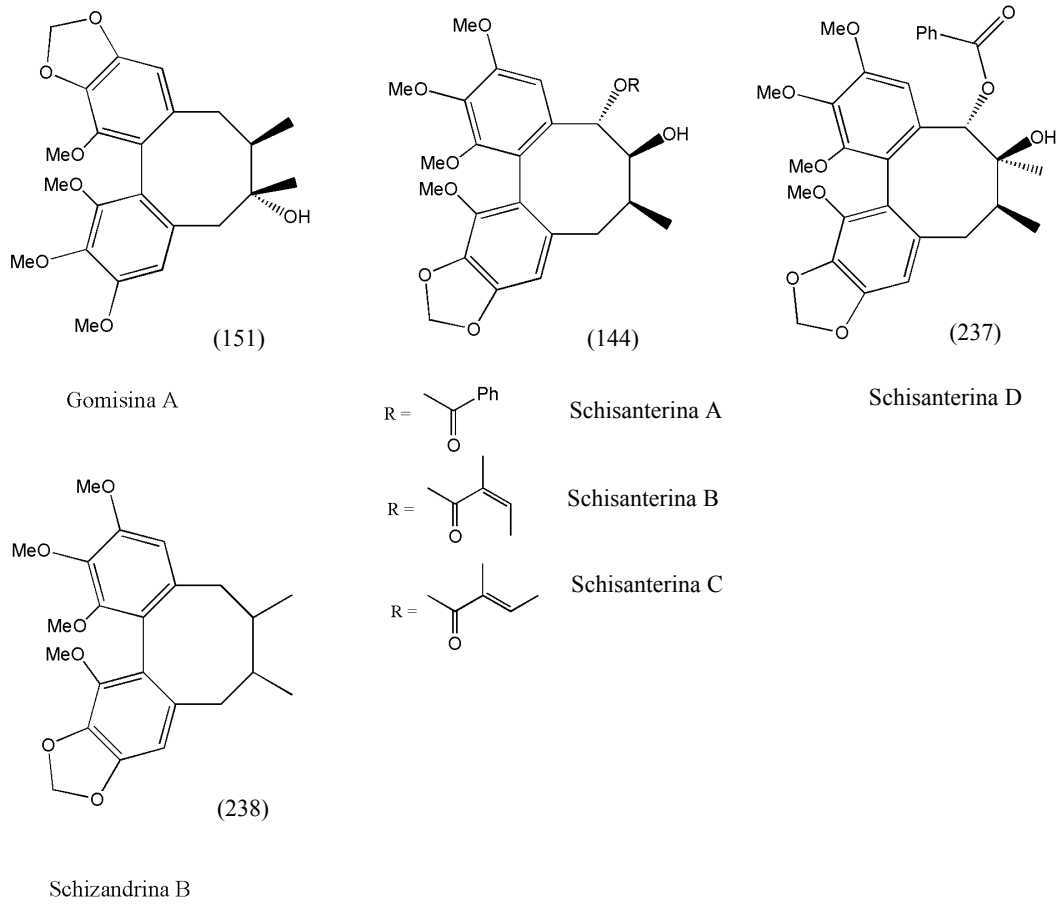
¹⁷⁵ Kubo S., Ohkura Y., Mizoguchi Y., Matsui-Yuasa I., Otani S., Morisawa S., Kinoshita H., et al. *Planta Medica*, **58** (6), 489-92, (1992)



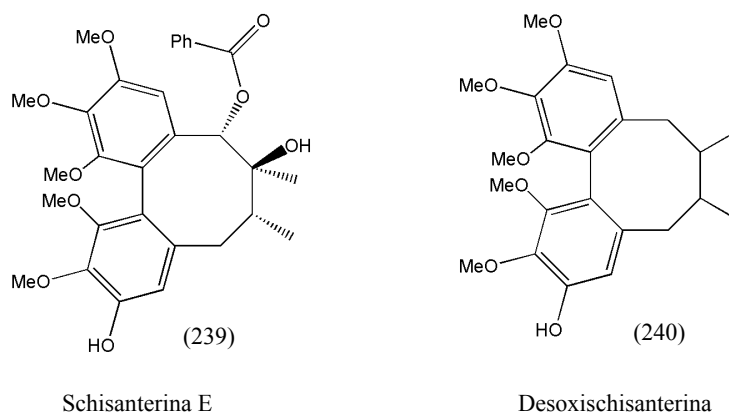
Esquema 74. Biosíntesis de putrescina y espermidina. Bohinski¹⁷¹

Además gomisina A (151) (Esq. 75) inhibe la hepatocarcinogénesis inducida por 3'-metil-4-dimetilamino-azobenceno y reduce el daño muscular inducido por exceso de ejercicio¹⁹. Schizandrina B (238) también posee un efecto hepatoprotector contra los efectos tóxicos de digitoxina e indometacina.

Schisanterinas A, B, C (144) y D (237) (Esq. 75) protegen el hígado y disminuyen los niveles séricos del GPT. Esta actividad ha sido demostrada tanto en ratones como en pacientes humanos con hepatitis de etiología vírica¹⁶. Es interesante el hecho de que los compuestos que presentan esta actividad poseen al menos un grupo metilendioxi en su estructura (Esq. 75), mientras que otros lignanos que son inactivos, como es el caso de schisanterina E (239) y desoxischisanterina (240) (Esq. 76), carecen de este sustituyente¹⁶. Esto sugiere que el grupo metilendioxi es necesario para poseer la actividad protectora frente a hepatotoxinas.



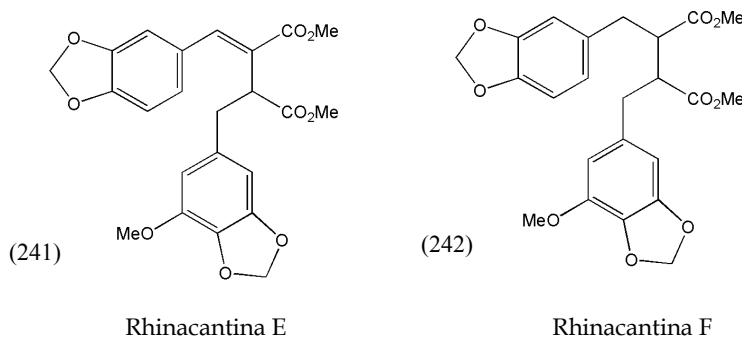
Esquema 75. Dibencilciclooctenolignanos con actividad protectora frente a hepatotoxinas.



Esquema 76. Dibencilciclooctenolignanos sin actividad hepatoprotectora frente a hepatotoxinas

Actividad antivírica

Muchos lignanos han demostrado poseer una potente actividad antiviral. Así pues se ha observado que el extracto crudo de *Podophyllum peltatum* reduce el efecto citopático del herpes simple tipo II, de influenza A y del virus vaccinia¹⁷⁶. Podofilotoxina (12), α -peltatina (191), β -peltatina (192), desoxipodofilotoxina (219) y picropodofilotoxina son activas frente al virus del sarampión y el herpes simple tipo I¹⁷⁷. Podofilotoxina y (-)- α -peltatina son activos contra el citomegalovirus murino¹⁷⁸. Rhinacantina E (241) y rhinacantina F (242) (Esq. 77), aisladas de la planta medicinal *Rhinacanthus nasutus* (Acanthaceae), muestran actividad contra el virus de la influenza tipo A¹⁹.



Esquema 77. Lignanos con actividad frente al virus de la gripe

Varios lignanos inhiben la replicación del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), aunque con diferentes mecanismos de acción. (-)-Arctigenina (136) y (-)-traquelogenina (49) inhiben la replicación de HIV-1 en células humanas infectadas. (-)-Arctigenina suprime la integración del DNA proviral en el genoma celular¹⁷⁹, pero es inactiva frente a la integrasa¹⁸⁰ purificada del HIV-1. En cambio desmetilarctigenina (243) muestra una fuerte inhibición de dicha enzima¹⁸⁰.

¹⁷⁶ May G., Willuhn G. *Drug Res.*, **28** (1), 1-7, (1978)

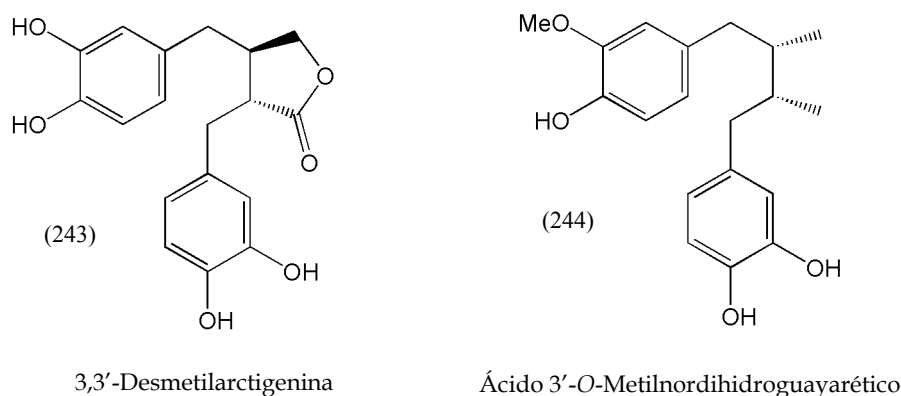
¹⁷⁷ Bedows E., Hatfield G.M. *J. Nat. Prod.*, **45** (6), 725-9, (1982)

¹⁷⁸ MacRae W.D., Hudson J.B., Towers G.H. *Planta medica*, **55** (6), 531-5, (1989)

¹⁷⁹ Pfeifer K., Merz H., Steffen R., Mueller W.E.G., Trumm S., Schulz J., Eich E., Schroeder H.C. *J. Pharm. Med.*, **2**, 75-97, (1992)

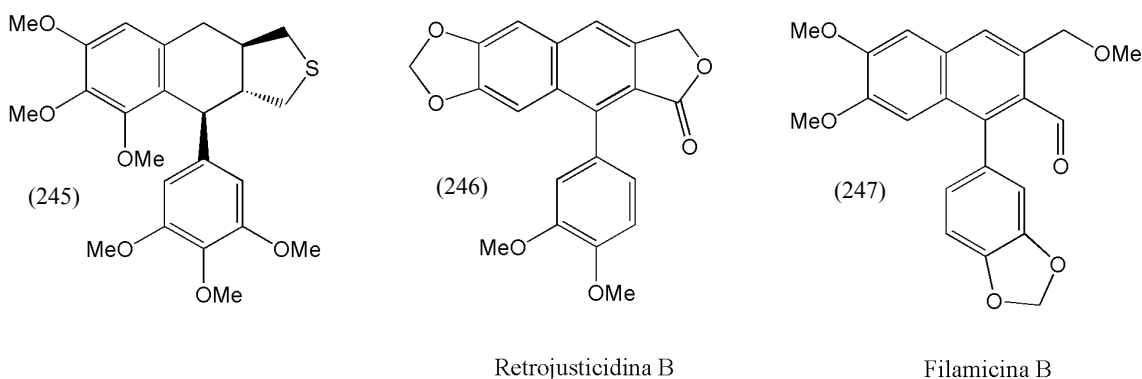
¹⁸⁰ Eich E., Pertz H., Kaloga M., Schulz J., Fesen M.R., Mazumder A., Pommier Y. *J. Med. Chem.*, **39** (1), 86-95, (1996)

El ácido 3'-O-metilnordihidroguayarético (244) (Esq. 78) inhibe *in vivo* la transactivación de la transcripción viral regulada por Tat, interrumpiendo el ciclo vital del HIV de tipo salvaje y mutante¹⁹.



Esquema 78. Lignanos con actividad contra el HIV

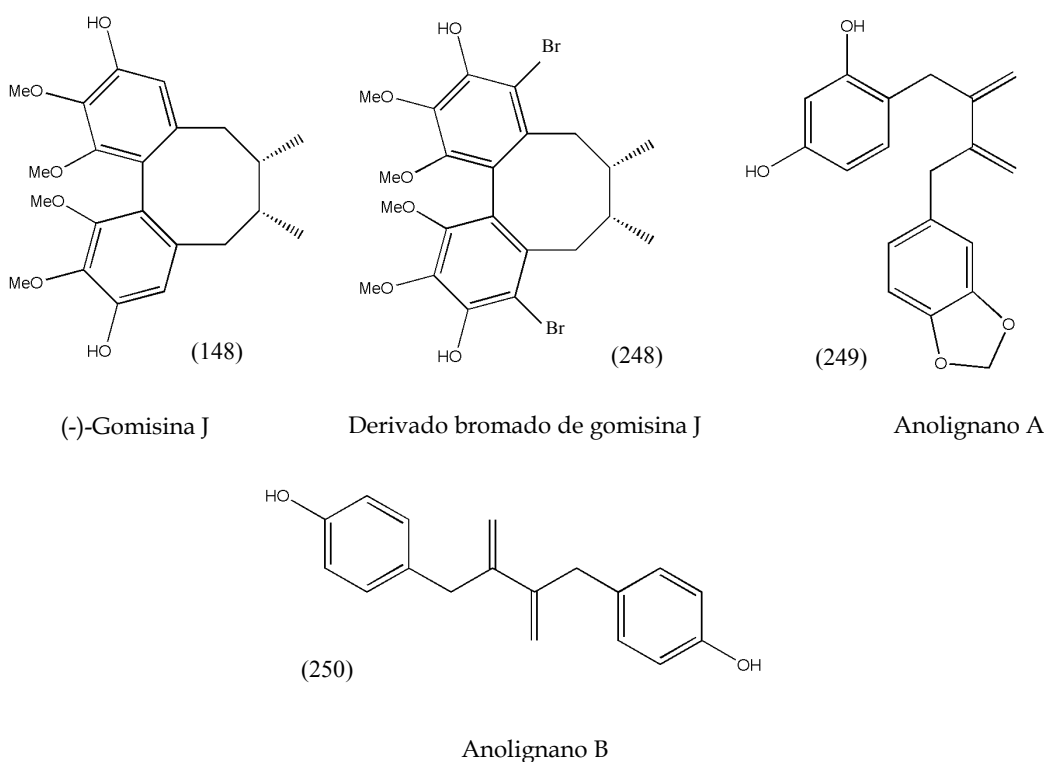
También los análogos de lignanos ariltetrahidronaftalénicos han demostrado tener actividad anti HIV-1 siendo el compuesto 245 el más activo de todos ellos. Este compuesto, al igual que en el caso de los lignanos arilnaftalénicos retrojusticidina B (246) y filamicina B (247) de *Phyllanthus myrtifolius* (Euphorbiaceae), es un inhibidor no competitivo de la transcriptasa inversa del HIV-1¹⁸¹.



Esquema 79. Lignanos con actividad anti-HIV

¹⁸¹ Chang C.-W., Lin M.-T., Lee S.-S., Chen Liu K.C.S., Hsu F.-L., Lin J.-Y. *Antiviral Res.*, **27** (4), 367-74, (1995)

De los lignanos de *Schizandra* spp. examinados en busca de actividad anti-HIV, se encontró que (-)-gomisina J (148) (Esq. 80) muestra efectos beneficiosos, mientras que las gomisinas A (151) (Esq. 44), D y N (145) (Esq. 43), desoxischizandrina y (+)-gomisina J, no¹⁸². El derivado bromado de (-)-gomisina J (248) (Esq. 80) es 33 veces más efectivo que (-)-gomisina J y es también efectivo contra el HIV-1 resistente al AZT (3'-azido-3'-desoxitimidina) junto al que ejerce una acción sinérgica¹⁹. Finalmente, anolignano A (249) y anolignano B (250), de *Anogeissus acuminata* (Combretaceae), muestran una acción sinérgica en la inhibición de la transcriptasa inversa del HIV-1¹⁸³. Así pues, el anolignano B muestra una actividad muy baja cuando es probado solo, que se vuelve elevada al ser combinado con el anolignano A. De igual modo, la actividad de este último es menor solo que cuando está en presencia del anolignano B.

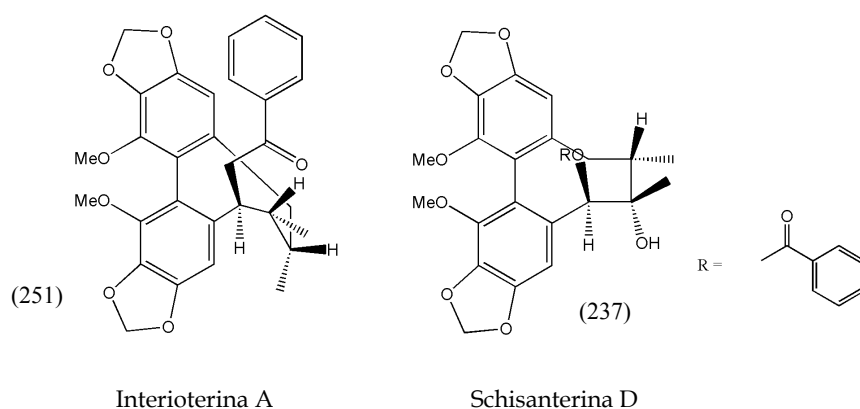


Esquema 80. Lignanos activos contra el HIV

¹⁸² Fujihashi T., Hara H., Sakata T., Mori K., Higuchi H., Tanaka A., Kaji H., Kaji A. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **39** (9), 2000-7, (1995)

¹⁸³ Rimando A.M., Pezzuto J.M., Farnsworth N.R., Santisuk T., Reutrakul V., Kawanishi K. *J. Nat. Prod.*, **57** (7), 896-904, (1994)

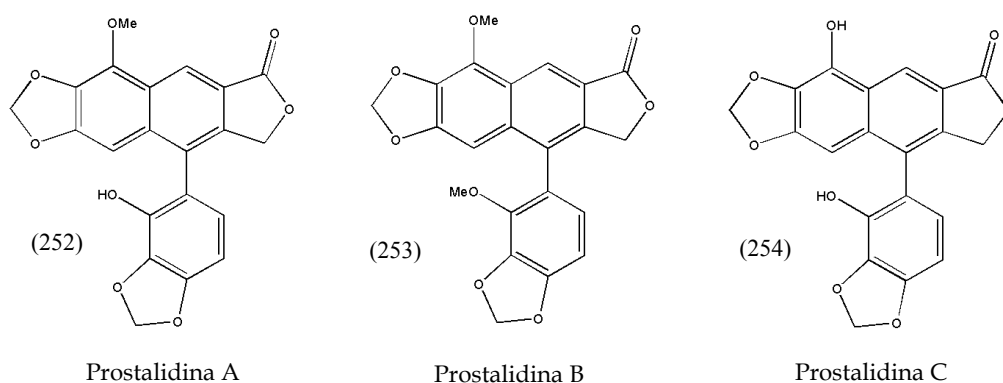
Interioterina A (251) y schisanterina D (237) aisladas de *Kadsura interior* (Schizandraceae), inhiben la replicación del HIV¹⁸⁴.



Esquema 81. Lignanos de *Kadsura interior* con actividad anti-HIV

Actividad sobre el sistema nervioso central

Algunos lignanos tienen capacidad para actuar como depresores del SNC mientras que otros actúan como estimulantes. Así pues (+)-nortraquelogenina (101) (Esq. 26) deprime el SNC en conejos¹⁸⁵, mientras que prostralidinas A (252), B (253) y C (254) (Esq. 82) de *Justicia prostata* (Acanthaceae), endémica del oeste del Himalaya, muestran actividad activadora del SNC¹⁸⁶. Otros lignanos de especies de *Schizandra* también muestran esta actividad¹⁸⁷.



Esquema 82. Lignanos de *Justicia prostata* con actividad estimulante del SNC

¹⁸⁴ Chen D.-F., Zhang S.-X., Chen K., Zhou B.-N., Wang P., Cosentino L.M., Lee K.-H. *J. Nat. Prod.*, **59** (11), 1066-8, (1996)

¹⁸⁵ Kato A., Hashimoto Y., Kidokoro M. *J. Nat. Prod.*, **42** (2), 159-62, (1979)

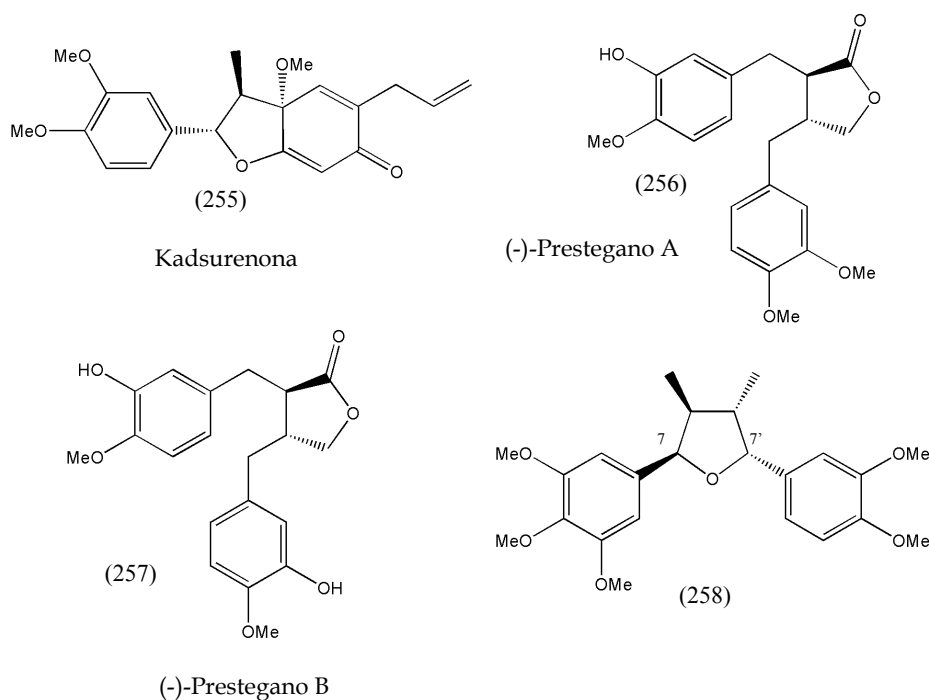
¹⁸⁶ Ghosal S., Banerjee S., Frahm A.W. *Chem. Ind.*, (23), 854-5, (1979)

¹⁸⁷ Yan-Yong C., Zeng-Bao S., Liang-Niang L. *Scientia Sin.*, **19** (2), 276-90, (1976)

Actividad sobre el factor activador de plaquetas

El factor activador de plaquetas (PAF) es un fosfolípido bioactivo identificado por Snayder et al. en 1985. Este mediador químico es liberado de plaquetas, basófilos, neutrófilos, macrófagos y muchas otras células en respuesta a estímulos apropiados. El PAF actúa en varias respuestas hematológicas incluyendo la agregación plaquetaria y de neutrófilos, siendo además un importante mediador del asma y de la respuesta inflamatoria y alérgica, que implica broncoconstricción e incremento de la permeabilidad vascular^{142,172}. Los inhibidores del PAF son interesantes ya que son potenciales antiasmáticos, antialérgicos y antiinflamatorios.

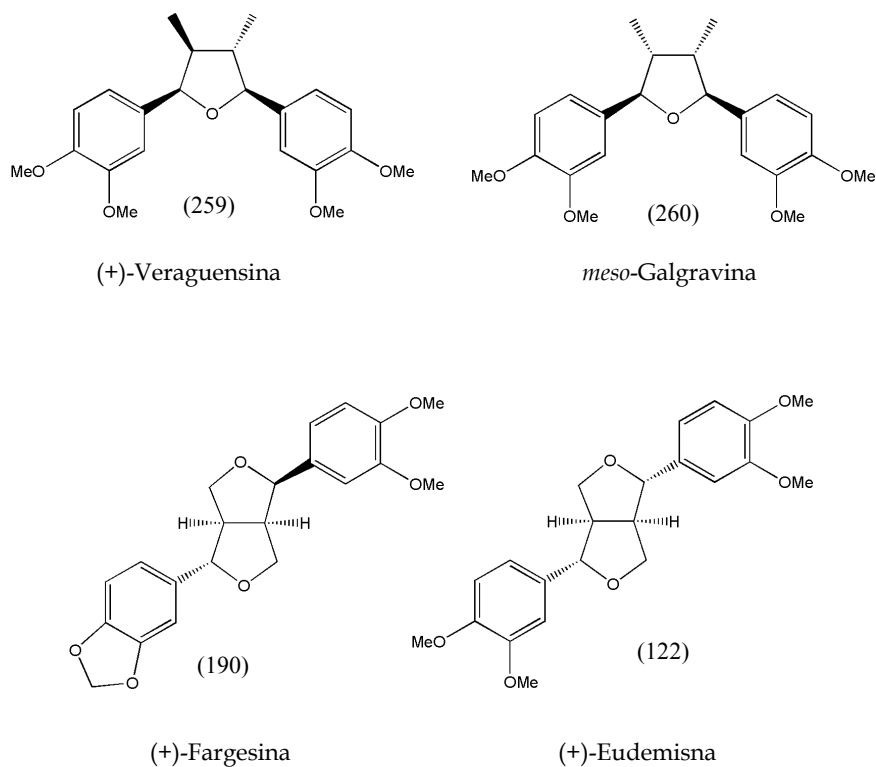
El neolignano kadsurenona (255) (Esq. 83), aislado de *Piper futokadsura* (Piperaceae), es un inhibidor del PAF en la agregación de neutrófilos humanos y además contrarresta los cambios cardiovasculares inducidos en conejos y el shock endotóxico en ratas¹⁴². Las Kadsureninas C (109) y H (110) (Esq. 30) aisladas de *Piper kadsura* también son activas como inhibidores del PAF⁵¹. Otros inhibidores son el ácido (+)-dihidroguayarético (171), metoximatairesinol, los presteganos A (256) y B (257) (Esq. 83) y el burserano (38) siendo este último un inhibidor moderado¹⁴². No obstante la atención se ha centrado principalmente en los lignanos tetrahidrofuránicos con la estructura 7,7'-epoxi, tales como el compuesto 258 de origen sintético y que se ha mostrado como el más activo con CI_{50} de $0.02 \mu M$ ¹⁴².



Esquema 83. Lignanos con actividad inhibidora del PAF

Los lignanos de este grupo de origen natural también son efectivos a concentraciones de entre 1 y 3 μM , como es el caso de (+)-veraguensina (259) (Esq. 84), (+)-galbelgina y *meso*-galgravina (260)¹⁴².

También se han detectado antagonistas del PAF en lignanos furofuránicos aislados de flores de *Magnolia biondii*, usada en medicina china para el tratamiento del dolor de cabeza y la sinusitis. Los lignanos de esta planta, con mayor actividad inhibidora del PAF son fargesina (190) (Esq. 84) ($\text{DE}_{50} = 1.3 \mu\text{M}$) y dimetilpinoresinol (eudesmina) (122) ($\text{DE}_{50} = 1.7 \mu\text{M}$). Otros lignanos de *Magnolia kobus* (Esq. 37) han mostrado actividad contra la dermatitis de contacto¹⁴².

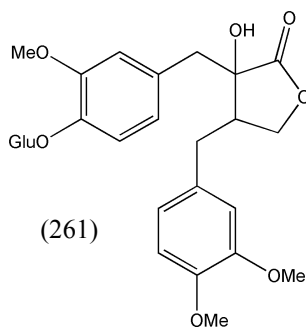


Esquema 84. Lignanos con actividad inhibidora del PAF

Actividad sobre el tracto gastrointestinal

Los extractos de especies del género *Podophyllum* son conocidos por su capacidad para producir catarsis, considerándose que es la podofilotoxina su constituyente activo. No obstante, en la actualidad se sabe que dicho efecto se debe también a α -peltatina, β -peltatina y 4'-desmetilpodofilotoxina¹⁶.

La resina de *Podophyllum* produce una disminución tanto de la velocidad inicial como de la amplitud de las contracciones rítmicas en el intestino aislado, seguido de un incremento en la fuerza de contracción y disminución del tono. De forma similar la inyección intravenosa de podofilotoxina produce un incremento de la peristalsis y del tono intestinal, respuesta que no se altera al seccionar los nervios vago o esplácnico ni por efecto de la atropina¹⁶. Pero la actividad catártica no parece estar restringida a podofilotoxina y sus análogos ya que, de las flores molidas de *Carthamus tinctorius* (Asteraceae), se ha aislado un lignano (2-hidroxiarctiina (261), (Esq. 85)) con dicha actividad en animales de laboratorio y que impide que la harina de las flores pueda ser utilizada con fines alimentarios¹⁸⁸.



Esquema 85. 2-Hidroxiarctiina

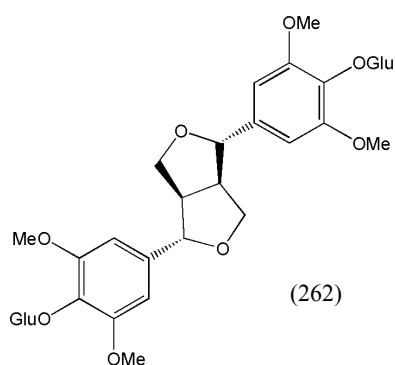
¹⁸⁸ Palter R., Lundin R.E., Haddon W.F. *Phytochemistry*, **11** (9), 2871-4, (1972)

Efectos cardiovasculares

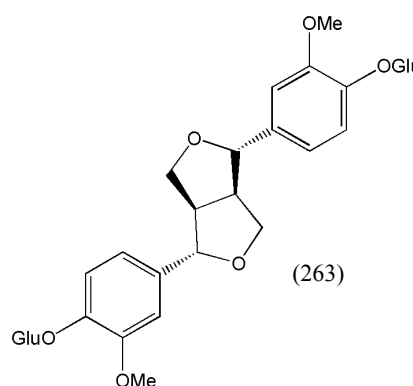
También existen lignanos que tienen actividad sobre el sistema cardiovascular. *Acanthopomax senticosus*, conocida como ginsen de Siberia, se emplea ampliamente en Asia para ayudar al sistema cardiovascular durante el ejercicio prolongado¹⁸⁹. Esta actividad se atribuye a (+)-siringaresinol di-*O*- β -D-glucósido (262)¹⁹⁰ (Esq. 86).

El diglucósido del pinoresinol (263) es el constituyente activo de la planta medicinal china *Eucommia ulmoides* usada como hipertensiva¹⁹¹.

Por otra parte, se ha visto que la yangambina (124) previene el colapso cardiovascular durante el shock anafiláctico y el shock séptico, previniendo además la falta de respuesta cardiovascular a las catecolaminas durante este último¹⁹².



(+)-Siringaresinol di-*O*- β -D-glucopiranosido



(+)-Pinoresinol di-*O*- β -D-glucopiranosido

Esquema 86. Lignanos con actividad sobre el sistema cardiovascular

¹⁸⁹ Farnsworth R., Kinghorn A.D., Soejarto D.D., Waller D.P. "Economic and Medicinal Plant Research". Ed. Wagner H, Hikino H., Farnsworth N.R. Academic Press, London, vol. 1, p155, (1985)

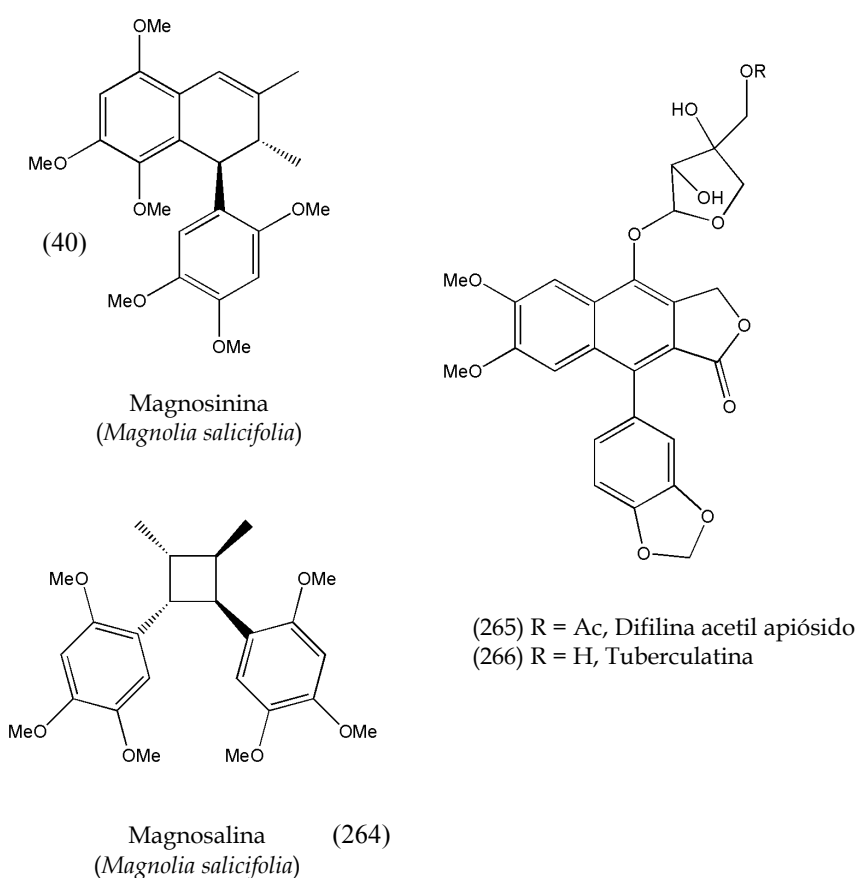
¹⁹⁰ Nishibe S., Kinoshita H., Takeda H., Okano G. *Chem. Pharm. Bull.*, **38** (6), 1763-5, (1990)

¹⁹¹ Sih G.J., Ravikumar P.R., Huang F.-C., Bucker C. and Whitlock H. *J. Am. Chem. Soc.*, **98** (17), 5412-3, (1976)

¹⁹² Tibiriça E. *Cardiovascular Drug Reviews*, **19** (4), 313-28, (2001)

Actividad antiinflamatoria

Magnosinina (40) y magnosalina (264) (Esq. 87), dos lignanos aislados de *Magnolia salicifolia* que poseen una sustitución en su anillo A inusual en lignanos, muestran efectos antiinflamatorios comparables al acetato de hidrocortisona^{193,194}. Los lignanos arilnaftalénicos difilina acetil apiósido (265) y tuberculatina (266) son activos contra la inflamación inducida por TPA (acetato de 12-O-tetradecanoilforbol)¹⁹⁵.



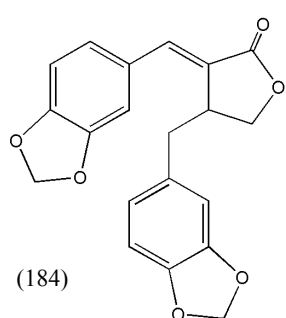
Esquema 87. Lignanos con actividad antiinflamatoria

¹⁹³ Kimura M., Suzuki J., Yamada T., Yoshizaki M., Kikuchi T., Kadota S., Matsuda S. *Planta Medica*, **51** (4), 291-3, (1985)

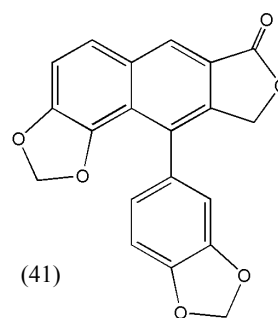
¹⁹⁴ Kadota S., Tsubono K., Makino K., Takeshita M., Kikuchi T. *Tetrahedron Lett.*, **28** (25), 2857-60, (1987)

¹⁹⁵ Prieto J.M., Recio M.C., Giner R.M., Máñez S., Massmanian A., Waterman P.G., Ríos J.L. *J. Biosciences*, **51** (9-10) 618-22, (1996)

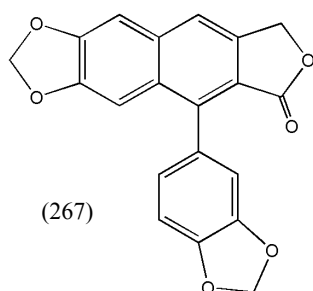
Se ha visto que los lignanos savinina (184), helioxantina (41), taiwanina C (267) y *cis*-dibencilbutirolactona (268) (Esq. 88) aislados de la raíz de *Acanthopanax chiisanensis* (Araliaceae), una planta medicinal coreana, inhiben la producción inducida por TPA, de prostaglandina E₂, importante mediador de la respuesta inflamatoria. De estos cuatro lignanos el inhibidor más potente es la taiwanina C, seguida de la helioxantina, *cis*-dibencilbutirolactona y savinina¹⁹⁶.



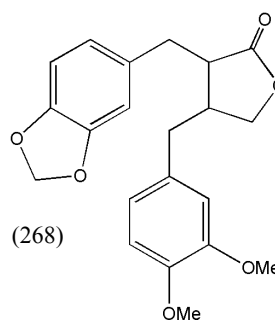
Savinina



Helioxantina



Taiwanina C

*cis*-Dibencilbutirolactona

Esquema 88. Lignanos con actividad antiinflamatoria

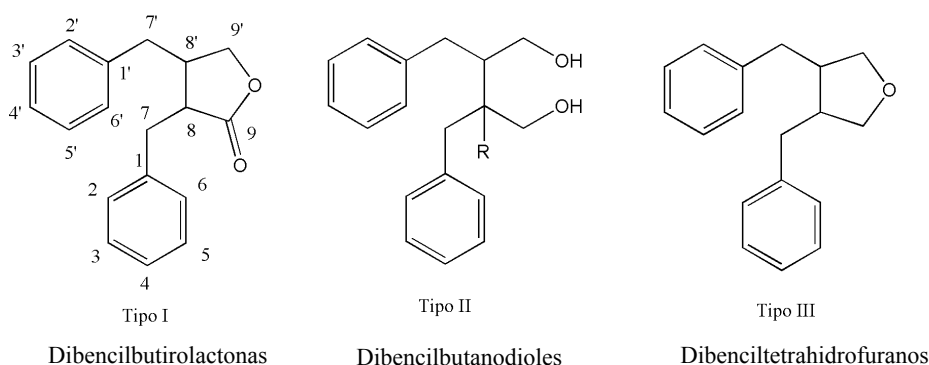
¹⁹⁶ Ban H.S., Lee S., Kim Y.P., Yamaki K., Shin K.H., Ohuchi K. *Biochemical Pharmacology*, **64** (9), 1345-54, (2002)

Enterolignanos

En 1979, el papel biológico de los lignanos y su importancia para la comunidad científica cobraron una nueva dimensión de la noche a la mañana cuando, simultáneamente en Finlandia y Reino Unido, fueron detectados en el hombre y otros primates¹⁹⁷.

En la actualidad, estos lignanos, conocidos como Lignanos de Mamíferos o Enterolignanos, están en el punto de mira no sólo de los químicos de productos naturales sino que también han captado el interés de los bromatólogos e investigadores de varias ramas de la medicina, así como de la industria farmacéutica y de la alimentación.

Aunque, como se ha visto, los lignanos presentan diversos tipos de esqueletos carbonados, los enterolignanos pueden ser clasificados en sólo tres grupos que difieren en su nivel de oxidación (Esq. 89): las dibencilbutirolactonas (tipo I), los dibencilbutanodiolos (tipo II) y los dibenciltetrahidrofuranos (tipo III).



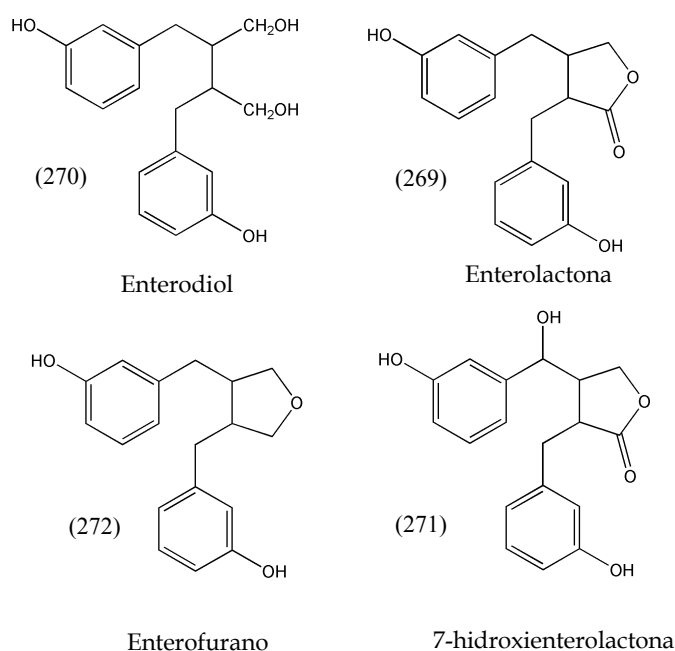
Esquema 89. Tipos de enterolignanos

Los enterolignanos se aislaron por primera vez en forma de glucurónidos en la orina de humanos, monos y ratas, siendo identificados como *trans*-3,4-bis(3-hidroxibencil)-dihidro-2-furanona (269) (enterolactona, ENL, Tipo I) y como 2,3-bis(3-hidroxibencil)-butano-1,4-diol (270) (enterodiol, END, Tipo II) (Esq. 90).

Hoy en día se sabe que éstos son los dos tipos de lignanos más importantes presentes en el suero, saliva, orina, bilis y fluidos seminales de los mamíferos; de hecho

¹⁹⁷ Raffaelli B., Hoikkala A., Leppälä E., Wähälä K. *Journal of Chromatography B*, 777 (1-2), 29-43, (2002)

ENL es un componente normal y relativamente abundante del semen y fluido prostático en humanos^{198,199}. Se han encontrado otros enterolignanos en la orina humana^{200,201}: *trans*-3-(3-hidroxibencil)-4-[(hidroxi-(3-hidroxifenil)-metil]-dihidro-2-furanona (271) (7-hidroxienterolactona, HENL, Tipo I) y *trans*-3,4-bis(3-hidroxibencil)-tetrahydrofuran (272) (enterofurano, ENF, Tipo III).



Esquema 90. Enterolignanos

Desde el punto de vista estructural, los enterolignanos se caracterizan por poseer un hidroxilo fenólico sólo en la posición *meta* de cada uno de sus dos anillos aromáticos³⁵. Sus precursores metabólicos, los lignanos de vegetales, pueden llevar además sustituyentes en posiciones *orto* y *para* de sus anillos aromáticos, tales como hidroxilos, metoxilos o grupos metilendioxi.

El enterodiol y la enterolactona son sintetizados por las bacterias en el tracto intestinal²⁰², en condiciones anaeróbicas y a partir de lignanos procedentes de las

¹⁹⁸ Morton M.S., Chan P.S.F., Cheng C., Blacklock N., Matos-Ferreira A., Abranches-Monteiro L., Correia R., Lloyd S., Griffiths K. *Prostate*, **32** (2), 122-8, (1997)

¹⁹⁹ Morton M.S., Matos-Ferreira A., Abranches-Monteiro L., Correia R., Blacklock N., Chan P.S.F., Cheng C., Lloyd S., Wu C.P., Griffiths K. *Cancer Lett.*, **114** (1-2), 145-51, (1997)

²⁰⁰ Adlercreutz H. *Environ. Health Perspect.*, **103** (suppl. 7), 103-12, (1995)

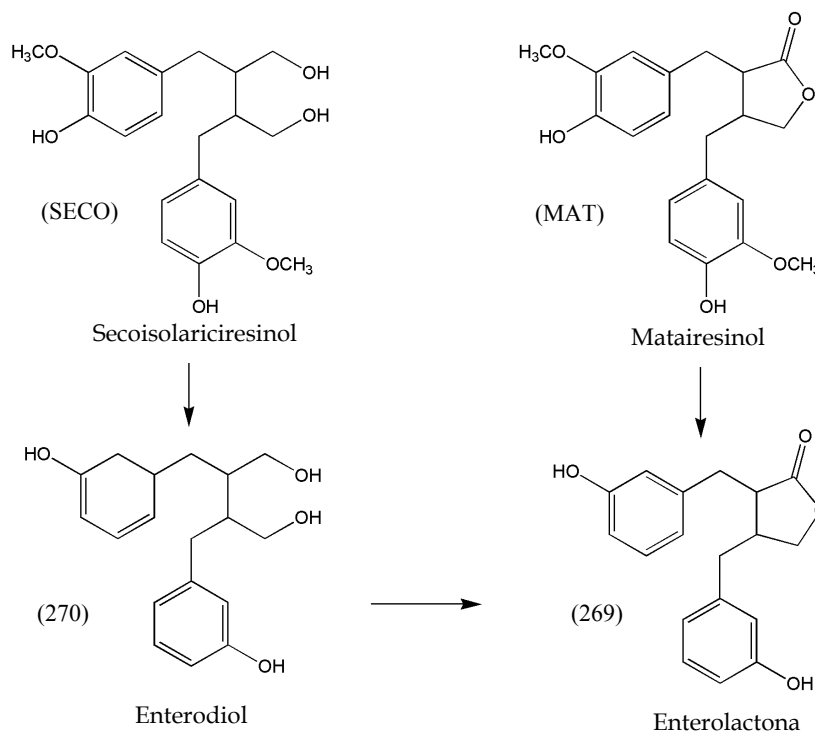
²⁰¹ Liggins J., Grimwood R., Bingham S.A. *Anal. Biochem.*, **287** (1), 102-9, (2000)

²⁰² Axelson M., Setchell K.D.R. *FEBS Lett.*, **123** (2), 337-42, (1981)

plantas, que los animales ingieren con la dieta; se cree que principalmente cereales integrales (cebada, centeno y trigo), semillas, nueces, legumbres y verduras. No obstante, como se verá más adelante, estos alimentos no parecen tener suficiente contenido en lignanos o glucósidos de los mismos para explicar por sí solos los niveles de ENL y END excretados en orina, por lo tanto deben existir otras fuentes de lignanos vegetales precursores.

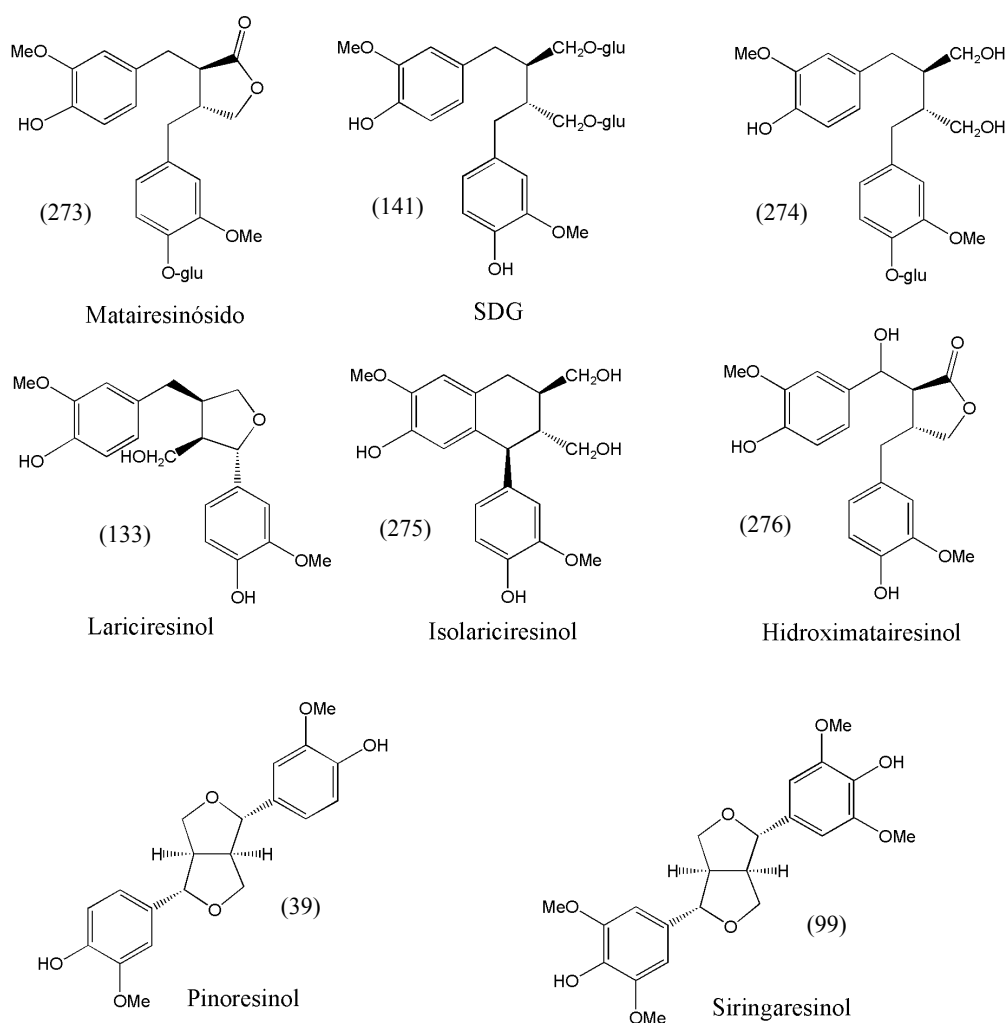
Precusores de enterolignanos

Dos de los precursores vegetales de la enterolactona y el enterodiol son el matairesinol (MAT) y el secoisolariciresinol (SECO), respectivamente. Los microorganismos de la flora intestinal pueden también transformar el enterodiol en enterolactona (Esq. 91).



Esquema 91. Biotransformaciones microbianas de SECO, MAT, ENL y END

Estos lignanos se encuentran, en los alimentos que los contienen, principalmente en forma de glucósidos que se absorben poco en el intestino delgado debido a su polaridad y al ser β -glucósidos resisten la hidrólisis por parte de las enzimas digestivas de los mamíferos. No obstante, los glucósidos del MAT y del SECO, tales como el matairesinósido (273), el diglucósido del secoisolariciresinol (SDG) (141), principal lignano de la semilla del lino y el secoisolariciresinol 4-O- β -D-glucopiranosido (274), son hidrolizados fácilmente a sus correspondientes agliconas por las β -glucosidasas que están ampliamente distribuidas entre los microorganismos de la flora intestinal^{203,204}.



Esquema 92. Precursores de enterolignanos

²⁰³ Rowland I.R., Wiseman H., Sanders T.A., Adlercreutz H., Bowey E.A. *Nutr. Cancer*, **36** (1), 27-32, (2000)

²⁰⁴ Adlercreutz H., Mazur W., Bartels P., Elomaa V., Watanabe S., Wähälä K. et al. *J. Nutr.*, **130** (3), 658S-9S, (2000)

Otros lignanos considerados precursores de ENL y END (Esq. 92) son lariciresinol (133), isolariciresinol (275) e hidroximatairesinol (276)^{205,206,207}. Este último, el más abundante de los lignanos de *Picea abies* (abeto rojo o árbol de navidad), es metabolizado a ENL como principal metabolito, después de ser administrado por vía oral a ratas de laboratorio, siendo proporcional la cantidad de ENL excretada a la dosis de hidroximatairesinol suministrada²⁰⁷. Más recientemente se ha encontrado que el pinoresinol (39) y el siringaresinol (99), presentes en el centeno, son también precursores de END y ENL²⁰⁸.

Debido a los efectos beneficiosos que los lignanos parecen tener sobre la salud, especialmente en enfermedades coronarias y prevención de determinados tipos de cáncer, se ha producido un incremento notable del consumo de alimentos ricos en estos compuestos (salvados, semillas oleaginosas como el lino, girasol y amapola, cereales como el centeno, avena y cebada y fruta). Por esta razón, es conveniente disponer de datos fiables del contenido en lignanos de los diferentes alimentos. Actualmente existen dos métodos para tal fin, uno directo y otro indirecto²⁰⁹.

El método directo se basa en la hidrólisis de los glucósidos de lignanos presentes en los alimentos con enzimas hidrolíticas tales como las β -glucuronidasas, frecuentemente combinada con hidrólisis ácida y posterior análisis de las agliconas (SECO y MAT) por HPLC ó GC-MS. El método indirecto, desarrollado por Thompson et al.²¹⁰, consiste en simular *in vitro* la fermentación que ocurre en el colon por microorganismos y determinar así la producción de END y ENL a partir de sus correspondientes precursores vegetales (MAT y SECO). Los resultados obtenidos para 68 alimentos diferentes se muestran en el Esquema 93. Como se puede observar, con alimentos basados en semillas de lino la producción de lignanos (END y ENL) es 75 veces mayor que con algas (el segundo en importancia de los grupos de alimentos productores de lignanos) y 804 veces mayor que con las frutas (el grupo de alimentos con menor producción de lignanos).

²⁰⁵ Bannwart C., Adlercreutz H., Fotsis T., Wähälä K., Hase T., Brunow G. *Finn. Chem. Lett.*, (4-5), 120-5, (1984)

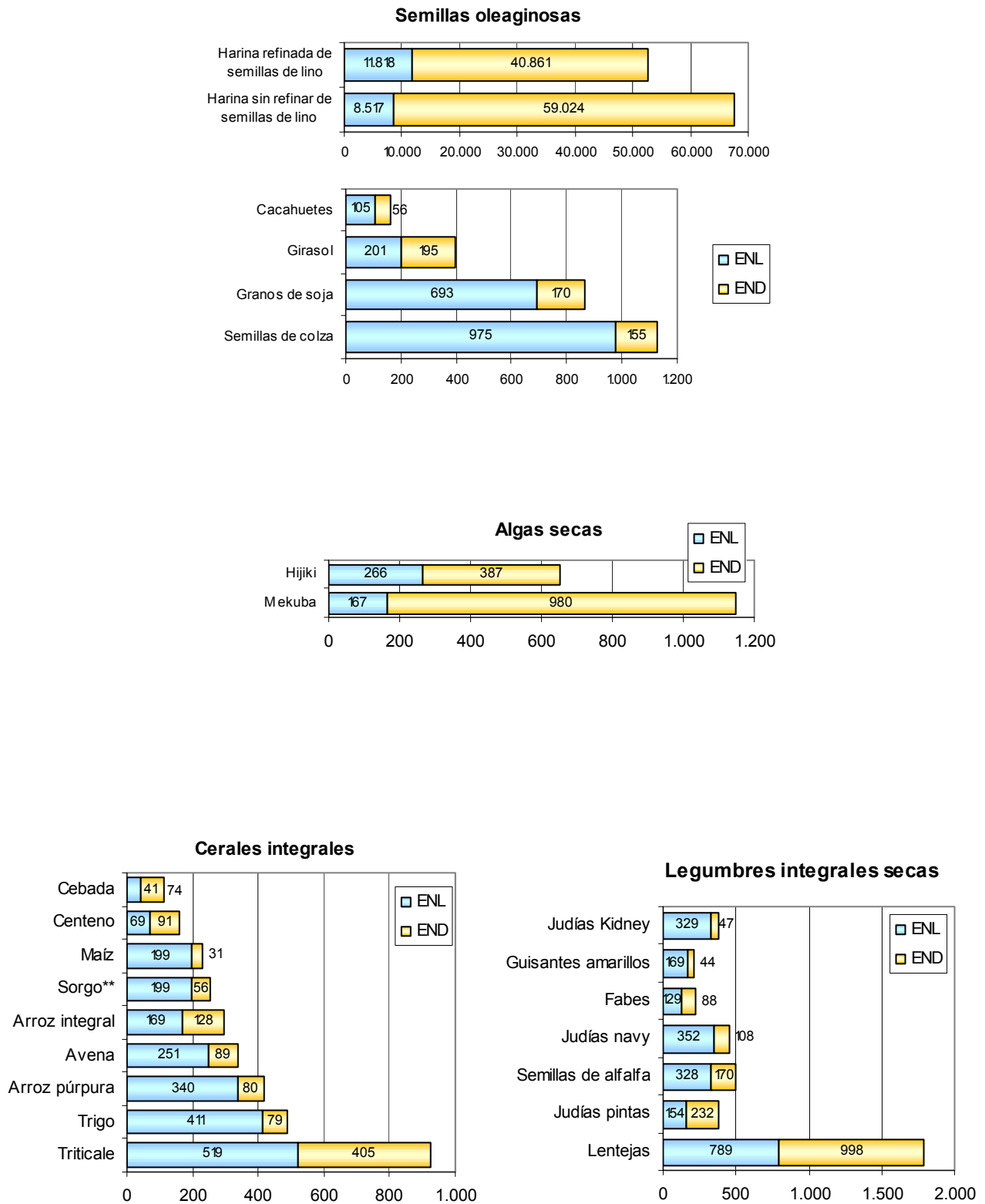
²⁰⁶ Bannwart C., Adlercreutz H., Wähälä K., Brunow G., Hase T. *Clin. Chim. Acta*, **180** (3), 293-301, (1989)

²⁰⁷ Saarinen N.M., Warri A., Makelä S.I., Eckerman C., Reunanen M., Ahotupa M., Salmi S.M., Franke A.A., Kangas L., Santti R. *Nutr. Cancer*, **36** (2), 207-16, (2000)

²⁰⁸ Heinonen S., Nurmi T., Liukkonen K., Poutanen K., Wähälä K., Deyama T., Nishibe S., Adlercreutz H. *J. Agric. Food. Chem.*, **49** (7), 3178-86, (2001)

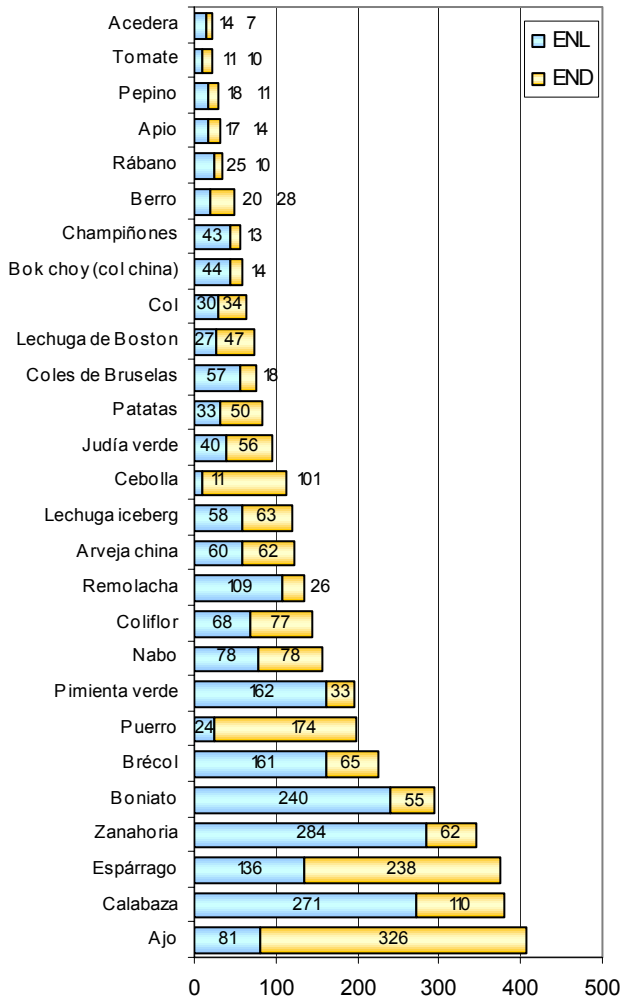
²⁰⁹ Meagher L.P., Beecher G.R. *J. Food Compos. Anal.*, **13** (6), 935-47, (2000)

²¹⁰ Thompson L.U., Robb P., Serraino M., Cheung F. *Nutr. Cancer*, **16** (1), 43-52, (1991)

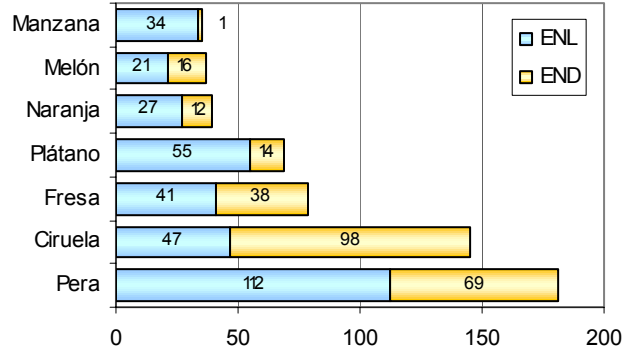


Esquema 93a. Determinación del contenido en ENL y END (µg / 100 g de muestra) por el método indirecto. Thompson et al.²¹⁰

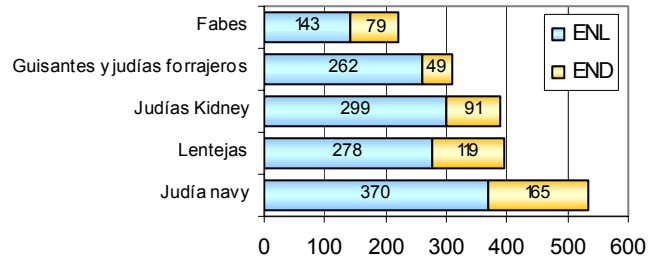
Verduras



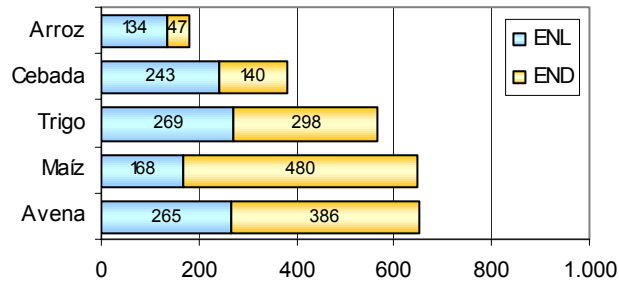
Frutas



Vainas de legumbres



Salvado de cereales



Esquema 93b. Determinación del contenido en ENL y END (µg / 100 g de muestra) por el método indirecto. Thompson et al.²¹⁰

Por lo general, para la mayoría de los alimentos la fermentación *in vitro* da valores más elevados en comparación con el análisis directo. Las excepciones en este sentido son las semillas oleaginosas (lino, girasol, cacahuete) que por análisis directo dan valores ligeramente mayores que por análisis indirecto. En cambio, con frutas y verduras se observa el patrón opuesto con mayores valores para ENL y END (método indirecto) que para lignanos de plantas (SECO y MAT) .

Es posible que con alimentos con alto contenido en lignanos tales como las semillas de lino, la microflora intestinal no sea capaz de metabolizar todos los precursores a ENL y END, obteniéndose valores inferiores por el método indirecto²⁰⁹.



Linum usitatissimum

La fuente vegetal más rica de lignanos es la semilla del lino (*Linum usitatissimum*)^{209,211} que contiene la concentración de SECO más alta que cualquier otro alimento (28-369 mg/100 g).

Los niveles posprandiales en orina y sangre de ENL y END procedentes de los lignanos de la semilla de lino ingeridos con la dieta, dependen del tiempo y de la dosis, aunque no del tipo de procesado a que son sometidas estas semillas²¹².

²¹¹ Cunnane S.C., Thompson L.U. (Eds.). Flaxseed in Human Nutrition, AOCS, Champaign, IL, (1995)

²¹² Nesbitt P.D., Lam Y., Thompson L.U. *American Journal of Clinic Nutrition*, **69** (3), 549-55, (1999)

En cualquier caso, el consumo de dichas semillas por parte de la mayoría de la población es bajo y no basta para explicar los niveles de enterolignanos en humanos²¹³.

Generalmente, se considera que las fuentes de lignanos en la dieta humana son diferentes tipos de cereales integrales, entre los que destacan el centeno y la cebada. No obstante, hay estudios^{208,214,215} que muestran que su contenido en SECO, MAT y otros lignanos es demasiado bajo para explicar los niveles de ENL y END excretados en orina, por lo tanto se ha sugerido la existencia de otros precursores.

Begum et al.²¹³ proponen que la lignina (Esq. 94) es el precursor principal de los enterolignanos. La unidad estructural más común de este polímero es el guayacilpropano, que procede del alcohol coniferílico (31), por lo que la lignina está estructuralmente muy relacionada con los lignanos SECO y MAT, que presentan la misma sustitución en sus anillos aromáticos. Algunos tipos de lignina, como la que se encuentra en los cereales, también contienen unidades de siringilpropano y *p*-hidroxifenilpropano que provienen de los alcoholes sinapílico (33) y cumarílico (32), respectivamente. Estos autores examinaron las contribuciones respectivas de los lignanos y la lignina en la formación de enterolignanos. Para ello midieron la producción de ENL y END en ratas de laboratorio alimentadas, bien con salvado de cereales, que posee tanto lignina como lignanos, o bien con salvado al que se le han extraído los lignanos y que, por tanto, sólo contiene lignina. Además, midieron la excreción de ENL deuterada al alimentar ratas de laboratorio con lignina sintética deuterada.

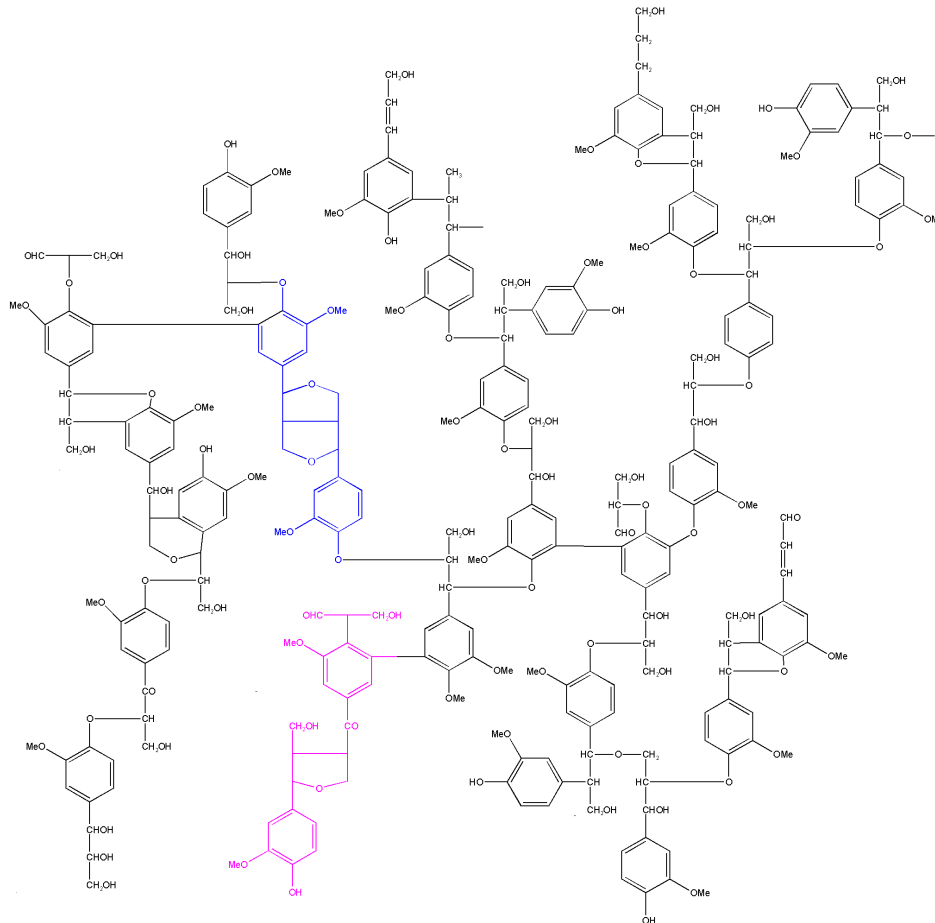
Atendiendo a los resultados obtenidos, los autores proponen que la lignina, hasta ahora considerada como inerte en el tracto digestivo, es por el contrario metabolizada por la microflora intestinal, dando lugar a parte de los enterolignanos excretados en la orina.

²¹³ Begum A.N., Nicolle C., Mila I., Lapierre C., Nagano K., Fukushima K., Heinonen S.M., Adlercreutz H., Remesy C., Scalbert A. *J. Nutr.*, **134** (1), 120-7, (2004)

²¹⁴ Juntunen K.S., Mazur W.M., Liukkonen K.H., Uehara M., Poutanen K.S., Adlercreutz H.C. & Mykkanen H.M. *Br. J. Nutr.*, **84** (6), 839-46, (2000)

²¹⁵ Nicolle C., Manach C., Morand C., Mazur W., Adlercreutz H., Rémésy C. & Scalbert A. *J. Agric. Food Chem.*, **50** (21), 6222-6, (2002)

Esto explicaría la ausencia de actividad óptica de ENL y END excretados en la orina, ya que la biosíntesis de la lignina ocurre a través de una polimerización radicalaria, no controlada enzimáticamente^{213,216}. Esto contrasta con la biosíntesis de lignanos en las plantas, que es estereoselectiva y conduce a la formación de dímeros ópticamente activos.



Las estructuras de pinosresinol y lariciresinol se muestran en color azul y fucsia, respectivamente

Esquema 94. Estructura de la lignina

²¹⁶ Barceló Coll J., Nicolás Rodrigo G., Sabater García B., Sánchez Tamés R. "Fisiología Vegetal". Ed. Pirámide, sexta edición actualizada. p. 39, (1992)

Metabolismo microbiano

Recientemente, se ha propuesto una posible ruta de transformación de SDG en END y ENL. Wang et al.²¹⁷ aislaron 7 metabolitos (277, 278, 279, 280, 281, END y ENL) (Esq. 95), tras incubar anaeróbicamente SDG con una suspensión fecal humana. Además, se aislaron dos bacterias, *Peptostreptococcus sp.* SDG-1 y *Eubacterium sp.* SDG-2, capaces de desmetilar y deshidroxilar respectivamente.

En la ruta propuesta, la desmetilación precedería a la deshidroxilación, ya que los compuestos 278 y 280, derivados desmetilados del matairesinol, se forman con un periodo de incubación de 20-30 h, mientras que los productos resultantes de la deshidroxilación, 279, 281, END y ENL, se forman después de las 48 h de incubación.

Empleando una metodología similar, Xie et al.²¹⁸ han propuesto una ruta biosintética hipotética que conduce desde el diglucósido del pinosresinol (PDG) (282) a ENL y que se muestra en el Esquema 96.

Una vez formados, END y ENL son absorbidos en el tracto gastrointestinal y llegan al hígado donde son conjugados principalmente con los ácidos glucurónico y sulfúrico por acción de UDP glucuronosiltransferasa y sulfotransferasas, respectivamente, para luego ser excretados con la bilis y reabsorbidos^{35,202,219,220}. Este patrón fisiológico se parece a la circulación enterohepática del colesterol, ácidos biliares, pigmentos biliares, vitamina B12, etc.

Los enterolignanos se encuentran en el plasma principalmente como lignanos libres o como mono y disulfatos²²¹, en la orina como monoglucuronidos²²² y en las heces como compuestos libres²²³.

²¹⁷ Wang L.Q., Meselhy M.R., Li Y., Qin G.W., Hattori M. *Chem. Pharm. Bull.*, **48** (11), 1606-10, (2000)

²¹⁸ Xie L., Akao T., Hamasaki K., Deyama T., Hattori M. *Chem. Pharm. Bull.*, **51**(5), 508-15, (2003)

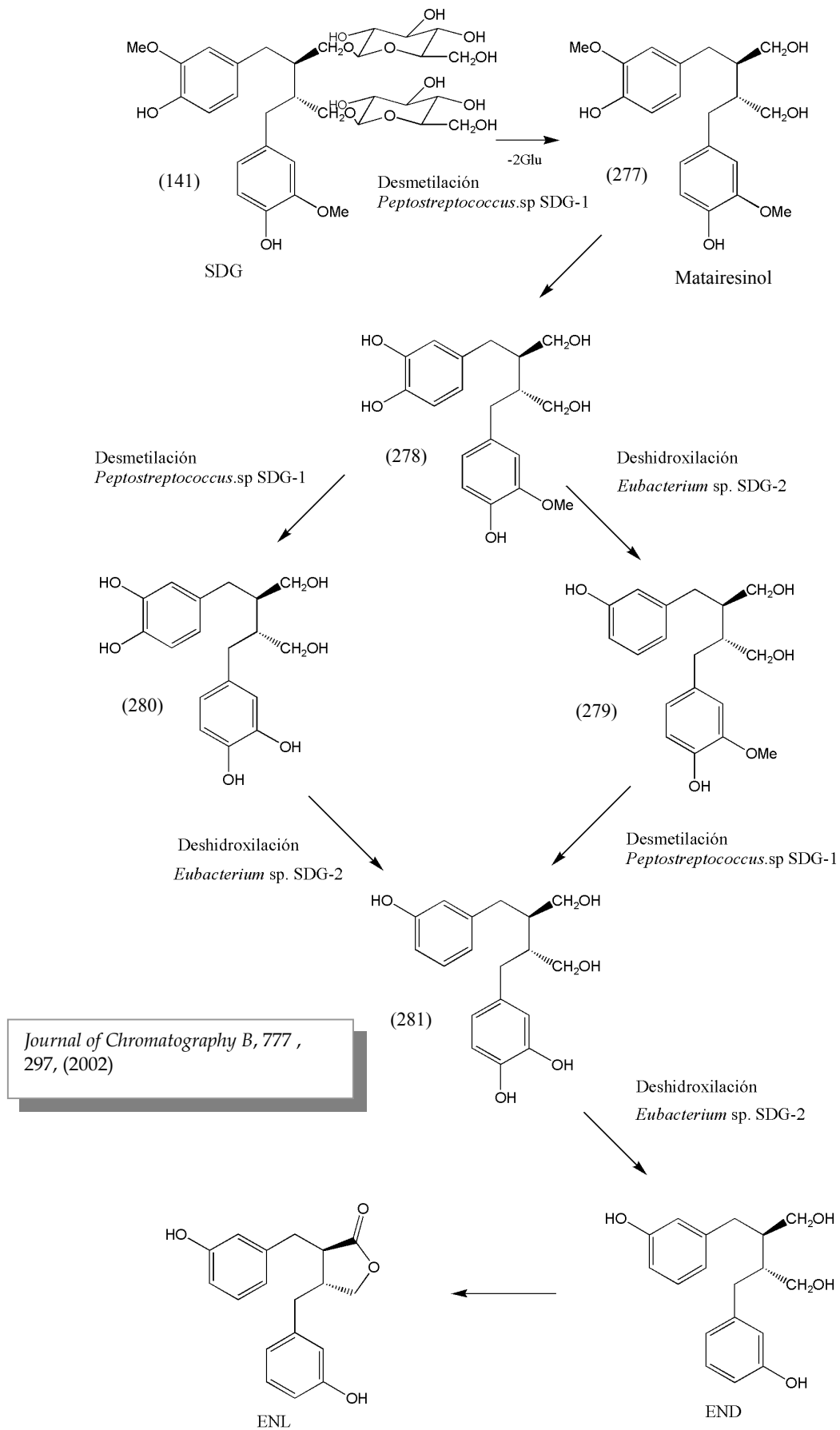
²¹⁹ Mazur W. *Phytoestrogens: Occurance in Foods, and Metabolism of Lignans in Man and Pigs*, PhD dissertation University of Helsinki, Finland, (2000)

²²⁰ Adlercreutz H., van der Wildt J., Kinzel J. et al. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **52** (1), 97-103, (1995)

²²¹ Adlercreutz H., Fotsis T., Lampe J., Wähälä K. et al. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **53** (Suppl. 215) 5-18, (1993)

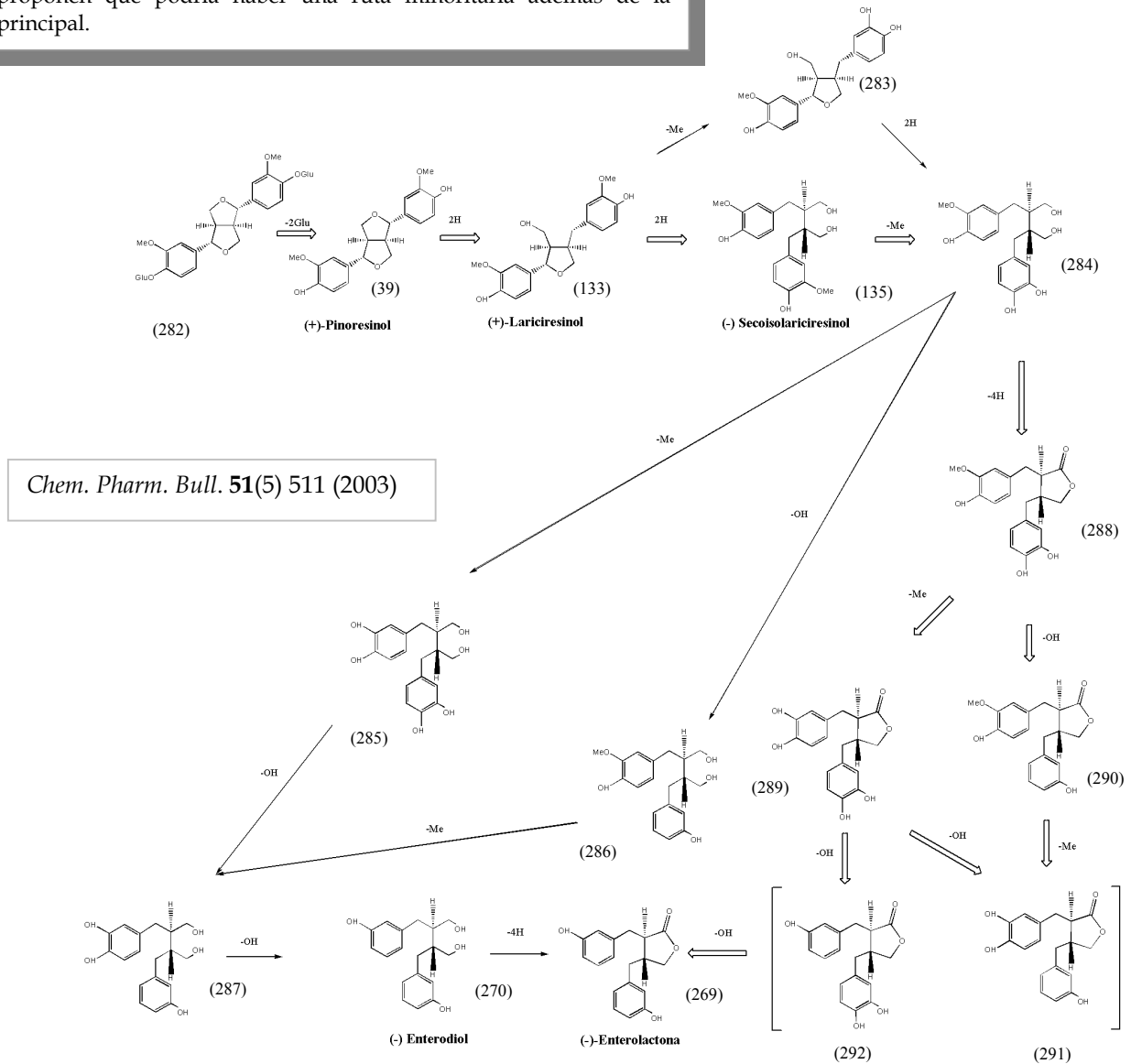
²²² Axelson M., Setchell K.D.R. *FEBS Lett.*, **122** (1), 49-53, (1980)

²²³ Adlercreutz H., Fotsis T., Kurzer M.S., Wähälä K. et al. *Anal. Biochem.*, **225** (1), 101-108, (1995)



Esquema 95. Posible ruta para la formación de ENL a partir de SDG

⇨ indica la ruta principal. → indica la ruta minoritaria.
 Dado que los metabolitos **283** y **285-287** y ENL fueron aislados en cantidades muy pequeñas en comparación con los otros, los autores proponen que podría haber una ruta minoritaria además de la principal.



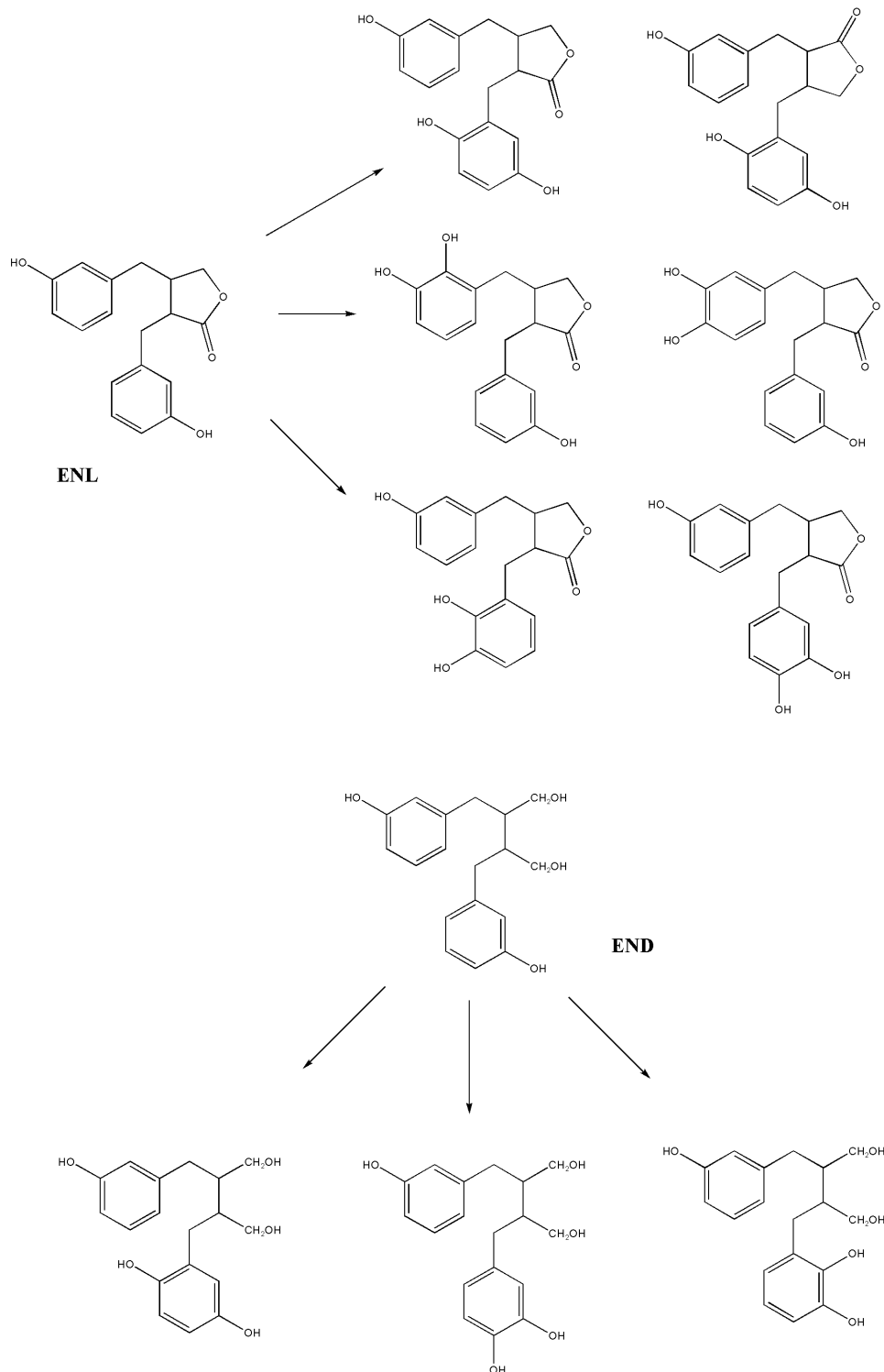
Esquema 96. Posible ruta para la transformación de diglucósido del pinosresinol en enterodiol y enterolactona.

Recientes descubrimientos^{224,225} han revelado que microsomas hepáticos de ratas y humanos son capaces de hidroxilar a END y ENL en posiciones aromáticas (Esq. 97).

²²⁴ Niemeyer H.B., Honig D., Lange-Böhmer A., Jacobs E., Kulling S.E., Metzler M. *J. Agric. Food Chem.*, **48** (7), 2910-9, (2000)

²²⁵ Jacobs E., Metzler M. *J. Agric. Food Chem.*, **47** (3), 1071-7, (1999)

Después de una dieta suplementada con semillas de lino²²⁶, se identificaron en la orina humana lignanos similares con un grupo hidroxilo adicional en posiciones *orto* y *para* de cada anillo aromático. Esto sugiere que el metabolismo oxidativo es un rasgo común en la eliminación de estos lignanos en los mamíferos.



Esquema 97. Metabolitos formados en los microsomas a partir de ENL y END

²²⁶ Jacobs E., Kulling S.E., Metzler M. J. *Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, **68** (5-6), 211-8, (1999)

Actividades biológicas de los enterolignanos.

Efectos sobre la salud

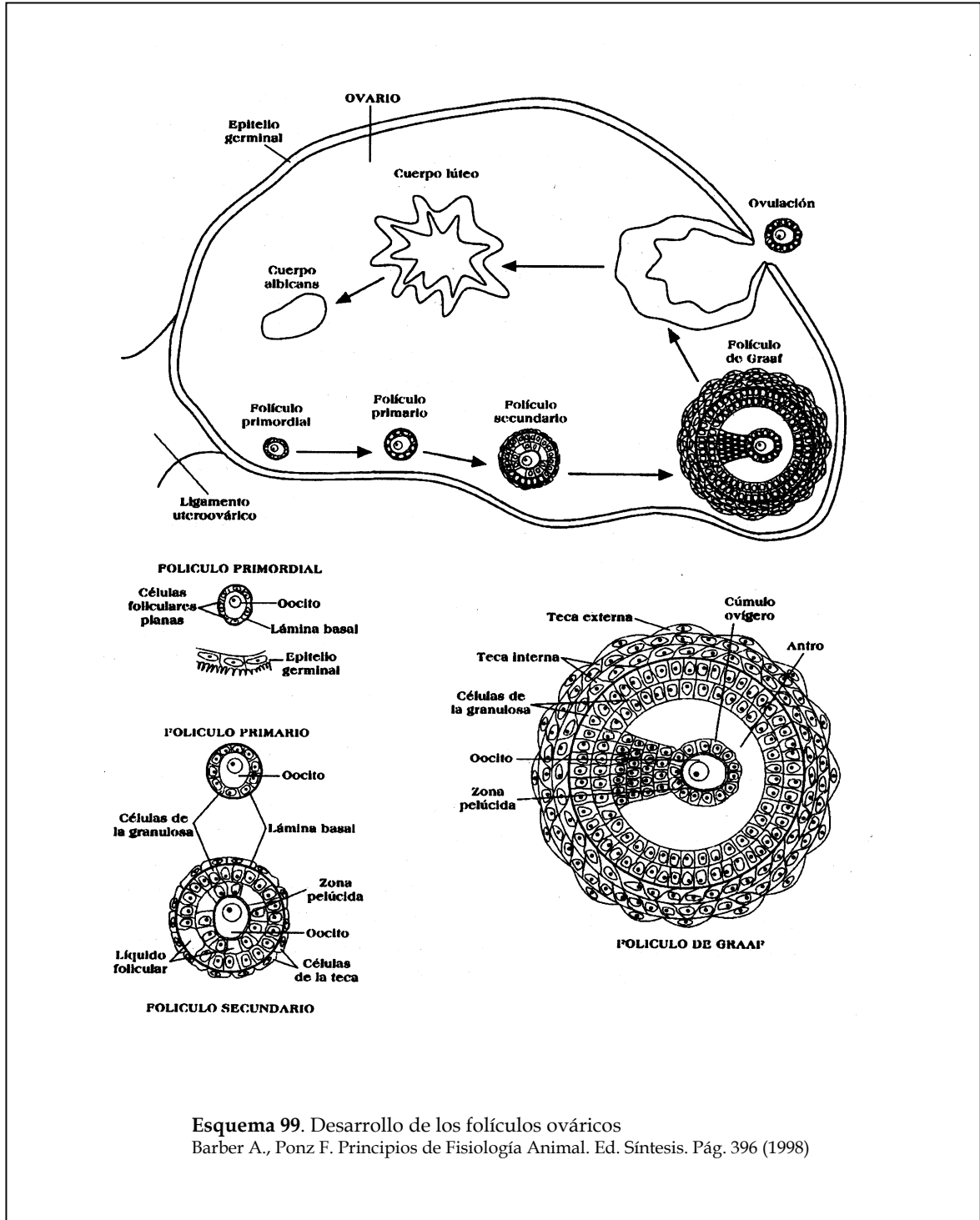
Tanto *in vivo* como *in vitro*, los enterolignanos muestran varias actividades biológicas, tales como actividad antioxidante, antitumoral, antiestrogénica, débilmente estrogénica e inhibición de enzimas implicadas en el metabolismo de las hormonas sexuales.

La producción de lignanos antiestrogénicos en el intestino de los mamíferos a partir de lignanos procedentes de la dieta, puede servir para proteger contra el cáncer de mama en mujeres, cáncer de próstata en varones y cáncer de colon¹⁹⁷; de hecho ENL se usa como biomarcador predictivo del riesgo de desarrollar estos tipos de cáncer así como enfermedades cardiovasculares. El efecto protector de los enterolignanos puede deberse a su capacidad para competir con el estradiol por el receptor para estrógenos de tipo II, a su capacidad para inducir a la globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG), a que inhibe la aromatasa de la placenta y a sus efectos antioxidantes³⁵.

Actividad estrogénica y antiestrogénica.

Los estrógenos son los responsables del crecimiento y desarrollo de los órganos sexuales femeninos, de los caracteres sexuales secundarios y del instinto sexual. Influyen sobre el crecimiento de los huesos, el metabolismo de las grasas y la formación de depósitos subcutáneos de éstas en zonas características tales como mamas y muslos. En humanos, los estrógenos más importantes son el estradiol, la estrona y el estriol, siendo el primero el más potente. Estas hormonas son segregadas por las células de la teca interna y granulosa de los folículos ováricos, el cuerpo lúteo, la placenta y en pequeñas cantidades por la corteza suprarrenal y los testículos²²⁷. La estrona y el estriol se sintetizan en el hígado a partir del estradiol.

²²⁷ Ganong F. "Fisiología Médica". Ed. El Manual Moderno, (1990)



Los denominados fitoestrógenos son un grupo de sustancias de origen vegetal que incluyen isoflavonas, cumestanos y lignanos que, como los estrógenos, se unen a su correspondiente receptor, un miembro de una amplia superfamilia de receptores nucleares de hormonas cuya expresión es inducida por el propio ligando y que a su

vez regula la expresión de genes de respuesta a los estrógenos²²⁸. Los fitoestrógenos pueden actuar como agonistas (respuesta estrogénica) o antagonista (respuesta antiestrogénica), o bien tener una respuesta selectiva agonista/antagonista, lo cual está determinado por múltiples factores^{229,230}. Estos compuestos tienen como común denominador un grupo fenólico que comparten con los estrógenos y que, al parecer, desempeña un importante papel determinando las propiedades agonistas/antagonistas de estos compuestos.

Desde un principio se sugirió que ENL podía tener importancia fisiológica, ya que sigue un patrón de excreción cíclico en las mujeres durante el ciclo menstrual, con niveles máximos en orina durante la fase lútea del mismo. También se ha detectado un incremento en la excreción durante la primeras etapas del embarazo.

Por otra parte, la suplementación de la dieta con semillas de linaza (10 g/día), puede aumentar la duración de la fase lútea del ciclo menstrual (Phipps et al.²³¹). Esto indica el papel relevante que tienen los lignanos en la relación entre la dieta y la acción de los esteroides sexuales y posiblemente entre la dieta y aquellos tipos de cáncer que dependen de las hormonas. De hecho, hay considerables evidencias procedentes tanto de estudios epidemiológicos como de casos y controles, que correlacionan altas concentraciones de lignanos en los fluidos corporales con una baja incidencia de tumores hormonodependientes, en particular cáncer de mama^{232,233,234}.

El riesgo de sufrir este tipo de cáncer, el más común entre las mujeres occidentales, aumenta notoriamente con la edad, pero su desarrollo es altamente dependiente de los estrógenos asociados con la función ovárica²³⁵.

Es bien sabido que el estradiol tiene un efecto proliferativo sobre células cancerígenas estrógeno-dependientes, mientras que los antiestrógenos inhiben este

²²⁸ Mc Inerney E.M., Tsai M.J., O'Malley B.S., Katzenellenbogen B.S. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **93** (19), 10069-73, (1996)

²²⁹ Ekena K., Katzenellenbogen J.A., Katzenellenbogen B.S. *J. Biol. Chem.*, **273** (2), 693-9, (1998)

²³⁰ Montano M.M., Katzenellenbogen B.S. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **94** (6), 2581-6, (1997)

²³¹ Phipps W.R., Martín M.C., Lampe J.W. et al. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **77** (5), 1215-9, (1993)

²³² Adlercreutz H., Fotsis T., Bannwart C. et al. *J. Steroid Biochem.*, **25** (5), 791-7, (1986)

²³³ Rose D.P. *Nutrition*, **8** (1), 47-51, (1992)

²³⁴ Boccardo F., Lunardi G., Guglielmini P., Parodi M., Murialdo R., Schettini G., Rubagotti A. *European Journal of Cancer*, **40** (1), 84-9, (2004)

²³⁵ Bernstein L., Ross R.K. *Epidemiol. Rev.*, **15** (1), 48-65, (1993)

efecto. Es posible que los lignanos ejerzan alguna capacidad antiestrogénica capaz de suprimir el crecimiento de las células malignas²³⁶.

Con el objeto de averiguar las propiedades estrogénicas y antiestrogénicas de ENL, Mousavi et al.²³⁷ emplearon cultivos de células de cáncer de mama MCF-7 inducido por estradiol. Por separado, tanto ENL (0.5-2 μM) como el estradiol (1 nM) estimularon la proliferación de las células transformadas, pero al combinar los dos compuestos no hubo estimulación del crecimiento celular, que fue similar al de los controles. Este fenómeno de inhibición recíproca de la actividad estimulante posiblemente se deba a que ENL evita la unión del estradiol al receptor nuclear de estrógenos de tipo II. Las células control, sin ENL ni estradiol añadido, no crecieron adecuadamente debido a la ausencia total de estrógenos. En cambio a concentraciones superiores ($> 10 \mu\text{M}$), el efecto de ENL sobre el crecimiento celular es inhibitorio (efecto antiestrogénico). Por lo tanto, parece que a bajas dosis los fitoestrógenos desarrollan actividad estrogénica y estimulan el crecimiento celular, mientras que a dosis más elevadas, los mismos fitoestrógenos muestran un efecto antiestrogénico con supresión del crecimiento celular.

La concentración de fitoestrógenos capaz de inhibir *in vitro* el crecimiento de células de cáncer de mama es $> 10 \mu\text{M}$. En cambio, en humanos, los niveles séricos son normalmente menores de $10 \mu\text{M}$ (la mayoría de las veces $< 1 \mu\text{M}$). Los resultados *in vitro* sugieren que a esas concentraciones, la estimulación del crecimiento celular es el efecto principal de los fitoestrógenos. Por lo tanto, es muy importante ampliar nuestro conocimiento del efecto de los fitoestrógenos sobre el crecimiento de células de cáncer de mama a bajas y a altas concentraciones, con particular atención a los niveles séricos habituales en humanos³⁵.

²³⁶ Adlercreutz H., Fotsis T., Heikkinen R., Dwyer J.T., Woods B.R., Goldin S.L., Gorbach S.L. *Lancet*, **2** (8311), 1295-9, (1982)

²³⁷ Mousavi Y., Adlercreutz H. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, **41** (3-8), 615-19, (1992)

Estudios *in vivo*

Basándose en estudios de población y migración²³⁸, estudios de casos y controles en humanos y experimentación con animales, se ha especulado con la posibilidad de que la baja incidencia de cáncer de mama en algunas mujeres puede ser, en parte, debida a la presencia de lignanos precursores en sus dietas. Dada su riqueza en lignanos, la suplementación de la dieta con semillas de lino supone un método apropiado para investigar los efectos anticancerígenos de los enterolignanos.

Aunque se considera que los lignanos de dichas semillas son capaces de reducir el riesgo de cáncer de mama, no hay una evidencia del todo clara dado que otros componentes de las semillas de lino pueden ejercer algún efecto sobre la tumorogénesis.

En estudios a corto plazo, se ha visto que la suplementación de la dieta con semillas de lino reduce la proliferación celular y aberración nuclear en glándulas mamarias de ratas hembras, lo cual sugiere un efecto protector de estas semillas en etapas iniciales de la carcinogénesis²³⁹.

Los estudios a largo plazo sobre la tumorogénesis usando ratas y dimetilbenzantraceno como agente carcinogénico, confirmaron los resultados anteriores²⁴⁰. Así pues, al suministrar con la dieta un 5% de semillas de lino ó SDG (1.5 mg/día), tanto durante la etapas tempranas como las tardías de la carcinogénesis, se observa inhibición del crecimiento de los tumores en tamaño y en multiplicidad.

Se cree que los enterolignanos también poseen un efecto preventivo contra el cáncer de próstata. En el hombre, éste es el más común de aquellos cánceres relacionados con la actividad hormonal y parece claro que el riesgo de contraerlo está influenciado por factores ambientales, entre ellos la dieta. Se ha propuesto que los lignanos (especialmente ENL), isoflavonoides y flavonoides derivados de la soja, té, fruta y verduras son agentes quimiopreventivos en hombres asiáticos, en los cuales la incidencia del cáncer de próstata es mucho más baja que en hombres occidentales.

²³⁸ Shimizu H., Ross R.K., Bernstein L., Yatani R., Henderson B.E., Nack T.M. *Br. J. Cancer*, **63** (6), 963-6, (1991)

²³⁹ Serraino M., Thompson L.U. *Cancer Lett.*, **60** (2), 135-42, (1991)

²⁴⁰ Serraino M., Thompson L.U. *Nutr. Cancer*, **17** (2), 153-9, (1992)

No obstante todas las investigaciones no sugieren esta relación entre los enterolignanos y los cánceres hormonodependientes. Así por ejemplo, hay estudios de casos y controles en donde no hay diferencia significativa en los niveles séricos de ENL entre los casos y los controles, lo cual no apoya la hipótesis del efecto quimioprotector de los enterolignanos en el cáncer de próstata²⁴¹. También hay estudios de este tipo que llevan a la conclusión de que los niveles séricos de ENL no están asociados con el riesgo de contraer cáncer de mama²⁴².

Aumento de los niveles de SHBG y unión a SBP y AFP

La globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG) es la principal proteína transportadora de hormonas sexuales del plasma y tiene elevada afinidad hacia los estrógenos endógenos. Esta globulina fija un porcentaje elevado de la testosterona circulante y también estradiol, aunque en menor proporción. La fracción no unida de esteroide circulante es la especie activa que penetra en las células para unirse a proteínas receptoras específicas. La fijación plasmática proporciona un reservorio de hormona protegida tanto de la depuración renal como de las conversiones metabólicas y que puede ser liberada hacia las células. Por esta razón, la vida media de una hormona esteroidea circulante es mayor que la de las hormonas peptídicas²⁴³.

La SHBG es producida en el hígado y la alteración de su biosíntesis o de la capacidad para unirse a los estrógenos puede tener efectos drásticos sobre los niveles de estrógenos disponibles para sus células diana²⁴⁴.

Se ha visto que algunos fitoestrógenos son capaces de inhibir *in vitro* el crecimiento de células cancerosas de hepatocarcinoma humano. Esta modulación del crecimiento celular puede ser el resultado de la capacidad que tienen los fitoestrógenos para potenciar los niveles de SHBG, que podría entonces unirse en mayor proporción al estrógeno libre, disminuyendo los niveles disponibles de éste para las células tumorales, que por lo tanto dejarían de crecer³⁵.

²⁴¹ Kilkkinen A., Virtamo J., Virtanen M.J., Adlercreutz H., Albanes D., Pietinen P. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, **12** (11, Pt.1), 1209-12, (2003)

²⁴² Kilkkinen A., Virtamo J., Vartiainen E., Sankila R., Virtanen M.J., Adlercreutz H., Pietinen P. *International Journal of Cancer*, **108** (2), 277-80, (2004)

²⁴³ Best y Taylor. "Bases Fisiológicas de la práctica médica". 11ª edición. Ed. Panamericana, pp 997, (1986)

²⁴⁴ Mousavi Y., Adlercreutz H. *Steroids*, **58** (7), 301-4, (1993)

Existe una correlación positiva tanto entre la ingesta de fibra y la excreción urinaria de ENL como entre la ingesta de fibra y los niveles plasmáticos de SHBG. Esto sugiere que los alimentos ricos en fibra que contienen lignanos precursores pueden, mediante la producción de END y ENL en el tracto intestinal, estimular la síntesis de SHBG en el hígado, lo cual reduciría los niveles plasmáticos de hormonas libres.

Se ha sugerido que la actividad antiestrogénica de los fitoestrógenos está relacionada con su capacidad para unirse a SBP²⁴⁵, proteínas fijadoras de esteroides sexuales con elevada especificidad para sus ligandos. Aproximadamente la mitad de la testosterona circulante en el hombre y un 88% del total de estrógenos en mujeres embarazadas están unidos a SBP²⁴⁶. Por lo tanto, cualquier cambio en la concentración y/o propiedades de unión de esta proteína, alterará el metabolismo de los esteroides al inducir importantes cambios en la tasa de aclaramiento de andrógenos y estrógenos y su disponibilidad para sus células diana. Los fitoestrógenos podrían acelerar la eliminación metabólica de los estrógenos porque son capaces de inhibir la unión de los esteroides a SBP. Además, SBP podría llevar a estos fitoestrógenos hasta las células diana donde podrían competir por los receptores con los estrógenos endógenos, interfiriendo así los procesos mediados por estrógenos²⁴⁷.

Se cree que la α -fetoproteína (AFP) modula la actividad de los estrógenos y de los ácidos grasos²⁴⁸, la respuesta inmune²⁴⁹ y el crecimiento de células sensibles a los estrógenos²⁴⁸.

Garreau et al.²⁵⁰ estudiaron la interacción de END y ENL con AFP, observando una unión competitiva dosis-dependiente de estos lignanos con sus ligandos naturales más usuales, estrógenos en el caso de la AFP de rata y ácido araquidónico para la AFP humana. Esto indica que END y ENL podrían jugar algún papel en el crecimiento celular normal y patológico dependiente de AFP.

²⁴⁵ Martin M.E., Haurigui M., Pelissero C., Benassayag C., Nunez E.A., *Life Sci.*, **58** (5), 429-36, (1996)

²⁴⁶ Dunn J.F., Nisula B.C., Rodbard D. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **53** (1), 58-68, (1981)

²⁴⁷ Markaverich B.M., Roberts R.R., Alejandro M.A., Johnson G.A., Middledicth B.S., Clark J.H. *J. Steroid. Biochem.*, **30** (1-6), 71-8, (1988)

²⁴⁸ Jacobson H.I., Bennett J.A., Mizejewski G.J. *Cancer Res.*, **50** (2), 415-20, (1990)

²⁴⁹ Keller R.H., Calvanico N.J. *Crit. Rev. Immunol.*, **5** (2), 149-99, (1984)

²⁵⁰ Garreau B., Vallette G., Adlercreutz H., Wähälä K., Mäkelä T., Benassayag C., Nunez E.A. *Biochem. Biophys. Acta*, **1094** (3), 339-45, (1991)

Inhibición enzimática

Los dos lignanos principales de mamíferos, especialmente ENL, son inhibidores de varias enzimas del metabolismo de los esteroides tales como la aromatasa. Ésta es una enzima que, como ya se ha indicado en el Esquema 98, cataliza la conversión de los andrógenos en estrógenos en muchos tejidos y que puede tener algún papel en el desarrollo del cáncer de mama y en la respuesta al tratamiento. Adlercreutz et al.²⁵¹ demostraron que ENL es un inhibidor moderado de la aromatasa de la placenta, mientras que END es un inhibidor algo más débil.

Wang et al.²⁵² demostraron que 7 lignanos, entre ellos ENL y END, inhiben la aromatasa en cultivos celulares de preadipocitos humanos. Según los autores, esto sugiere un mecanismo que explicaría cómo el consumo de alimentos vegetales ricos en lignanos puede contribuir en la reducción de enfermedades estrógeno-dependientes, como es el caso del adenocarcinoma de mama.

Además, ENL inhibe la 5- α -reductasa y la 17- β -hidroxiesteroide deshidrogenasa²⁵³ (Esq. 98). Probablemente debido a estos efectos inhibidores, los lignanos reducen los niveles plasmáticos de estradiol y andrógenos libres (testosterona y dehidrotestosterona), ejerciendo, por lo tanto, un efecto quimioprotector contra neoplasias hormonodependientes^{251,254}.

Tanto ENL como END reducen significativamente la proliferación de varias líneas celulares de cáncer de colon humano, pero estas células no son sensibles al estradiol y por lo tanto estos lignanos deben actuar por otro mecanismo diferente al que les proporciona su actividad antiestrogénica²⁵⁵.

La colesterol 7- α -hidroxilasa es la enzima limitante de la velocidad en la formación de los ácidos biliares. Sanghvi et al.²⁵⁶ demostraron que END y ENL exhiben *in vitro* propiedades inhibitorias significativas de dicha enzima. Los autores especulan

²⁵¹ Adlercreutz H., Bannwart C., Wähälä K., Mäkela T., Brunow G., Hase T., Arosemena P.J., Kellis J.T., Vickery L.E. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, **44** (2), 147-53, (1993)

²⁵² Wang C., Mäkelä T., Hase T., Adlercreutz H., Kurzer M.S. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, **50** (3-4), 205-12, (1994)

²⁵³ Evans B.A., Griffiths K., Morton M.S. *J. Endocrinol.*, **147** (2), 295-302, (1995)

²⁵⁴ Adlercreutz H., Höckerstedt K., Bannwart C., Bloigu S., Hämäläinen E., Fotsis T., Ollus A. *J. Steroid. Biochem.*, **27** (4-6), 1135-44, (1987)

²⁵⁵ Sung M.K., Lautens M., Thompson L.U. *Anticancer Research*, **18** (3A), 1405-8, (1998)

²⁵⁶ Sanghvi W.F., Diven H., Seltman V., Warty M., Rizk D., Kritchevsky K.D.R., Setcell. in: Kritchevsky D., Parletti R., Holmes W.L. (Eds). "Drugs Affecting Lipid Metabolism", Vol 8, p.311. Plenum Press, New York, (1984)

con la hipótesis de que los lignanos pueden proporcionar alguna protección contra el cáncer de colon, basándose en la correlación entre el riesgo de cáncer colorrectal y los niveles de ácido desoxicólico en las heces. Por consiguiente la inhibición de la colesterol 7- α -hidroxilasa por los lignanos disminuiría los niveles de ácidos biliares primarios y por tanto prevendrían la acumulación de ácido desoxicólico en el colon.

Actividad antioxidante, prevención de enfermedades cardiovasculares

Aunque, como se ha visto, los fitoestrógenos han recibido una considerable atención debido a su papel como sustancias preventivas del cáncer debido a su actividad antiestrogénica, también presentan actividad antioxidante. Éste es otro posible mecanismo anticarcinogénico, especialmente en células que no expresan receptores para los estrógenos^{257,258}.

Existe una amplia evidencia de que el daño oxidativo de los lípidos marca el comienzo de la formación de la placa de ateroma que puede dar lugar a enfermedades cardiovasculares. Debido a su capacidad para ceder hidrógenos, como otros polifenoles, la enterolactona puede actuar como antioxidante y así contribuir a la salud cardiovascular. De hecho, hay estudios epidemiológicos que indican que elevadas concentraciones de lignanos en orina disminuyen el riesgo de enfermedades coronarias^{259,260}.

Por otra parte, hay evidencias de que los bajos niveles séricos de enterolactona están asociados con elevados niveles plasmáticos de isoprostanos F2, compuestos que resultan de la oxidación por radicales libres del ácido araquidónico de los fosfolípidos de la membrana plasmática o de las LDL circulantes y que son considerados, por lo tanto, indicadores de la peroxidación de los lípidos en humanos²⁶¹. Además, cada vez hay más evidencias de que la progresión de la aterosclerosis está relacionada con la peroxidación de los lípidos, que al igual que ocurre con otros compuestos bifenólicos es inhibida por la enterolactona^{259,261}. Se cree que debido a que ésta se une a SHBG, puede

²⁵⁷ Ruiz-Larrea M.B., Mohan A.R., Paganga G., Miller N.J., Bolwell G.P., Rice-Evans C.A. *Free Radic. Res.*, **26** (1), 63-70, (1997)

²⁵⁸ Wei H., Bowen R., Cai Q., Barnes S., Wang Y. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **208** (1), 124-30, (1995)

²⁵⁹ Vanharanta M., Voutilainen S., Lakka T.A., van der Lee M., Adlercreutz H., Salonen J.T. *Lancet*, **354** (9196), 2112-5, (1999)

²⁶⁰ Pietinen P., Rimm E.B., Korhonen P., Hartman A.M., Willet W.C., Albanes D., Virtamo J. *Circulation*, **94** (11), 2720-7, (1996)

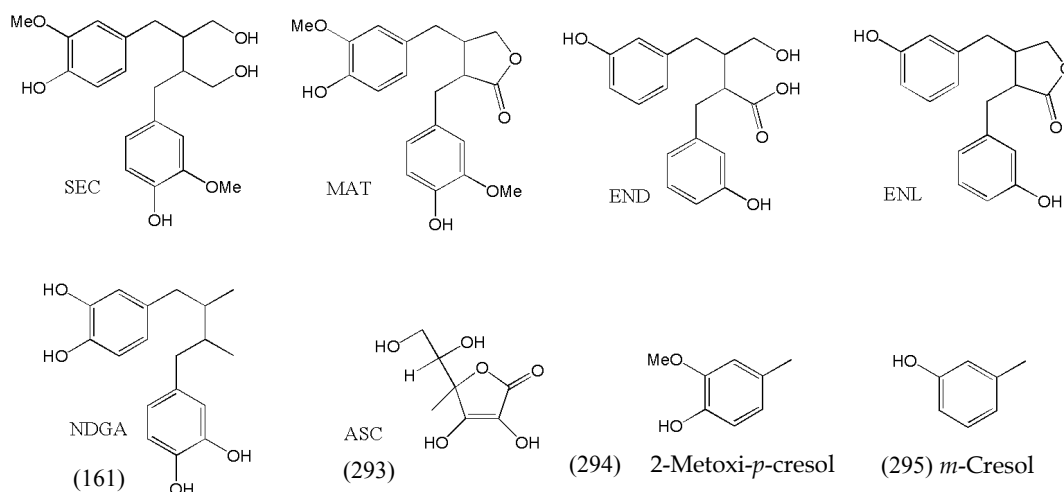
²⁶¹ Vanharanta M., Voutilainen S., Nurmi T., Kaikkonen J., Roberts L.J., Morrow J.D., Adlercreutz H., Salonen J.T. *Atherosclerosis*, **160** (2), 465-9, (2002)

pasar libremente al interior celular, donde puede ejercer este efecto protector contra la oxidación por radicales libres.

Los bajos niveles de SHBG están asociados con partículas LDL más pequeñas y densas (compactas), más sensibles a la oxidación, lo cual está relacionado con un mayor riesgo de sufrir enfermedades coronarias. Uno de los mecanismo por el que los lignanos podrían proteger contra la aterosclerosis sería mediante la estimulación de la producción hepática de SHBG²⁵⁹, que afectaría de un modo paralelo a la síntesis de las LDL que serían ahora mayores y más resistentes a la oxidación.

Mediante el ensayo FRAP (ferric reducing/antioxidant power assay), se ha evaluado la actividad antioxidante de los lignanos vegetales secoisolariciresinol (SEC) y matairesinol (MAT) y de los enterolignanos ENL y END²⁶², encontrándose que los dos primeros tienen una actividad comparable a la del conocido antioxidante ácido nordihidroguayarático (NDGA) (161) y mayor que la del ácido ascórbico (ASC) (Esq. 100). Los enterolignanos mostraron en este ensayo una actividad bastante menor.

El grado de hidroxilación es el determinante principal del poder reductor de los polifenoles de la dieta; no obstante, los grupos metoxilo presentes en los lignanos vegetales SECO y MAT y ausentes en sus enterolignanos derivados, END y ENL, deben ser los responsables de las diferentes actividades antioxidantes observadas. Esto se ha demostrado empleando 2-metoxi-*p*-cresol (294) y *m*-cresol (295) (Esq. 100) como modelos de los lignanos de plantas y enterolignanos, respectivamente²⁶³.



Esquema 100. Lignanos con actividad antioxidante.

²⁶² Niemeyer H.B., Metzler M. in: "Biological-Active Phytochemicals in Food". Pfannhauser W, Fenwick GR, Khokhar S, Edits. pp.394-5, (2001)

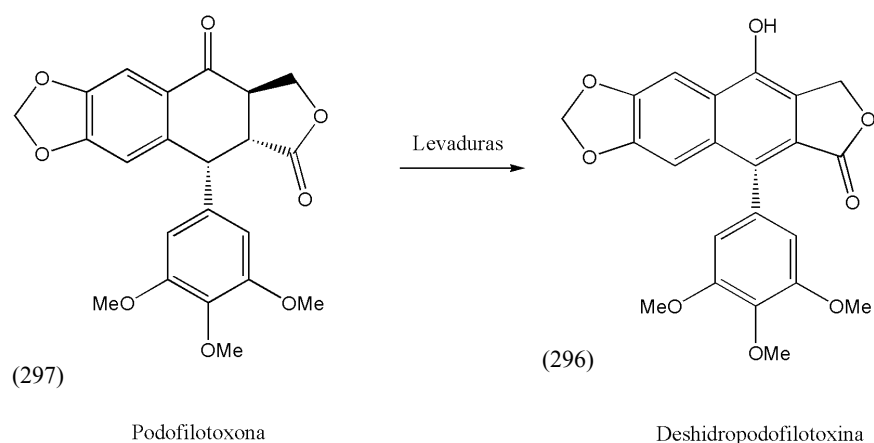
²⁶³ Niemeyer H.B., Metzler M. *Journal of Food Engineering*, **56** (2-3), 255-6, (2003)

Además de las actividades descritas, se ha sugerido que una dieta rica en lignanos podría tener un efecto protector contra enfermedades relacionadas con la menopausia tales como la osteoporosis²⁶⁴.

Otras biotransformaciones

Hay otros ejemplos en que los lignanos de los vegetales son procesados por diferentes organismos que poseen enzimas capaces de metabolizar compuestos foráneos (xenobióticos). Dentro de este fenómeno, conocido como biotransformaciones de lignanos, los enterolignanos (ENL y END) serían sólo un caso particular al que podríamos clasificar dentro de las biotransformaciones por microorganismos.

Muchos otros microorganismos son capaces de metabolizar lignanos, tanto naturales como sintéticos. Así pues, Kondo et al.²⁶⁵ llevaron a cabo la semisíntesis, con excelente rendimiento, de epipodofilotoxina (226) a partir de desoxipodofilotoxina (219) por una especie no identificada del género *Penicillium*. Kamal et al.²⁶⁶ semisintetizaron deshidropodofilotoxina (296) a partir de podofilotoxona (297) (Esq. 101) (producto de la oxidación de la podofilotoxina (12)) mediante incubación con levaduras de diferentes tipos .



Esquema 101. Biotransformación de podofilotoxona por levaduras

²⁶⁴ Chiechi L.M. *International Journal of Gynaecology & Obstetrics*, **67** (1), 39-40, (1999)

²⁶⁵ Kondo, K., Ogura M., Midorikawa Y., Kozawa M., Tsujibo H., Baba K., Inamori Y. *Agric. Biol. Chem.*, **53** (3), 777-82, (1989)

²⁶⁶ Kamal A., Damayanthi Y. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **7** (6), 657-62, (1997)

Kanatani et al.²⁶⁷ obtuvieron gomisina A (151) a partir de schizandrina empleando microorganismos en determinados pasos de la semisíntesis.

También se han descrito biotransformaciones de lignanos en insectos. Aunque como hemos visto, muchos lignanos muestran actividad contra insectos, nada se sabía acerca del destino metabólico de los mismos hasta que Miyazawa²⁶⁸ demostró que las larvas de *Spodoptera litura* eran capaces de biotransformar (+)-eudesmina (122), (+)-magnolina (123) y (+)-yangambina (124) en otros lignanos. La Tabla 3 muestra los resultados obtenidos.

Compuesto	
(+)-eudesmina (122)	(+)-des-metileudesmina (298) (+)-des-4'-O-metileudesmina-4'-O-β-D-glucósido (299)
(+)-magnolina (123)	(+)-des-4''-O-metilmagnolina (300) (+)-des-4''-O-metilmagnolina-4''-O-β-D-glucósido (301)
(+)-yangambina (124)	(+)-des-4'-O-metilyangambina-4''-O-β-D-glucósido (302)

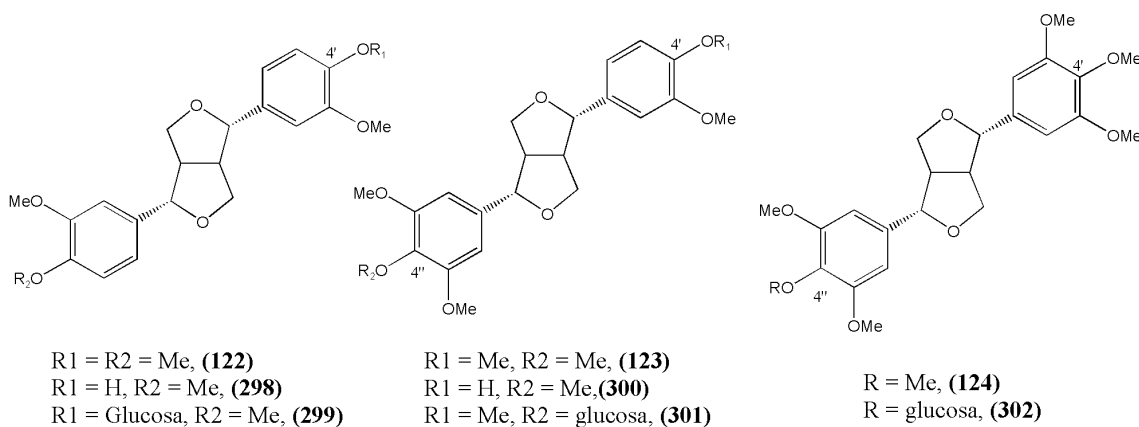


Tabla 3. Biotransformaciones de lignanos por *Spodoptera litura*

²⁶⁷ Kanatani H., Sakakibara C., Tanaka M., Niitsu K., Ikeya Y., Wakamatsu T., Maruno M. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58** (6), 1054-7, (1994)

²⁶⁸ Miyazawa M. *Current Organic Chemistry*, **5** (9), 975-86, (2001)

Ejemplar de *Justicia hyssopifolia* L. perteneciente al herbario de Linneo.



ep. Justicia
4. hyssopifolia
ep. pl. 15

(2:1)

Objetivos y especies elegidas

El objetivo de nuestro grupo de investigación, y de esta tesis doctoral, es la obtención de nuevos productos de origen natural o sintético, con la finalidad de determinar su estructura y evaluar sus posibles actividades biológicas, sintetizando total o parcialmente estos productos cuando sea necesario confirmar sus estructuras u obtenerlos en cantidades suficientes para evaluar sus posibles actividades biológicas.

Como fuente de productos naturales se eligieron las especies *Bupleurum handiense* (Umbelliferae = Apiaceae) y *Justicia hyssopifolia* (Acanthaceae). Ambas especies habían mostrado ser ricas en lignanos y otros compuestos^{269,270}, pero no habían sido totalmente estudiadas empleando la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

El género *Justicia* es una fuente importante de lignanos²⁷¹, varios de los cuales poseen diferentes actividades biológicas (antitumoral^{178,272,273,274}, antifúngica²⁷⁵, hipolipidémica²⁷⁶, antidepresiva¹⁸⁶, antiviral^{277,278}, piscicida²⁷⁹, antialimentaria²⁸⁰, anti-PAF^{281,282} e inhibición de la biosíntesis de leucotrienos en leucocitos humanos^{283,284}). Además, *Justicia hyssopifolia* posee propiedades como laxante, purgante, antitumoral, antivírica, insecticida y cardiotónica².

²⁶⁹ Jorge E. Tesis doctoral. Universidad de La Laguna. (1992)

²⁷⁰ Valera A. Tesis doctoral. Universidad de La Laguna. (1997)

²⁷¹ Rao C.B.S. "Chemistry of Lignans". Andhara University Press, Visakhapatnam. (1978)

²⁷² Fukamiya N., Lee K.H. *J. Nat. Prod.*, **49** (2), 348-50, (1986)

²⁷³ Pradheepkumar C.P., Panneerselvam N., Shanmugam G. *Mutat. Res.*, **464** (2), 185-93, (2000)

²⁷⁴ Prabhakaran C., Kumar P., Panneerselvam N., Rajesh S., Shanmugam G. *Mutagenesis*, **11** (6), 553-7, (1996)

²⁷⁵ Atta-ur-Rahman, Ashraf M., Choudhary M.I., Habibur-Rehman, Kazmi M.H. *Phytochemistry*, **40** (2), 427-31, (1995)

²⁷⁶ Iwasaki T., Kondo K., Nishitani T., Kuroda T., Hirakoso K., Ohtani A., Takashima K. *Chem. Pharm. Bull.*, **43** (10), 1701-10, (1995)

²⁷⁷ Asano J., Chiba K., Tada M., Yohsii T. *Phytochemistry*, **42** (3), 713-7, (1996)

²⁷⁸ Cow C., Leung C., Charlton J.L. *Can. J. Chem.*, **78** (5), 553-61, (2000)

²⁷⁹ Munakata K., Marumo S., Ohta K., Chen Y., *Tetrahedron Lett.* **47** (6), 4167-70, (1965)

²⁸⁰ Chitra K.C., Reddy P.V.R., Pillai K.R., Subbaraju G.V. *J. Appl. Zool. Res.*, **6**, 131-2, (1995)

²⁸¹ Chen C.C., Hsin W. C., Ko F.N., Huang Y.L., Ou J.C., Teng C.M. *J. Nat. Prod.*, **59** (12), 1149-50, (1996)

²⁸² Tanabe Y., Seko S., Nishii Y., Yoshida T., Utsumi N., Suzukamo G. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, **1**, 2157, (1996)

²⁸³ Hutchinson J.H., Charleson S., Evans J.F., Falguyret J.P., Hoogsteen K., Jones T.R., et al. *J. Med. Chem.*, **38** (22), 4538-47, (1995)

²⁸⁴ Delorme D., Ducharme Y., Brideau C., Chan C.C., Chauret N., Desmarais S., et al. *J. Med. Chem.*, **39** (20), 3951-70, (1996)

La funcionalización enzimática de productos naturales para obtener nuevas sustancias no naturales que difícilmente se pueden obtener por métodos sintéticos convencionales, constituye otro objetivo de esta tesis. Los productos elegidos son secoiridoides glucosídicos aislados en nuestro laboratorio de *Jasminum odoratissimum*. Los productos de este tipo tienen un amplio espectro de actividades biológicas²⁸⁵. La modificación específica de los hidroxilos del anillo glucosídico puede dar lugar a nuevos productos con nuevas actividades o a la intensificación de las ya estudiadas.



Jasminum odoratissimum

²⁸⁵ Ghisalberti E.L. *Phytomedicine*, 5 (2), 147-63, (1998)

***Bupleurum handiense* Bolle. (Apiaceae)**

La familia Apiaceae es bastante numerosa y de difusión cosmopolita, con un número de géneros variable entre 275 y 420 y unas 3.000 especies, muchas de las cuales se utilizan como comestibles o especias²⁸⁶. En general, el aspecto típico de las umbelíferas permite reconocer con facilidad qué plantas pertenecen a la familia. Sus tallos poseen nudos manifiestos y entrenudos huecos. Las hojas, provistas de una vaina ensanchada que abraza el tallo, casi siempre están repetidamente divididas, con excepciones como *Bupleurum* spp. que tiene hojas indivisas. Las flores son pequeñas, generalmente blancas y con menos frecuencia rosadas o amarillas. Como inflorescencia predomina la umbela compuesta (umbela con umbélulas)⁵⁶.

El género *Bupleurum* consta de 70 a 150 especies de hierbas y arbustos, en su mayoría en regiones templadas y subtropicales del hemisferio norte. En Canarias hay cuatro especies autóctonas²⁸⁶: *B. semicompositum*, *B. lacifolium*, *B. salicifolium* y *B. handiense*. Esta última, conocida como hinojo de risco, es un arbusto pequeño, de hojas glaucoverdes, coriáceas y con nervadura paralela bien marcada. Las flores son pequeñas, verdoso-amarillentas y en umbelas terminales comprimidas. La inflorescencia consta de 5 a 8 umbelas con 4 a 6 flores. Los frutos son de color marrón oscuro o negros y menores de 1 cm.



Bupleurum handiense

Esta planta es exclusiva de Lanzarote (parte alta de los riscos de Famara, 550 m) y Fuerteventura (Jandía, Pico de la Zarza, 600 m) donde forma parte de los matorrales ligados al área potencial de los bosques termófilos, actualmente casi desaparecidos en dichas islas^{286,287,288}.

²⁸⁶ Kunkel G. "Flora y Vegetación del Archipiélago Canario. Tratado Florístico, 2ª Parte". Las Palmas de Gran Canaria, Islas Canarias. (1991)

²⁸⁷ Valera A., Santos A. "Investigaciones Fitoquímicas en Plantas Canarias". Ed. Centro de Estudios Ramón Areces, S.A., Madrid. p.21, (2002)

²⁸⁸ Bramwell D., Bramwell Z. "Flores Silvestres de Las Islas Canarias". Ed. Rueda. Madrid. (1990)

Justicia hyssopifolia L. (Acanthaceae)

La familia Acanthaceae (s. str.) consta de 250 géneros con unas 2500 especies, la mayoría tropicales y herbáceas⁵⁶; no obstante, algunos autores incluyen números mucho más elevados²⁸⁶. Las hojas son simples, la filotaxia opuesta y la inflorescencia cimosa y bracteada. La corola es bilabiada, el androceo consta de 4 ó 2 estambres, siendo el ovario súpero y el fruto en cápsula explosiva²⁸⁸.

El género *Justicia* (Acanthaceae), que recibió su nombre en honor al botánico y jardinero escocés James Justice (1698-1763), comprende unas 700 especies²⁸⁹ distribuidas por los trópicos y regiones subtropicales²⁸⁶, siendo *Justicia hyssopifolia* L, conocida como mata prieta, el único representante espontáneo de esta familia en Canarias²⁸⁷. Es la especie tipo que da nombre al género y fue descrita por Linneo en su "Species Plantarum" (1753) como endémica de las Islas Canarias²⁹⁰, si bien curiosamente Ceballos & Ortuño (1951) la citan también en Sudáfrica²⁹¹. Esto no es de extrañar, ya que muchos endemismos canarios se encuentran en diversas partes del mundo donde han sido introducidos como plantas ornamentales, forrajeras o con otros fines.



Justicia hyssopifolia L. Icod.
14/03/2004

²⁸⁹ McDade L.A., Daniel T.F., Masta S.E., Riley K.M. *Ann. Missouri Bot. Gard.*, **87** (4), 435-8, (2000)

²⁹⁰ Hooker & Jackson. *Index Kewensis*. Tomo I (A-J). Oxford University Press, Amen House, London E.C.4

²⁹¹ Ceballos L., Ortuño F. "Vegetación y Flora Forestal de las Canarias Occidentales". Instituto Forestal de Investigaciones y Experiencias. Madrid. p. 430. (1951)

No obstante, según Rodrigo (1992)²⁹² *Justicia hyssopifolia*, al igual que otras plantas canarias como *Salvia canariensis*, *Klenia neriifolia* (verode) o *Euphorbia canariensis* (cardón), tiene su mayor número de especies filogenéticamente relacionadas en el Sur de África y por lo tanto estos endemismos serían elementos derivados de la antigua flora xerofítica africana que ahora está relegada al este y sur de África.

J. hyssopifolia es una especie protegida y en general rara², aunque localmente es frecuente en la zona baja de Tenerife (hasta 500 m). Ceballos & Ortuño (1951)²⁹¹ citan la planta en San Juan de la Rambla, Icod, Garachico, Adeje, Monte del Conde y la recogen en El Balito, entre San Juan y Los Cristianos y en Guía de Isora, en la región árida y seca del litoral, entre tabaibas, cardones, balos y aulagas. No la citan en otras islas. Bramwell²⁸⁸ la cita en Teno, Adeje, San Juan de la Rambla, Sierra Anaga y La Gomera. Valera & Santos²⁷⁰ en Adeje (Punta Cangrejo).



Fruto de *Justicia hyssopifolia* L.

²⁹² Rodrigo Pérez J. Origen de la Flora Canaria. En: Kunkel G., "Flora y Vegetación del Archipiélago Canario. Tratado Florístico, 1ª Parte". Las Palmas de Gran Canaria, Islas Canarias. pp. 33-54, (1991)

Descripción de *Justicia hyssopifolia* L.

Arbusto pequeño, intrincado, de aproximadamente 1 m, que recuerda a veces al “cornical” (*Periploca laevigata*). Las hojas son simples, oblanceoladas de unos 4 cm de largo, algo carnosas y que amarillean progresivamente hasta caerse por completo en las zonas más áridas, quedando la planta reducida a un conjunto de tallos sarmentosos.

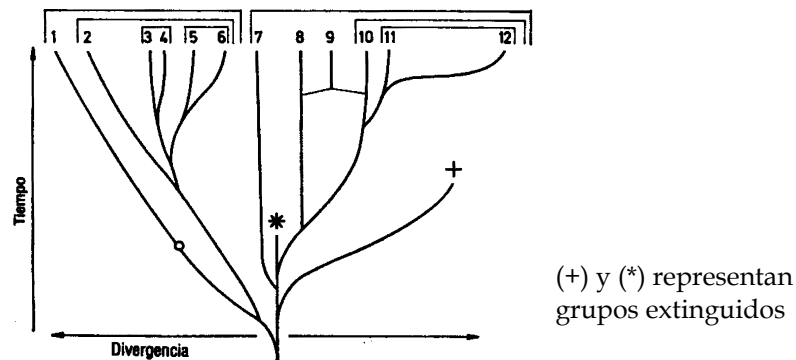
La filotaxia es opuesta o en verticilos de 4 a 6. Las flores son pequeñas, hermafroditas, zigomorfas, diclamídeas-heteroclamídeas de corola bilabiada con labio superior inciso y de color blanquecino a crema. El cáliz es pentalobulado con lóbulos lanceolados. Presenta dos estambres, claramente visibles en la siguiente fotografía, con lóculos separados por una membrana estrecha. El fruto, de aproximadamente 1.5-2 cm, es claviforme con proyección terminal, marrón claro^{2,287,288}.



Flor de *Justicia hyssopifolia* L. Icod.
14/03/2004

Por otra parte, es interesante la conclusión de McDade et al.²⁸⁹ sobre la filogenia de la tribu* Justiciaeae (Acanthaceae) que comprende unas 2000 especies.

El grado de parentesco entre especies viene determinado por su divergencia evolutiva más o menos reciente⁵⁶. Dicha divergencia suele representarse mediante árboles filogenéticos como el mostrado en el Esquema 1. Las relaciones de parentesco “horizontales” entre especies contemporáneas se expresan mediante corchetes.



Esquema 1. Árbol filogenético de un grupo sistemático. Strasburger p. 541⁵⁶

Las estirpes 3 y 4 ó 5 y 6 de dicho esquema están más estrechamente emparentadas entre sí que 3 y 5, 3 y 6, 4 y 5 y 4 y 6. No obstante, las estirpes de un mismo grupo de descendencia (por ejemplo 3-4 y 5-6) son monofiléticas ya que proceden de una estirpe originaria única, en cambio el grupo 6-7 tendría que ser calificado de polifilético. Un grupo polifilético se considera meramente provisional, en espera de que nuevas investigaciones permitan descomponerlo o reagruparlo de un modo monofilético²⁹³.

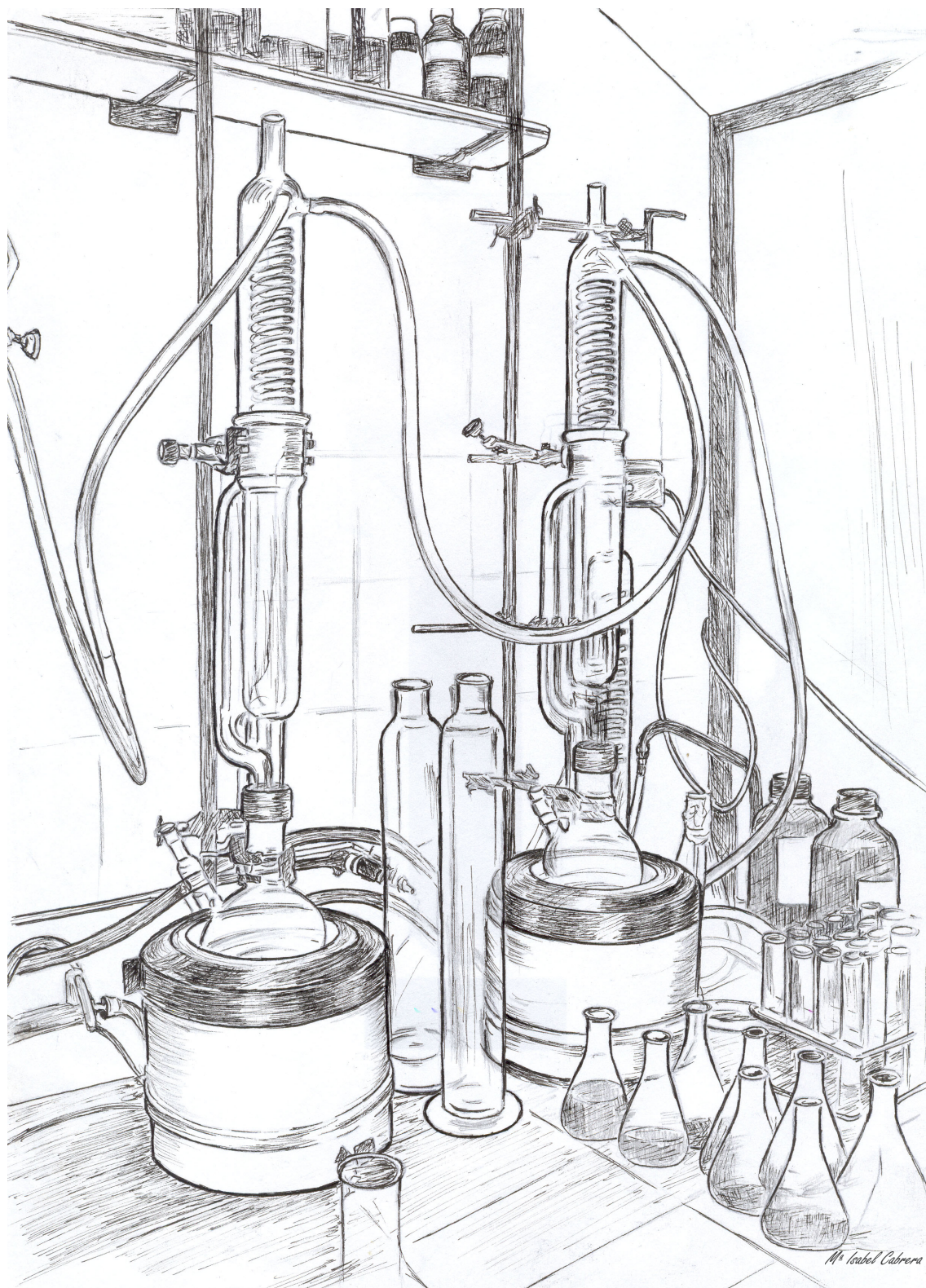
Considerando que el grado de homología de ciertas secuencias de determinadas biomoléculas es un parámetro muy útil para medir las relaciones evolutivas de las especies a las que pertenecen, McDade y et al.²⁸⁹ llevaron a cabo un estudio filogenético en la tribu Justiciaeae. Para ello, analizaron la secuencia de nucleótidos de regiones del rDNA conocidas como espaciadores transcritos internos (ITS) (“Internal Transcribed Spacer”) que se encuentran entre las secuencias codificantes para el rRNA, así como la

* Categoría taxonómica entre subfamilia y género.

²⁹³ Font Quer P. “Diccionario de Botánica”. Ed. Labor S.A., 1ª edición, Barcelona, p. 731, (1989)

secuencia de los intrones y espaciadores de los genes *trnL-trnF* de los cloroplastos que codifican para tRNA de los aminoácidos Leu y Phe, respectivamente.

Una de las conclusiones de este estudio es que el género *Justicia* no es monofilético. Las especies americanas del género *Justicia* forman un grupo monofilético sólo si son incluidas especies de otros géneros como *Chaetoclamsys*, *Megaskepasma* y *Poikilicanthus*. Por otra parte, también es improbable que las especies de *Justicia* europeas formen un grupo monofilético. Por lo tanto, si aceptamos las conclusiones de estas investigaciones y dado que *Justicia hyssopifolia* L., la especie tipo, es aparentemente una especie del viejo mundo, el género *Justicia* no debería comprender ninguna especie americana. Según los autores, aún queda mucho por aprender sobre las relaciones filogenéticas entre las plantas del género *Justicia*. Quizás esto debería ser tenido en cuenta a la hora de abordar el estudio fitoquímico de una planta de este género.



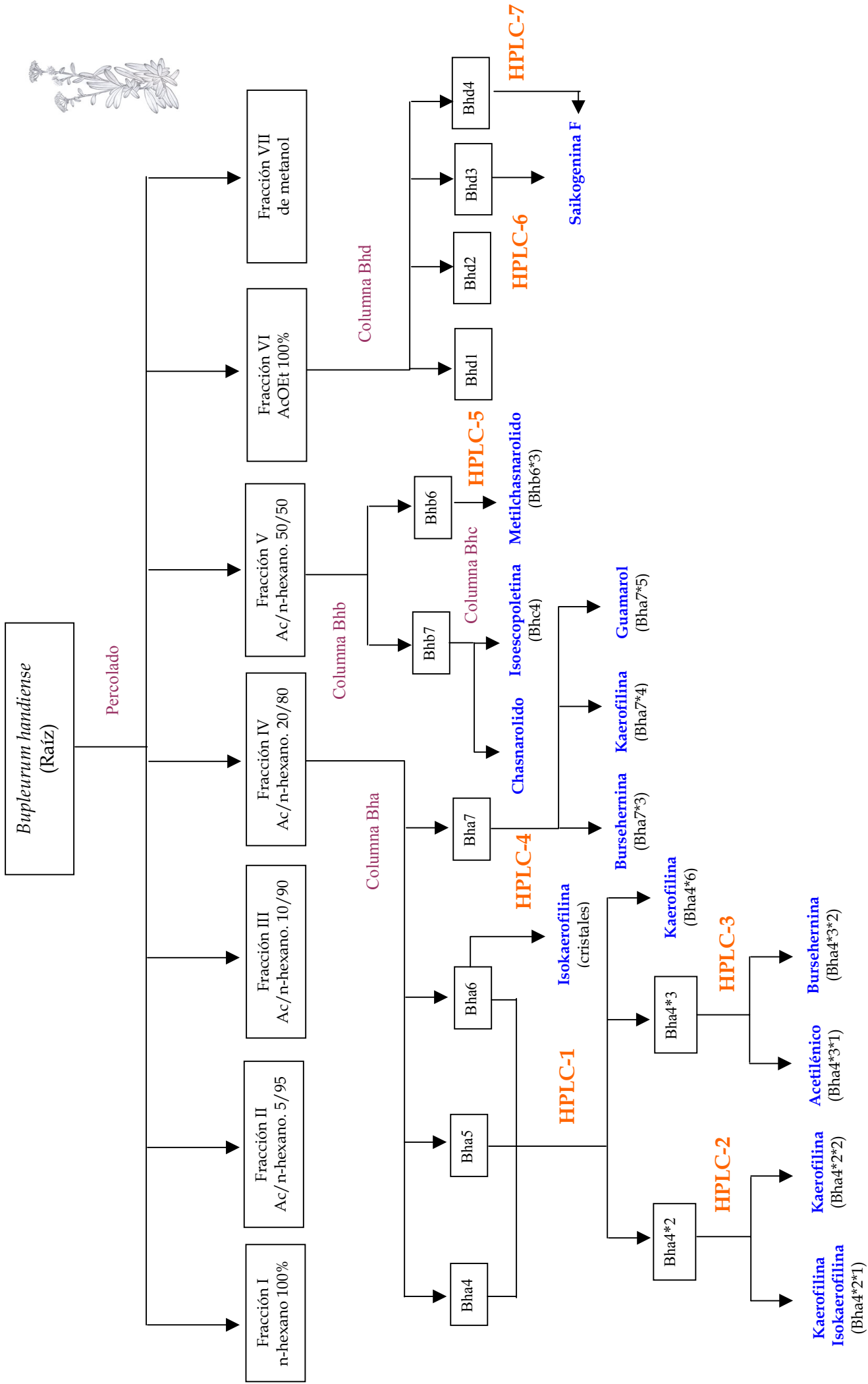
Parte teórica

Capítulo I.
Aislamiento y caracterización de productos naturales



Bupleurum handiense

Parte teórica



Producto-1. (cristales de la fracción Bha6)

De la fracción Bha6 se obtuvieron unos cristales de color blanco en forma de agujas, de peso molecular 368 uma y de fórmula $C_{21}H_{20}O_6$. Su espectro de 1H -NMR ($CDCl_3$) (Fig. 1) muestra las siguientes señales: dos dobles dobletes centrados a δ 2.79 y 2.95 con integral para un protón cada uno, un multiplete entre δ 3.23 y 3.30 que integra para un protón, dos singuletes a δ 3.91 (3H) y δ 3.94 (3H), dos dobles dobletes centrados a δ 4.11 (1H) y 4.33 (1H), un singulete a δ 5.96 (2H) y un doblete a δ 6.62 (1H). En la zona de los protones aromáticos se observan señales para seis protones: cuatro dobletes a δ 6.64, 6.77, 6.84, 8.09 y dos dobles dobletes a δ 6.68 y 7.17. Éstos y otros datos espectroscópicos, tales como los procedentes de su espectro UV e IR, son coincidentes con los de un lignano del tipo de la Z-bencilidén-bencil- γ -butirolactona denominado **isokaerofilina**^{294,295} en la bibliografía. Este lignano también fue aislado por HPLC de la fracción Bha4*2, perteneciente a la fracción IV del percolado.

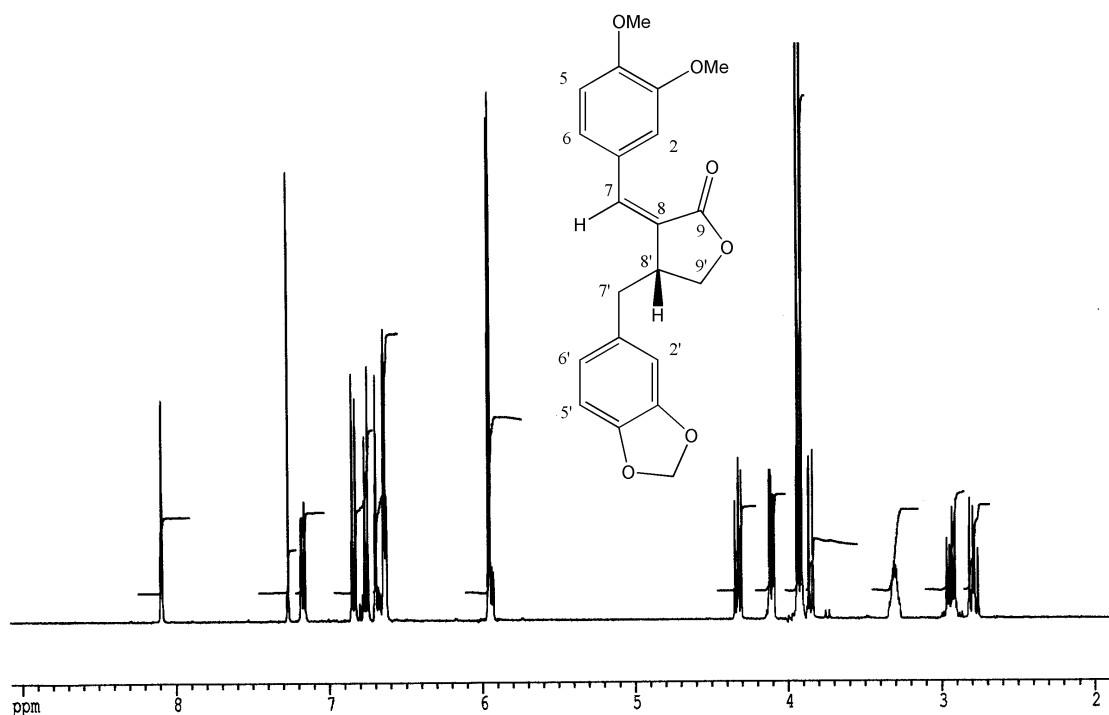


Figura 1. Espectro de 1H -NMR ($CDCl_3$) de **isokaerofilina**

²⁹⁴ González A.G., Estevez-Reyes R., Mato C., Estevez-Braun A.M. *Phytochemistry*, **29** (2), 675-8, (1990)

²⁹⁵ Estevez A. Tesis Doctoral. Universidad de La Laguna. (1993)

Producto-2. (Bha4*6)

Mediante cromatografía en columna y HPLC fue aislado un sólido de peso molecular 368 uma y de fórmula $C_{21}H_{20}O_6$, cuyo espectro de 1H -NMR ($CDCl_3$) (Fig. 2) muestra los siguientes datos espectroscópicos: dos dobles dobletes centrados a δ 2.61 (1H) y 3.04 (1H), un multiplete con integral para un protón entre δ 3.75 y 3.91, dos singuletes a δ 3.91 y 3.94 que integran para tres protones cada uno, un doblete centrado a δ 4.26 (2H) y un singulete a δ 5.93 (2H) que podría atribuirse a un grupo metilendioxi. Las señales para los protones aromáticos son: dos dobles dobletes a δ 6.62 (1H) y 7.21 (1H), un singulete a δ 6.64 (1H) y cuatro dobletes a δ 6.72 (1H), 6.93 (1H), 7.04 (1H) y 7.53 (1H). Estos datos espectroscópicos, propios de una E-bencilidén-bencil- γ -butirolactona, coinciden con los de **kaerofilina**, un lignano aislado por primera vez de *Chaerophyllum maculatum*²⁹⁶.

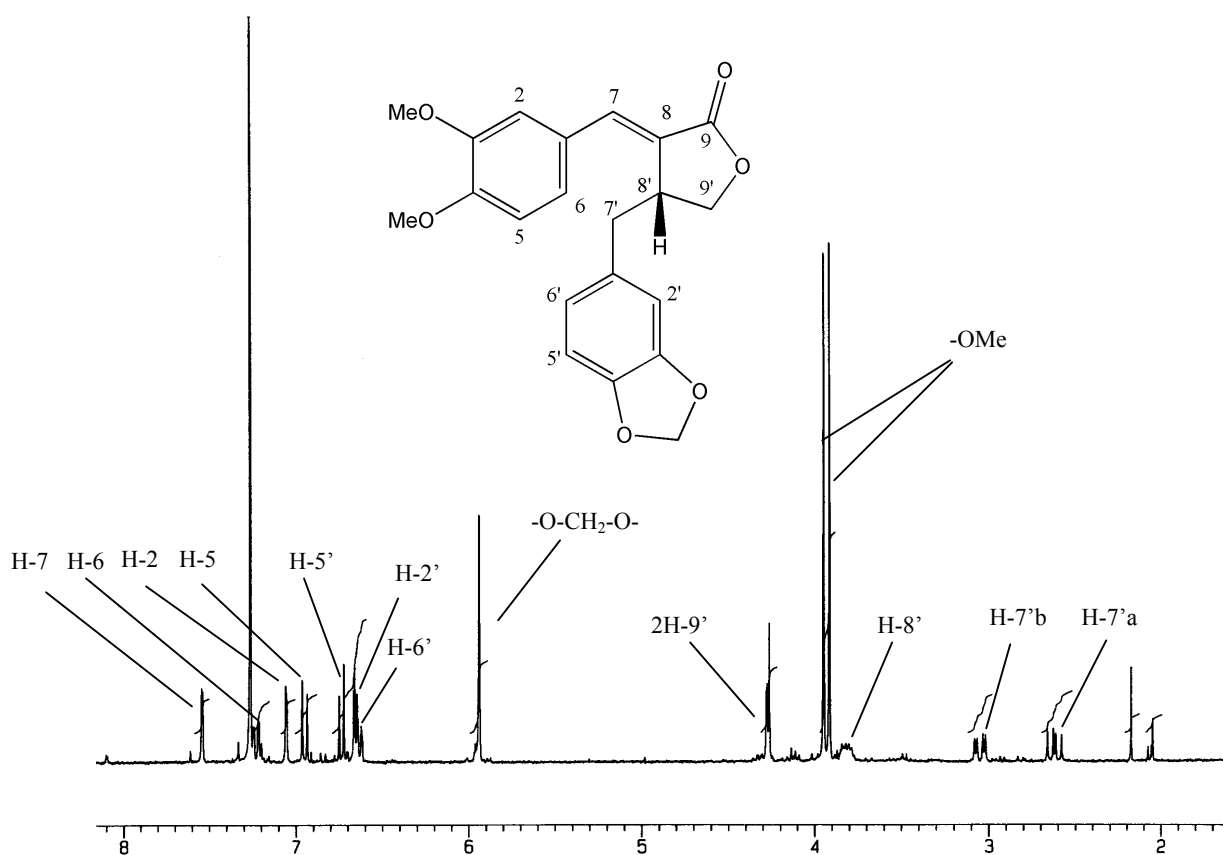
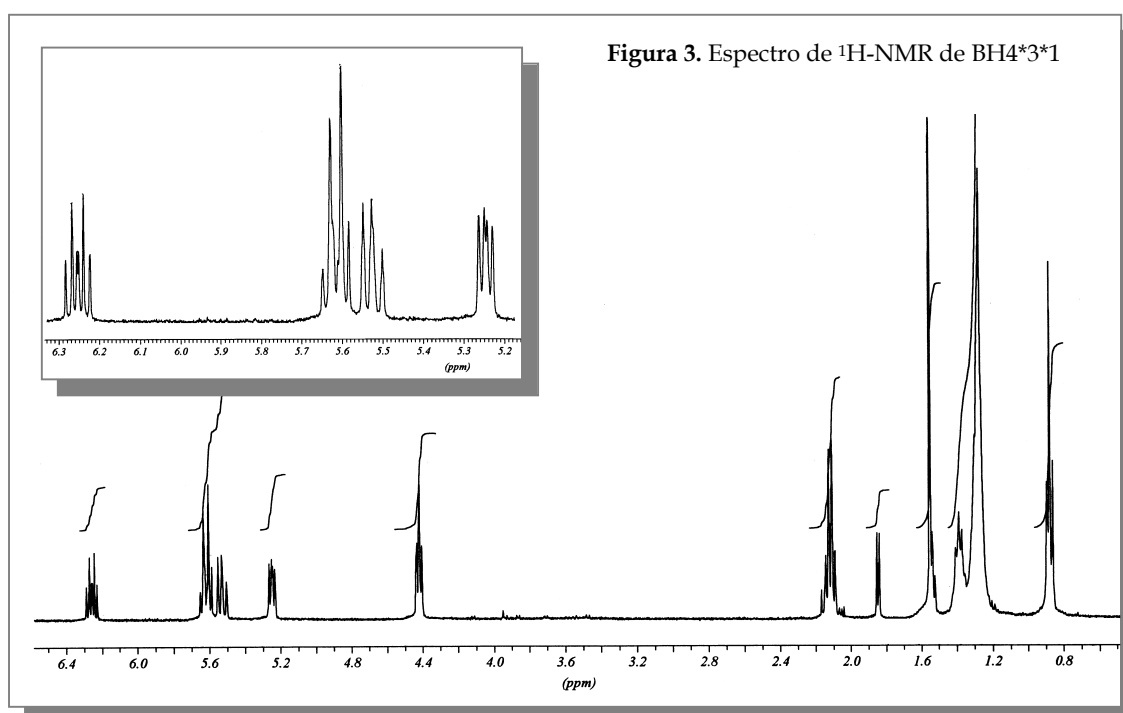


Figura 2. Espectro de 1H -NMR ($CDCl_3$) de **kaerofilina**

²⁹⁶ Mikaya G.A., Turbelidze D.G., Kemertelidze E.P., Vol'fson N.S. *Planta Medica*, **43** (4), 378-80, (1981)

Producto-3. (BH4*3*1)

De la fracción BH4*3 se obtuvo mediante HPLC y con un tiempo de retención de 16.33 minutos, un producto aceitoso de peso molecular 260 uma y fórmula $C_{17}H_{24}O_2$ determinada por espectrometría de masas de alta resolución. El espectro de 1H -NMR ($CDCl_3$ a 400 MHz) (Fig. 3) muestra un triplete con integral para tres protones centrado a δ 0.88 que podría corresponder a un grupo metilo, un multiplete entre δ 1.2 y 1.4 que integra para 10 protones y que podrían corresponder a cinco grupos metileno, un doblete a δ 1.85 con $J=5.4$ Hz, un cuadruplete a δ 2.12 con integral para dos protones, un doblete que integra para dos protones centrado a δ 4.42 con $J_1=1.3$ Hz y $J_2=6.4$ Hz y otro doblete a δ 5.25 (1H) con $J_1=5.4$ Hz y $J_2=8.2$ Hz. Entre δ 5.50 y 6.3 se observan dos multipletes que podrían atribuirse a cuatro protones olefínicos, estando la primera de dichas señales centrada a δ 5.50 (1H) y la segunda entre δ 5.59 y 5.65 (2H). Finalmente a δ 6.26 se observa un doble triplete que integra para un protón con $J_1=1.6$ Hz, $J_2=6.4$ Hz, $J_3=11.3$ Hz. Esta señal es característica de un hidrógeno olefínico unido a un metileno y en disposición *cis* respecto al otro hidrógeno del doble enlace. Por otra parte el espectro de ^{13}C -NMR muestra señales para un metilo (δ 14.1) y siete metilenos (δ 22.6, 27.7, 29.1, 29.1, 29.3, 31.8 y 61.2). La señal a δ 61.2 puede deberse a un metileno unido a un grupo hidroxilo. Además se observan señales para 4 carbonos olefínicos a δ 109.2, 127.8, 134.6 y 145.9 y para cuatro carbonos acetilénicos a δ 68.7, 74.4, 78.7 y 83.4.



Estos datos son coherentes con una estructura lineal de 17 carbonos con dos grupos acetilénicos y dos olefinicos, una cadena hidrocarbonada de siete carbonos y dos grupos hidroxilo. Compuestos similares existen en otras umbelíferas como es el caso del principio tóxico de *Cicuta virosa*, la (-)-cicutoxina o heptadeca-(8E, 10E, 12E)-trien-4,6-diin-1,14-diol (Fig. 4), también con 17 carbonos, biosintetizada por desaturación progresiva de un ácido graso y que está presente en todas las partes de la planta²⁹⁷.

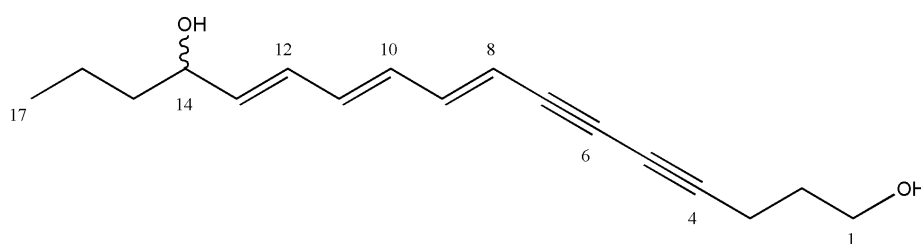


Figura 4. Cicutoxina (*Cicuta virosa*)

Los datos espectroscópicos de BH4*3*1 coinciden con los de **2(Z)-9(Z)-heptadecadien-4,6-diino-1,8-diol** aislado de *Bupleurum salicifolium*²⁹⁸ y cuya estructura se muestra en la Figura 5. Esta hipótesis fue confirmada por medio de espectroscopía bidimensional homonuclear (¹H-¹H COSY (Fig. 6)) y heteronuclear (HSQC (Fig. 7) y HMBC) que permitieron llevar a cabo las asignaciones del espectro de ¹H-NMR y de ¹³C-NMR respectivamente.

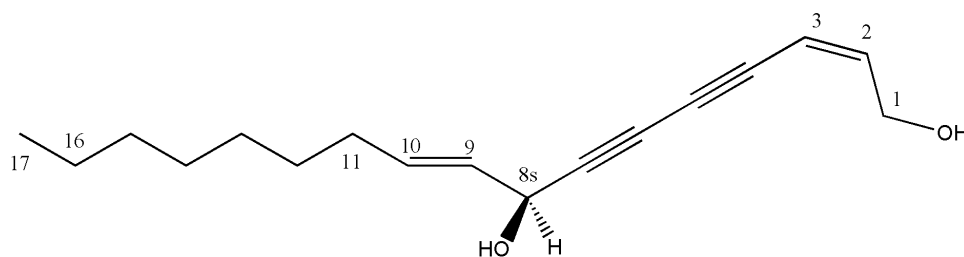


Figura 5. 2(Z)-9(Z)-heptadecadien-4,6-diino-1,8-diol

Por otra parte, el valor de las constantes de acoplamiento entre H-9 y H-10 de 10.8 Hz, indica que el doble enlace entre C-9 y C-10 es Z, lo cual confirma la estructura del compuesto.

²⁹⁷ Wittstock U., Hadacek E., Wurz E., Teuscher E., Greger H. *Planta Med.*, **61**, 439-45, (1995)

²⁹⁸ Estevez-Braun A., Estevez-Reyes R., Moujir L.M., Ravelo A.G., González A.G. *Journal of Natural Products*, **57** (8), 1178-82, (1994)

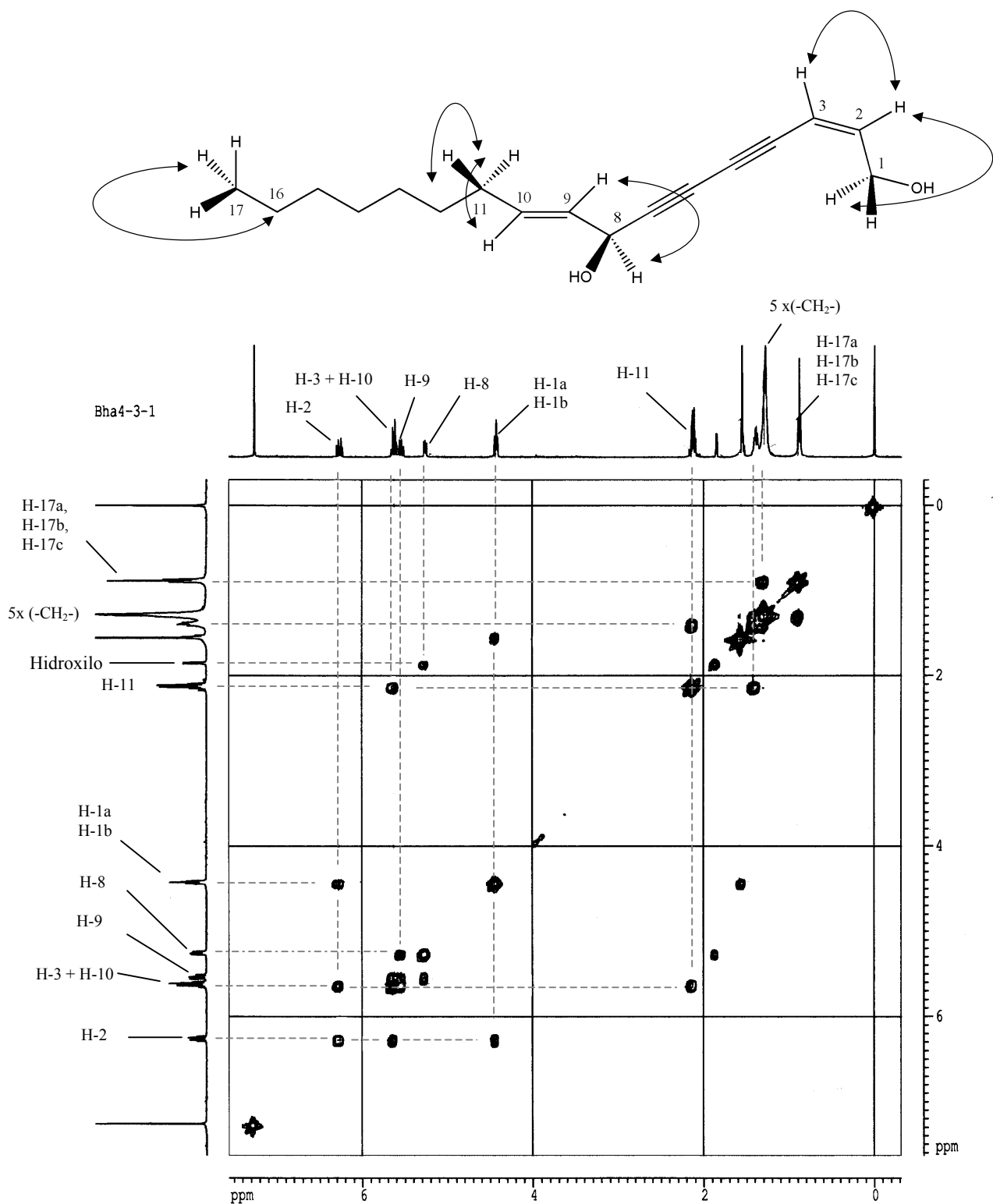


Figura 6. Experimento COSY de BH4*3*1 (2,9-heptadecadien-4,6-diino-1,8-diol)

El acoplamiento entre la señal correspondiente a H-8 (dd, δ 5.25, $J_1=5.8$ Hz, $J_2=8.2$ Hz) y el doblete a δ 1.85 ($J=5.4$ Hz) permitió asignar este último al grupo hidroxilo sobre C-8.

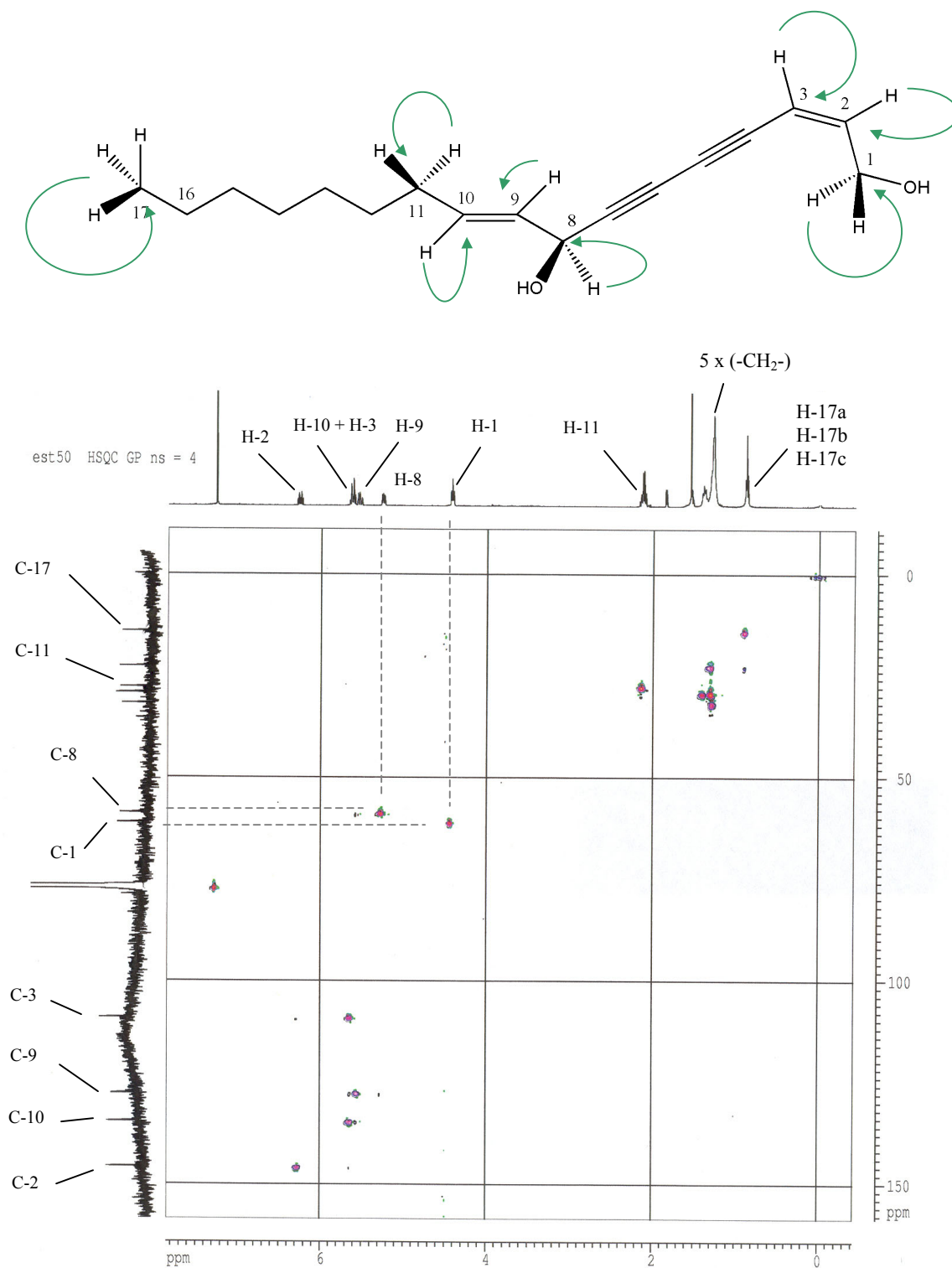


Figura 7. Experimento HSQC de BH4*3*1
(2,9-heptadecadien-4,6-diino-1,8-diol)

El experimento HSQC permitió hacer, entre otras, las asignaciones de los carbonos unidos a grupos hidroxilo: δ 58.1 (C-8) y 61.2 (C-1).

Producto-4. (Bha4*3*2)

De la fracción IV del percolado (AcOEt/hexano 20/80) de la raíz de *Bupleurum handiense* se aislaron, mediante cromatografía en columna y HPLC, aproximadamente 30 mg de un aceite viscoso que en espectrometría de masas de alta resolución dio la fórmula $C_{21}H_{22}O_6$. En su espectro de 1H -NMR ($CDCl_3$) (Fig. 8) se observan dos multipletes a δ 2.48 (1H) y a 2.57 (3H), dos multipletes, a δ 2.83 (1H) y 2.97 (1H), dos multipletes que integran para un protón cada uno centrados a δ 3.86 y 4.12, estando la primera de éstas superpuesta con dos singuletes a δ 3.84 (3H) y 3.85 (3H), atribuidos a grupos metoxilo. A δ 5.92 hay un singulete con integral para dos protones y a campos más bajos se observan señales para 6 protones aromáticos: un singulete a δ 6.44 (1H), tres dobletes centrados a δ 6.67 (1H), 6.68 (1H) y 6.78 (1H) y dos dobles dobletes centrados a δ 6.45 (1H) y 6.68 (1H). Estos datos espectroscópicos, propios de un lignano del tipo de la dibencil- γ -butirolactona con anillos 1,3,4-trisustituidos, coinciden con los de la **bursehernina**, aislado por primera vez de *Bursera schlechtendalii*²⁹⁹ y también de la parte aérea de *Bupleurum handiense*²⁷⁰.

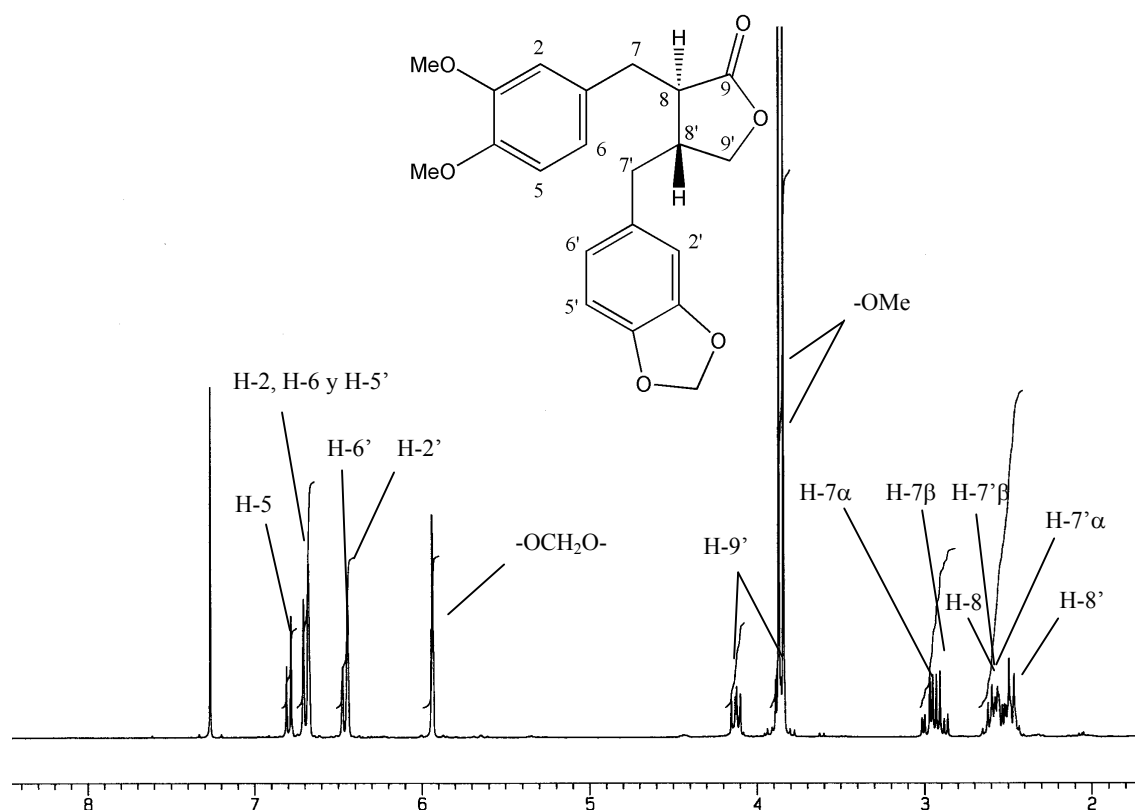


Figura 8. Espectro de 1H -NMR ($CDCl_3$) de bursehernina

²⁹⁹ McDoniel P.B., Cole J.R. *J. Pharm. Sci.*, **61** (12), 1992-4, (1972)

Producto-5. (Bha7*5)

Mediante cromatografía en columna y HPLC fue aislado, a partir de la fracción IV del percolado (AcOEt/hexano 20/80), un aceite con fórmula $C_{20}H_{18}O_6$ (HR-MS) y cuyo espectro de 1H -NMR ($CDCl_3$) dado en la Figura 9 muestra las siguientes señales: dos dobles dobles que integran cada uno para un protón centrados a δ 2.61 y 3.03, un multiplete centrado a δ 3.79 (1H), un singulete a δ 3.95 (3H), un triplete a δ 4.25 (2H), un singulete a 5.69 (1H), un singulete a δ 5.94 (2H) que debía corresponder a un grupo metilendioxi y un doblete a δ 7.50 (1H) que atribuimos a un protón bencílico. Entre δ 6.66 y 7.21, se observan señales para 6 protones aromáticos, correspondientes a dos anillos 1,3,4-trisustituados. Estos datos espectroscópicos coinciden con los de un lignano del tipo de la E-2-bencilidén-3-bencil- γ -butirolactona que es conocido en la bibliografía como **guamarol**²⁹⁴.

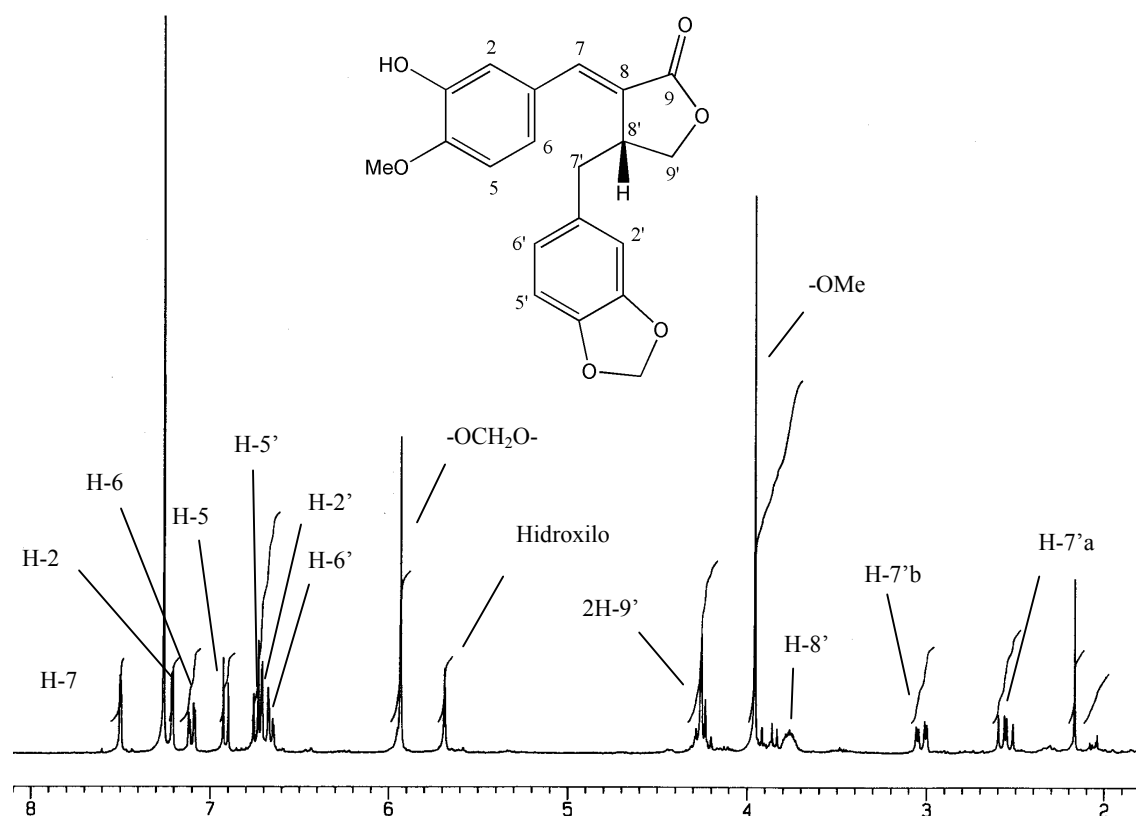


Figura 9. Espectro de 1H -NMR ($CDCl_3$) de guamarol

Producto-6. (Cristales de Bhc 37-46)

Mediante cromatografía en columna a partir de la fracción V del percolado se obtuvo un producto aceitoso de fórmula $C_{20}H_{18}O_7$ (HR-MS) que mostró las siguientes señales en su espectro de 1H -NMR ($CDCl_3$) (Fig. 10): un doblete centrado a δ 3.71 con integral para dos protones, un singulete a δ 3.89 (3H) que atribuimos a un metoxilo, un singulete que integra para dos protones a δ 4.54, un singulete a δ 5.66, un singulete a δ 5.94 (3H), un multiplete a δ 6.55 (1H), cuatro dobletes a δ 6.54, 6.72, 6.84 y 6.98 que integran para un protón cada uno y un doble doblete con integral de un protón a δ 6.96. Estos valores coinciden con los del lignano conocido en la bibliografía como **chasnarolido**³⁰⁰.

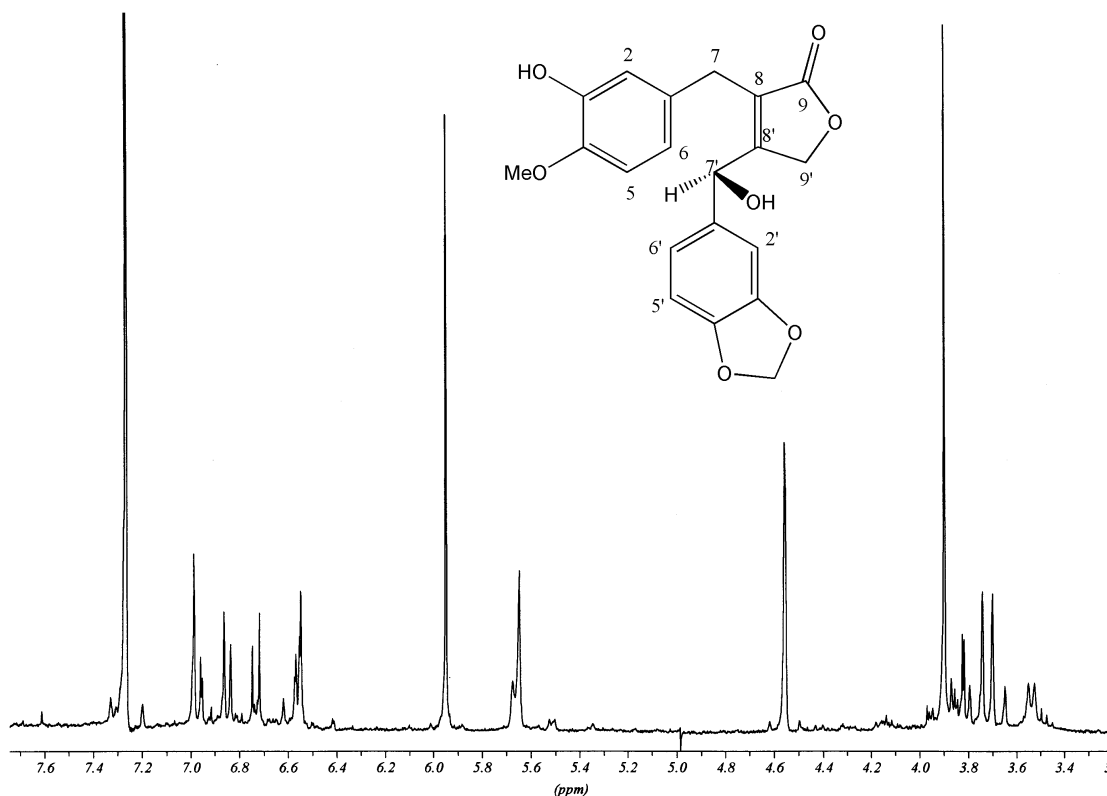


Figura 10. Espectro de 1H -NMR ($CDCl_3$) de chasnarolido

³⁰⁰ Estevez-Reyes R., Estevez-Braun A., González A.G. *Journal of Natural Products*, **56** (7), 1177-81, (1993)

Producto-7. (Cristales de Bhb7)

De la fracción Bhb7 se obtuvo un sólido cristalino que presenta fluorescencia azul a la luz ultravioleta. El espectro de $^1\text{H-NMR}$ muestra un singulete a δ 3.95 con integral para 3 protones, una señal compleja a δ 4.30, un doblete a δ 6.27 con $J=10$ Hz y con integral para un protón, dos singuletes a δ 6.84 y 6.92 que integran para un protón en cada caso y un doblete centrado a δ 7.60 con $J=10$ Hz y que integra para un protón. Estos datos coinciden con los de 6-hidroxi-7-metoxi-cumarina, conocida en la bibliografía consultada³⁰¹ como **isoescopoletina**.

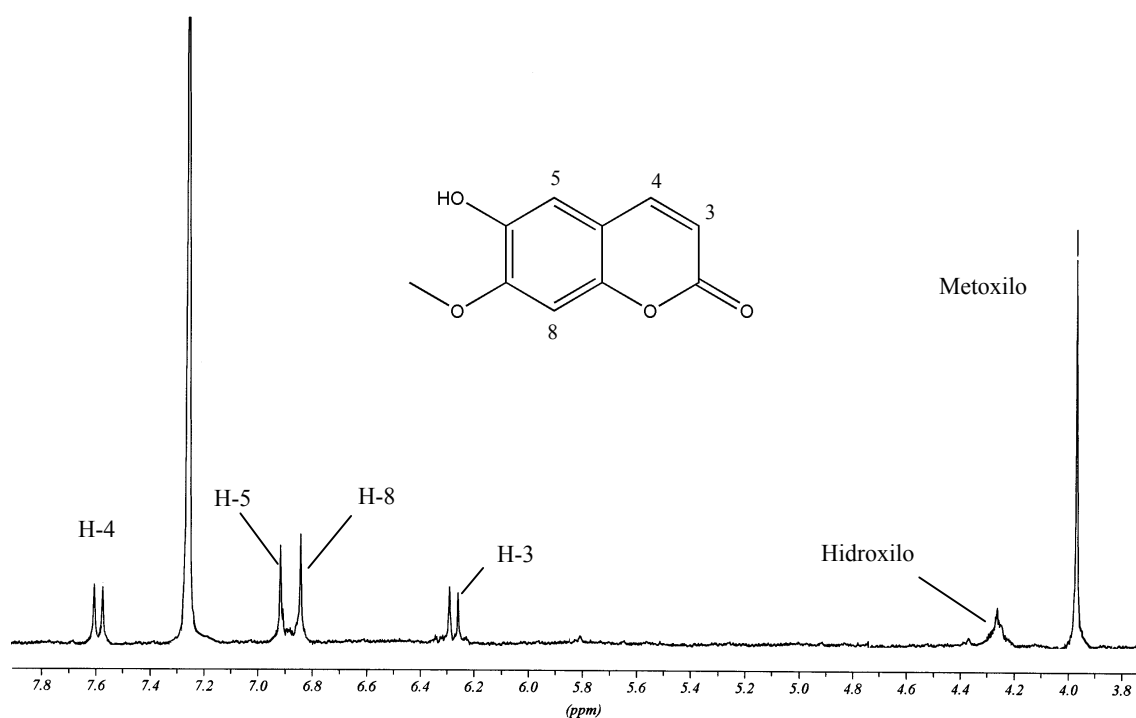


Figura 11. Espectro de $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) de la isoescopoletina

³⁰¹ Shafizadeh F., Melnikoff A.B. *Phytochemistry*, **9** (6), 1311-6, (1970)

Producto-8. (Bhb6*3)

Mediante cromatografía en columna y HPLC fue aislado, a partir de la fracción V del percolado (AcOEt/n-hexano 20/80), un lignano de fórmula $C_{21}H_{20}O_7$ (HR-MS) en cuyo espectro de 1H -NMR ($CDCl_3$), mostrado en la Figura 12, se pueden observar las siguientes señales: a δ 3.70 un doblete (2H), a δ 3.87 un singulete que integra para seis protones, un singulete a δ 4.56 con integral de dos protones, que es característico del metileno lactónico de las 2-butenolidas, a δ 5.71 y 5.93 se observan dos singuletes que integran para uno y dos protones respectivamente, atribuyéndose este último a un grupo metilendioxi. Superpuesto a esta señal hay un multiplete que integra para un protón. Entre δ 6.52 y 7.05 se encuentran las señales correspondientes a cuatro dobletes y dos dobles dobletes característicos de los anillos bencénicos 1,3,4 trisustituídos y que integran para un total de 6 protones. Estos valores coinciden con los del **metilchasnarolido**³⁰⁰.

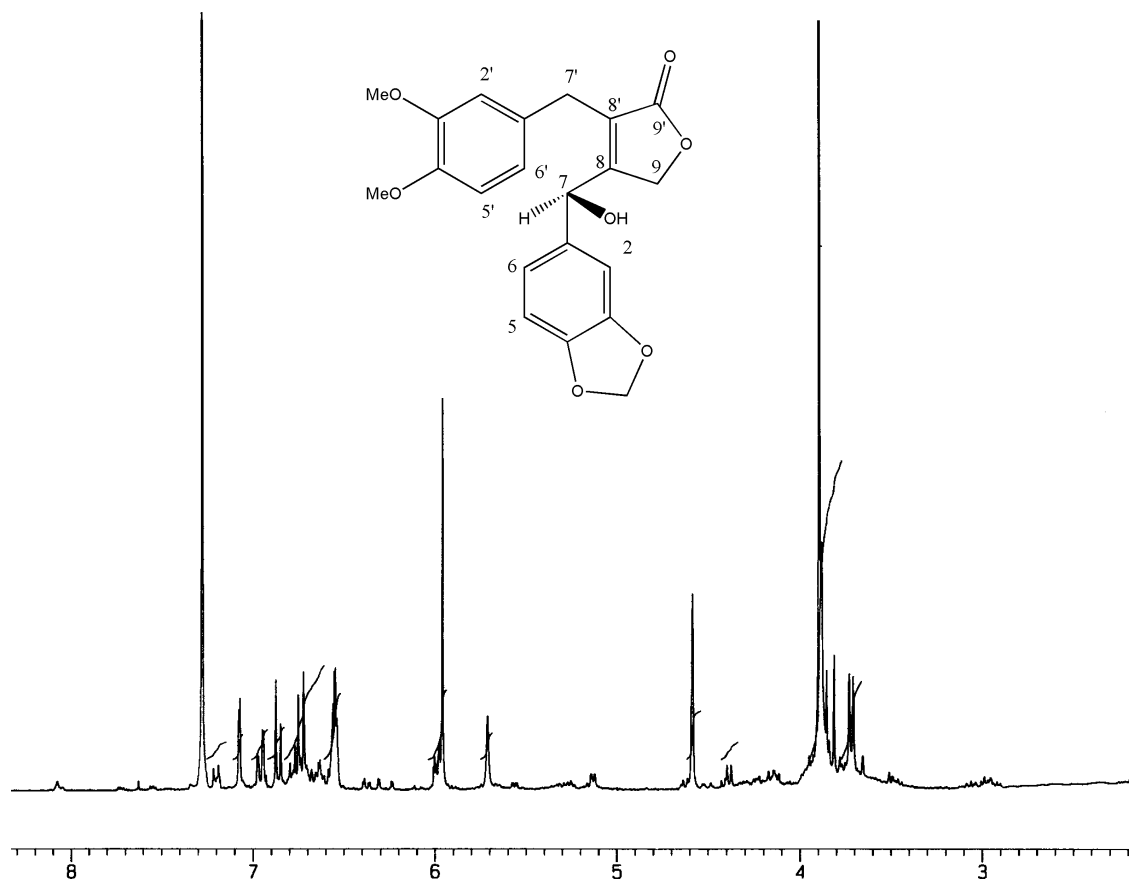


Figura 12. Espectro 1H -NMR ($CDCl_3$) de **metilchasnarolido**

Producto-9.

A partir de la fracción VI del percolado (acetato de etilo 100 %), combinando la cromatografía en columna de gel de sílice y HPLC se aisló un producto que en espectrometría de masas FAB, muestra un ión molecular a 1074, y en cuyo espectro de $^1\text{H-NMR}$ se observan las siguientes señales dadas en la Tabla 1.

H	δ (ppm)
H-28	3.17
H-28	3.45
H-3	3.40
H-23	3.87
H-23	3.98
H-16	4.01
H-12	5.42
H-11	5.87

H	δ (ppm)
G-1	4.59
G-2	4.88
G-3	5.12
G-4	5.12
G-5	3.66
G-6	4.12

G: glucosa

H	δ (ppm)
F-1	4.29
F-2	3.82
F-3	3.82
F-4	5-19
F-5	3.66
F-Me	1.17

F: Fucosa

Tabla 1. Asignaciones de las señales del espectro de $^1\text{H-NMR}$ de **9**

Este conjunto de señales resultó ser idéntico al de la **saikogenina F**, que previamente había sido aislada de la parte aérea de *Bupleurum handiense*²⁷⁰ y de la raíz de *Bupleurum falcatum* L.^{302,303}.

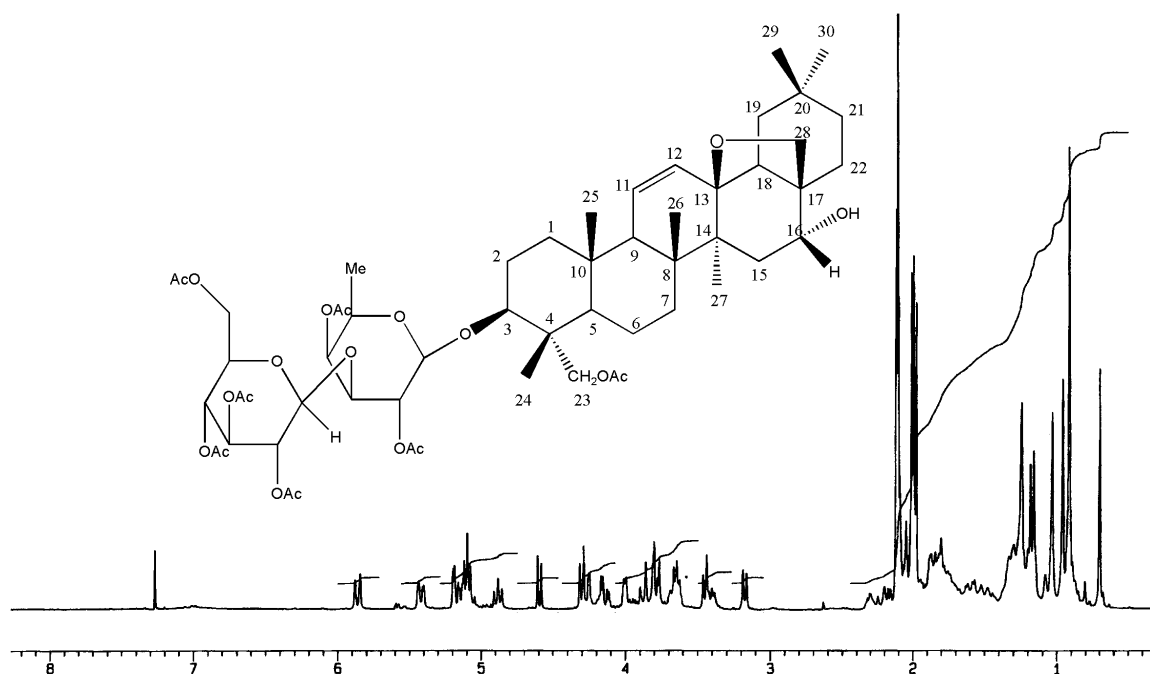


Figura 13. Espectro de $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) de **saikogenina F**

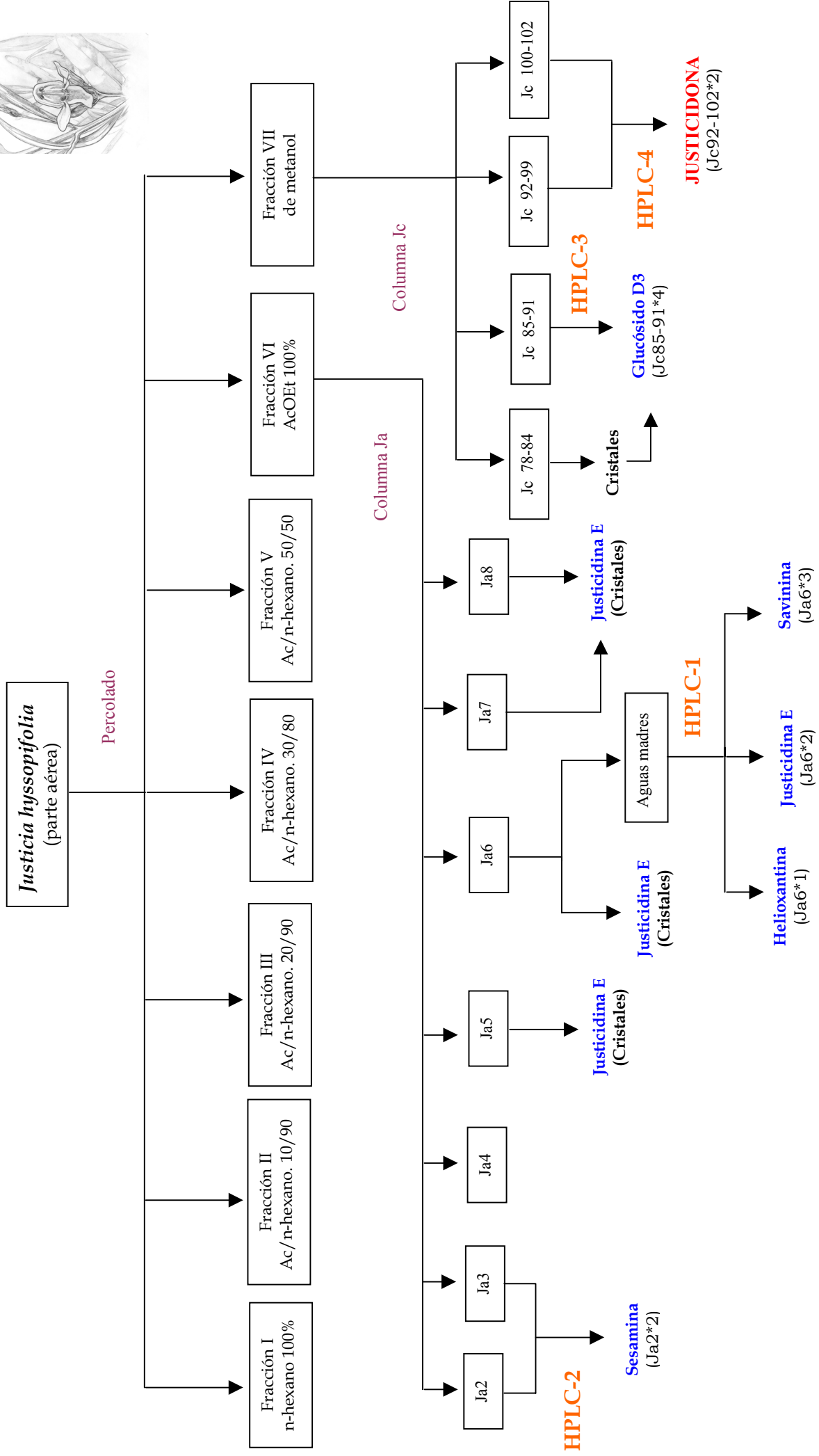
³⁰² Kubota T., Hinoh H. *Tetrahedron Letters*, 7 (41), 5045-8, (1966)

³⁰³ Kubota T., Hinoh H. *Tetrahedron Letters*, (3), 303-6, (1968)



Justicia hyssopifolia

Parte teórica



Producto-10. (Cristales de Ja5-Ja8)

Mediante cristalización de las fracciones Ja5-Ja8 y por HPLC se obtuvo un producto que en disolución mostró una intensa fluorescencia azul a la luz ultravioleta. En espectrometría de masas de alta resolución dio la fórmula $C_{20}H_{12}O_6$ y su espectro de 1H -NMR ($CDCl_3$), mostrado en la Figura 14, presentó las siguientes señales: a δ 5.20 se observa un singulete con integral para dos protones, a δ 6.08 y 6.09 hay dos singuletes integrando para dos protones cada uno. Con valores de δ 6.77-6.99 (3H) aparece un multiplete. Finalmente, se observan tres singuletes con δ 7.10 (1H), 7.31 (1H) y 8.26 (1H). Estos datos espectroscópicos, propios de un lignano del tipo arilnaftalénico, son idénticos a los del lignano conocido en la bibliografía como **justicidina E**^{304,305}.

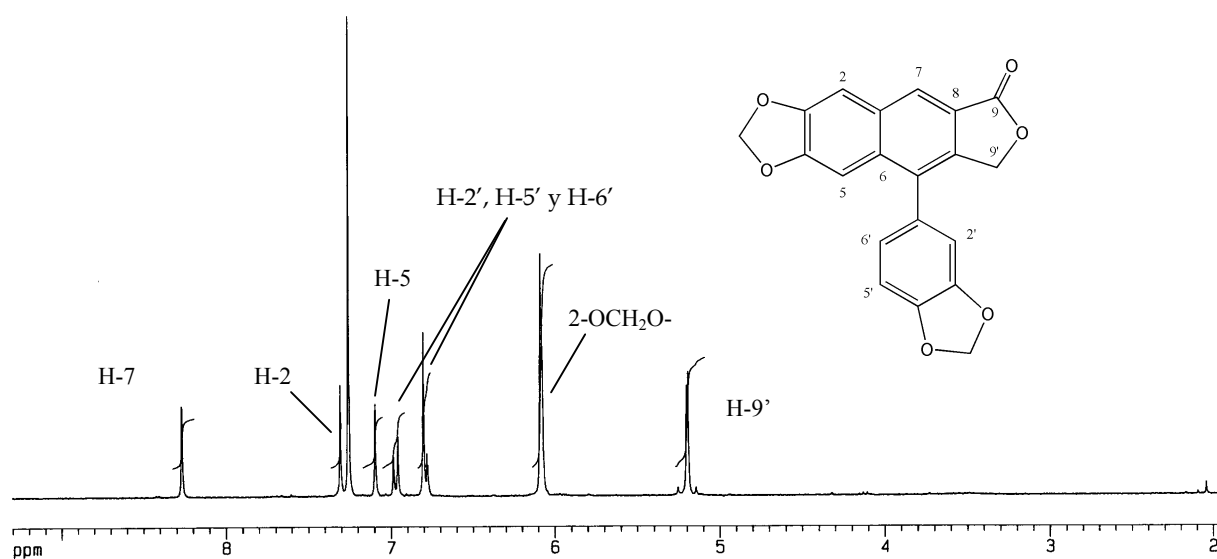


Figura 14. Espectro de 1H -NMR ($CDCl_3$) de justicidina E

³⁰⁴ Wada K., Munakata K. *Tetrahedron Letters*, **23**, 2017 (1970)

³⁰⁵ Banerji J., Das B., Chatterjee A., Shoolery J.N. *Phytochemistry*, **23**, 2323 (1984)

Producto-11. (Ja6*1)

Mediante HPLC, a partir de la fracción Ja6, se aisló un producto de color amarillo de peso molecular 348 uma y que mostró en disolución una intensa fluorescencia azul a la luz ultravioleta. Su espectro de $^1\text{H-NMR}$ (Fig. 15) muestra las siguientes señales: centrados a δ 5.18 y 5.25 se observan dos dobletes que integran para un protón cada uno y que podrían corresponder a un metileno lactónico. Con el desplazamiento esperado para grupos metilendioxi, δ 5.96 y 6.06, aparecen dos dobles dobletes que integran para dos protones cada uno. En la zona aromática se observa un multiplete comprendido entre δ 6.77 y 6.91 con integral para tres protones y con valores de δ 7.31 y 7.70, se observan dos dobletes con la misma constante de acoplamiento ($J=8.6$ Hz), con integral para un protón en cada caso. Finalmente, se observa un singulete a δ 8.42 que integra para un protón, señal que debe corresponder a un protón bencílico. Estos datos coinciden con los de un lignano del tipo arilnaftalénico conocido como **helioxantina** en la bibliografía consultada^{306,307,308}.

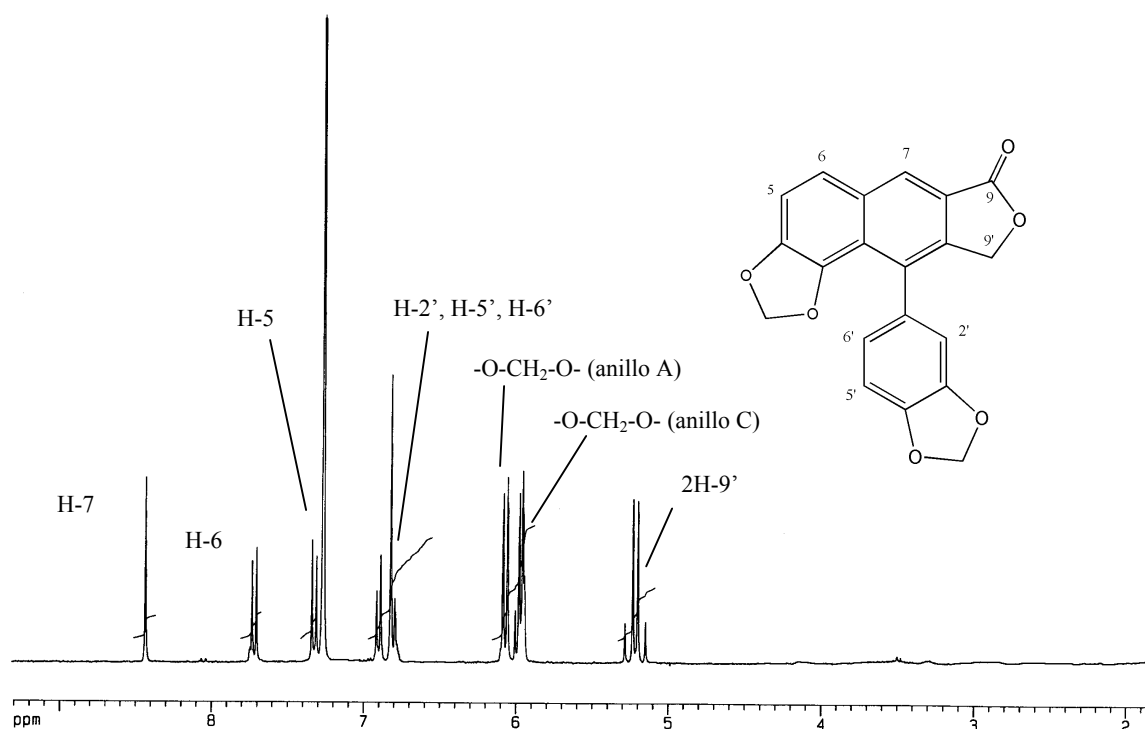


Figura 15. Espectro de $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) de **helioxantina**

³⁰⁶ Olaniyi A.A, Powell J. W. *Journal of Natural Products*, **43**, 482, (1980)

³⁰⁷ Holmes T.L., Stevenson R. *J. Chem. Soc. (C)*, 2091, (1971)

³⁰⁸ Olaniyi A. *Planta medica*, **44**, 154, (1982)

Producto-12. (Ja6*3)

A partir de la fracción Ja6 fue aislado mediante HPLC un sólido de peso molecular 352 uma. Su espectro de $^1\text{H-NMR}$, mostrado en la Figura 16, presenta las siguientes señales: a δ 2.58 y 2.99 se observan dos dobles dobles que integran para un protón cada uno, centrado a δ 3.73 hay un multiplete que integra para un protón, a δ 4.25 un singulete ancho con integral para dos protones y que atribuimos a un metileno lactónico, un singulete ancho a δ 5.93 (2H) y un singulete a δ 6.04 (2H) que deben corresponder con dos grupos metilendioxi. Además entre δ 6.63 y 7.08 se observan señales para seis protones aromáticos y un doblete a δ 7.49 que corresponde a un protón bencílico (H-7). Los datos espectroscópicos de este producto apoyan la idea de que se trata de una lignano con dos anillos disustituídos del tipo de la E-bencilidén-bencil- γ -butirolactona. Finalmente dichos datos resultaron ser idénticos a los del lignano conocido como **savinina** en la literatura química³⁰⁹.

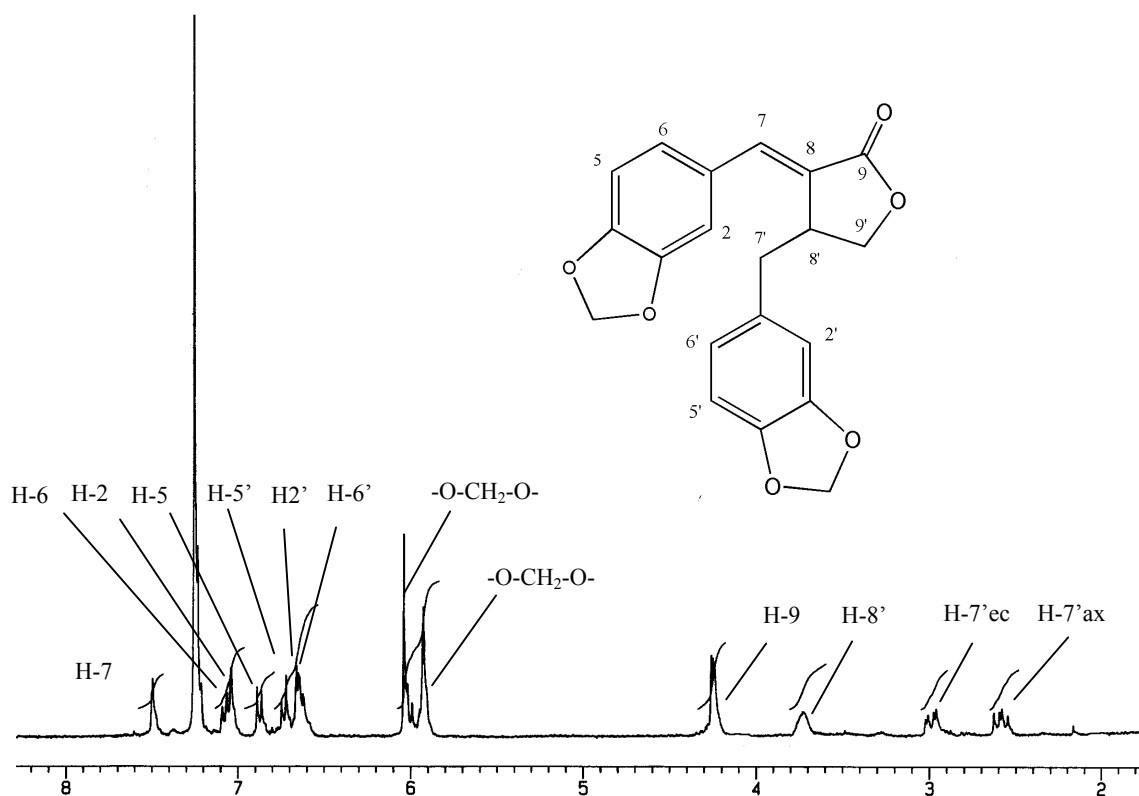


Figura 16. Espectro de $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) de savinina

³⁰⁹ Shie H.-L., Cordell G.A., Lankin D.C., Lotter H. *J. Org. Chem.*, **55** (17), 5139-45, (1990)

Producto-13. (Ja2*2)

Mediante HPLC se aisló un compuesto de peso molecular 354 uma con espectro de $^1\text{H-NMR}$ (Fig. 17) que presenta las siguientes señales: a δ 3.05 se observa un multiplete que integra para dos protones, centrados a δ 3.86 y 4.23 e integrando para dos protones cada uno hay dos dobles dobles, a δ 4.71 un doblete con integral para dos protones y, con el desplazamiento típico de un grupo metilendioxi (δ 5.96), un singlete que integra para cuatro protones. Además hay señales para 6 protones aromáticos entre δ 6.78 y 6.84 (multiplete). Estos datos coinciden con los del producto conocido en la bibliografía como **sesamina**, un lignano del tipo de los dibenzofuranos^{310,311}.

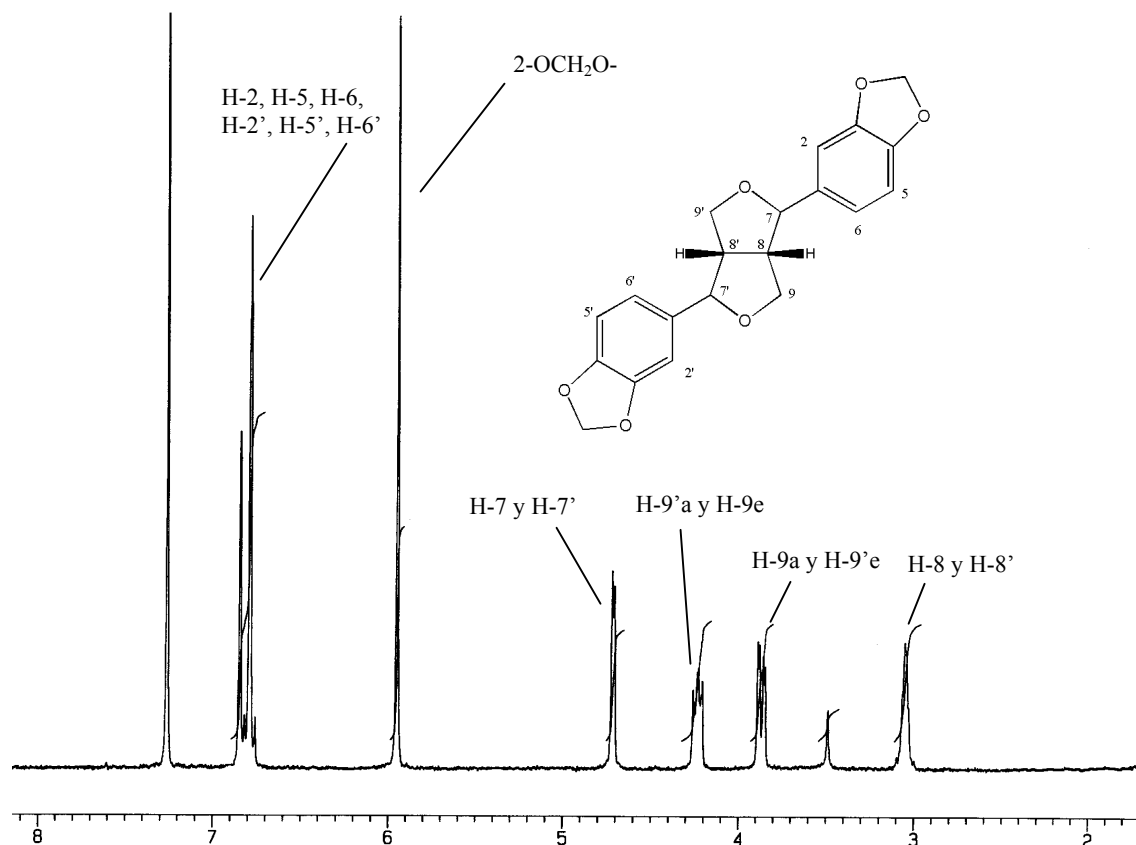


Figura 17. Espectro de $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) de **sesamina**

³¹⁰ Iida T., Nakano M., Ito K. *Phytochemistry*, **21** (3), 674-5, (1982)

³¹¹ Marcos M., Jiménez C., Villaverde M.C., Riguera R., Castedo L., Stermitz F. *Planta medica*, **56**, 89, (1990)

Producto-14. (Jc85-91*4)

De la fracción Jc85-91 y mediante HPLC se aisló un compuesto de aspecto siruposo que mostró una intensa fluorescencia azul a la luz ultravioleta. Su espectro de $^1\text{H-NMR}$ ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$), mostrado en la Figura 18, resultó ser bastante complejo, ya que las señales aparecen duplicadas. Entre δ 2.86 y 3.76 hay señales que podrían deberse a un azúcar, centrados a δ 4.56 y 4.61 hay dos dobletes que integran cada uno para un protón, cuatro dobletes a δ 4.90 (1H), 4.92 (1H), 5.42 (1H) y 5.49 (1H) y que fueron atribuidos a las señales duplicadas de la γ -lactona. Con el desplazamiento típico de los grupos metilendioxi, se observó a δ 5.99 un singulete con integral para dos protones y a δ 6.03 (2H) un doblete. En la zona aromática se observa un multiplete que integra para tres protones entre δ 6.57 y 7.17. Centrados a δ 7.32, 7.33, 7.93 y 7.94 hay cuatro dobletes que integran para un protón cada uno y dado que las señales están duplicadas, podrían corresponder a sólo dos protones aromáticos. Finalmente, se observa un singulete a δ 8.33 (1H). La intensa fluorescencia, sus señales duplicadas y sus desplazamientos en el espectro de $^1\text{H-NMR}$ demuestran sin lugar a dudas que el producto es el **glucósido D3** que ya había sido aislado de esta planta³¹².

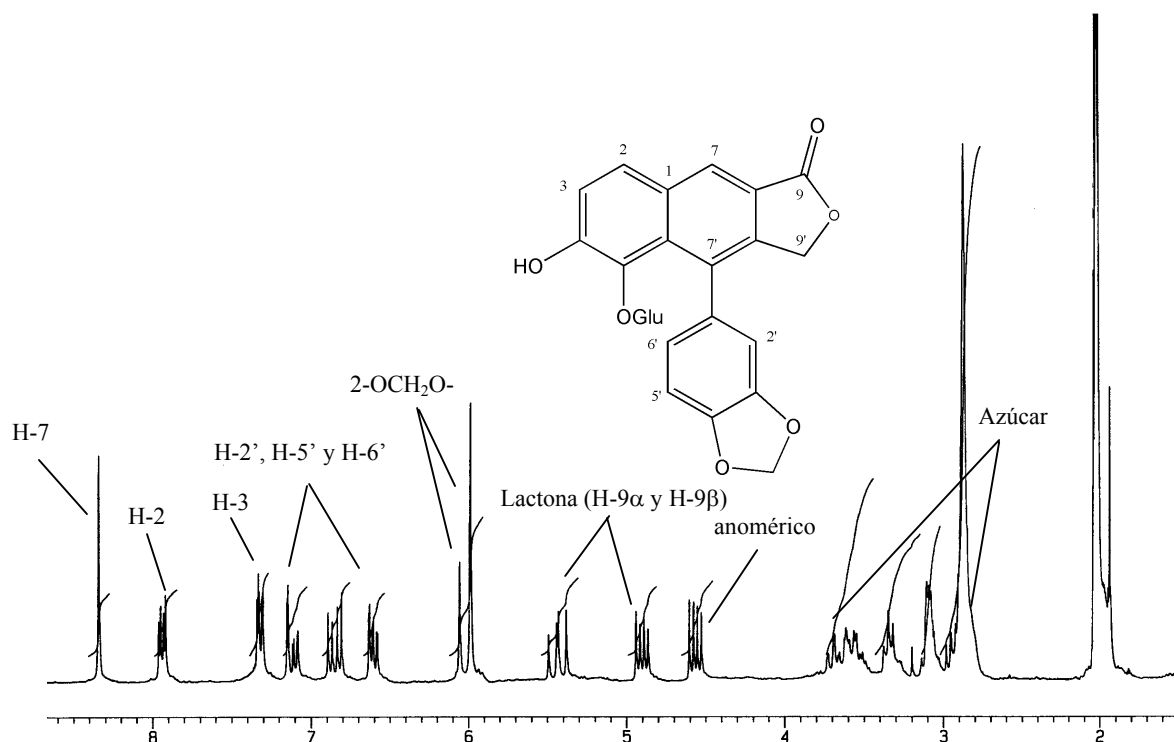


Figura 18. Espectro de $^1\text{H-NMR}$ ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) del **glucósido D3**

³¹² Trujillo J.M., Jorge E., Navarro E., Boada J. *Phytochemistry*, **29** (9), 2991-3, (1990)

Producto-15. (Jc92-102*2)

De la fracción más polar del extracto de *Justicia hyssopifolia* (fracción VII) se aisló mediante HPLC (Fig. 19), con un $t_R = 5.78$ minutos y en pequeña cantidad, un compuesto que en disolución mostró un color naranja y que una vez llevado a sequedad resultó ser un sólido pulverulento de intenso color rojo.

Ac/Hex/MeOH : 70/25/5
Kromasil 100 Si 5 μm 1x25
Fecha: 9/6/2000

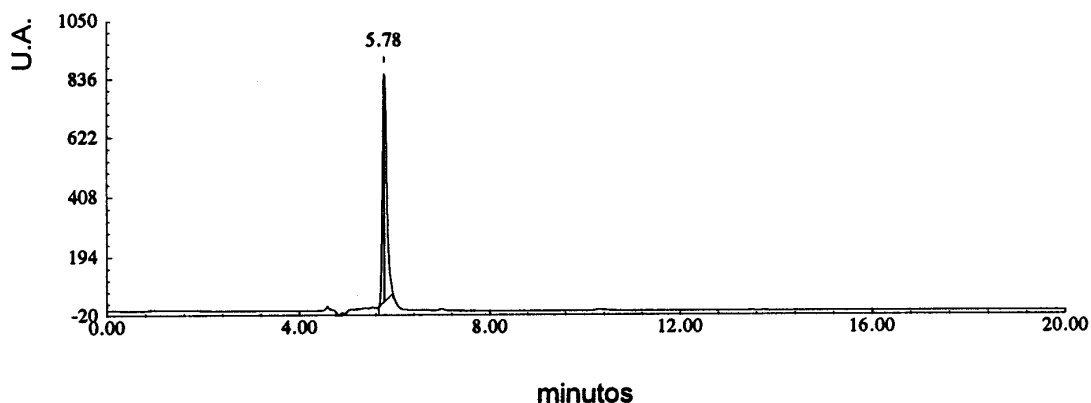


Figura 19. Cromatograma obtenido tras inyectar en el cromatógrafo de HPLC el compuesto Jc92-102*2.

El espectro de $^1\text{H-NMR}$ realizado en deuterocloroformo (Fig. 20) muestra un singulete a δ 3.86 que integra para 3 protones, dos dobletes centrados a δ 5.06 y 5.17 que integran para un protón cada uno, un doblete a δ 6.05 (2H), tres singuletes con integral para un protón a δ 6.26, 6.63 y 8.72, un doblete a δ 6.62 y un doblete a δ 6.90 con integral para un protón en cada caso. Por otra parte, el peso molecular de este compuesto es de 364 uma y su fórmula, determinada por espectrometría de masas de alta resolución, resulta ser $\text{C}_{20}\text{H}_{12}\text{O}_7$.

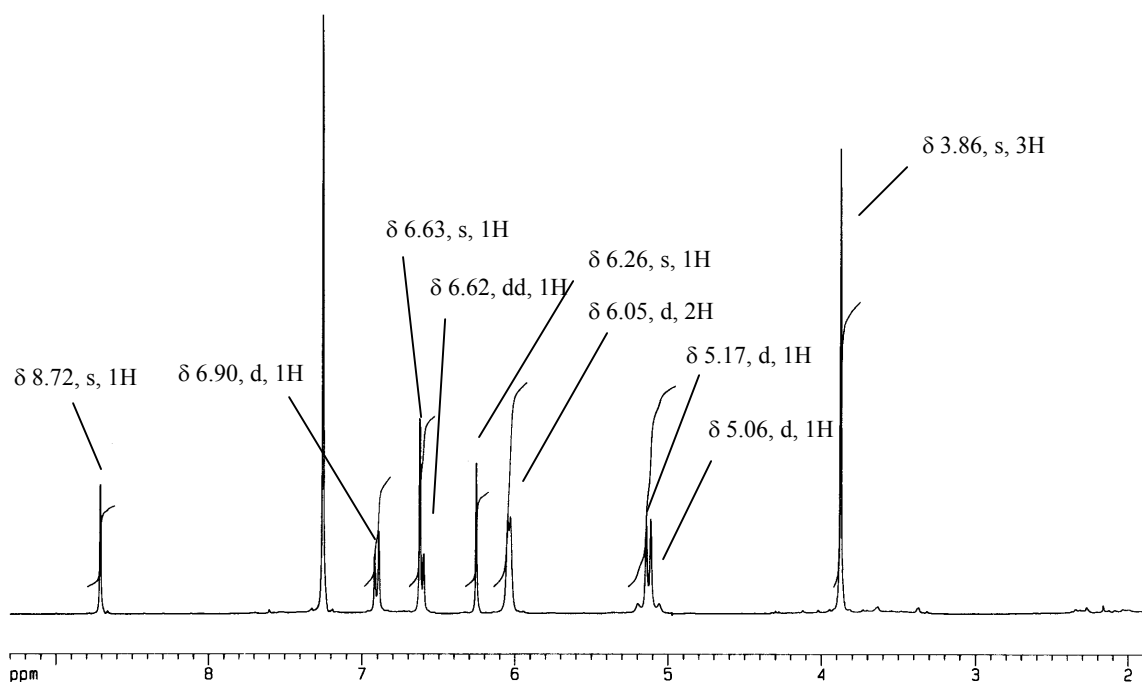


Figura 20. Espectro de $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) de Jc92-102*2

El conjunto de señales a δ 6.62, 6.63 y 6.90 pueden considerarse como típicas para un fenilo 3,4 disustituido. Por otro lado, la presencia de un doblete a δ 6.05 asignable al grupo metilendioxi, puede indicar que la sustitución 3,4 del fenilo se debe precisamente a este grupo, propio de muchos lignanos del tipo arilnaftalénico, como es el caso de los aislados de la planta en estudio. Otro dato característico de un lignano de este tipo es la presencia de una señal como singulete a δ 8.72, asignable al protón aromático H-7. Las señales a δ 5.06 y 5.17 junto a la banda de absorción a 1772 cm^{-1} en el espectro de infrarrojo, indican la presencia de una lactona, común a la gran mayoría de los lignanos arilnaftalénicos.

La señal como singulete a δ 6.26 es la única asignable al anillo A lo que indica que el resto del anillo debe estar sustituido. Una de estas sustituciones debe ser el grupo metoxilo a δ 3.86, por lo tanto las dos posiciones restantes podrían, en principio, corresponder a dos grupos hidroxilo, ya que la fórmula molecular reveló la presencia de 7 oxígenos. Pero esta hipótesis nos obliga a considerar una fórmula $\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{O}_7$, que corresponde a un peso molecular dos unidades por encima del dado.

La única posibilidad para ajustar esta estructura a la fórmula sería considerar que en lugar de dos grupos hidroxilo tengamos dos grupos carbonilo, con lo cual nos encontraríamos ante la estructura de una quinona, pudiendo ser una *p*-quinona o una *o*-quinona.

Esta hipótesis quedó confirmada por los datos aportados por el espectro de resonancia magnética nuclear de carbono 13 (Fig. 25), en el que aparecen señales a δ 169.1, 179.3 y 182.9. El valor δ 169.1 puede ser asignado a un carbonilo lactónico, pudiendo corresponder los otros valores a un sistema *orto* o *para* quinónico.

Los datos obtenidos a partir del estudio de los espectros de $^1\text{H-NMR}$ y $^{13}\text{C-NMR}$, junto a los aportados por la espectrometría de masas, podrían dar cuenta de cualquiera de las estructuras dadas en la Figura 22. En principio, las estructuras **e**, **f**, **k** y **l** pueden descartarse debido a que no presentan función oxigenada en C-4, que está presente, por razones biosintéticas, en todos los lignanos del tipo arilnaftalénico.

Por otra parte, es bien conocido el hecho de que en compuestos de este tipo con una lactona de tipo I, como justicidina B, justicidina E y retrochinesina (Fig. 21), el protón H-7 experimenta en $^1\text{H-NMR}$ un desplazamiento paramagnético mayor que en sus correspondientes retrolactonas (tipo II)³¹³. Esto nos permitiría descartar las estructuras **b**, **d**, **f**, **h**, **j**, **l**, **n** y **p**. Por lo tanto, el estudio debe centrarse en las estructuras **a**, **c**, **g**, **i**, **m** y **o**.

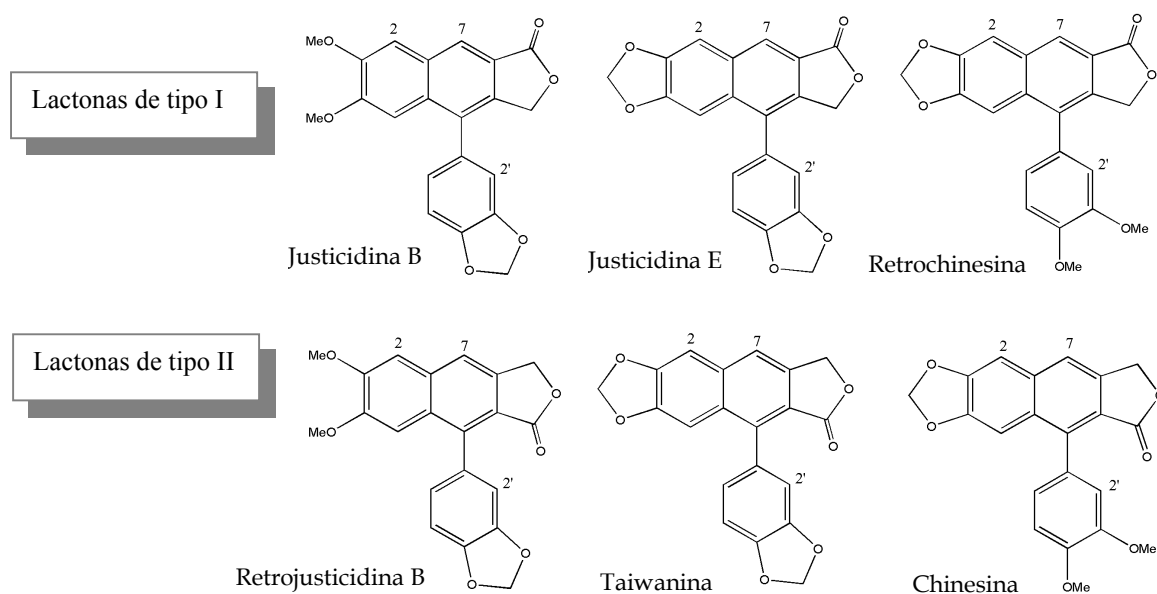


Figura 21. Lactonas de los tipos I y II

³¹³ Flanagan S.R., Harrowven D.C., Bradley M. *Tetrahedron*, **58**, 5989-6001 (2002)

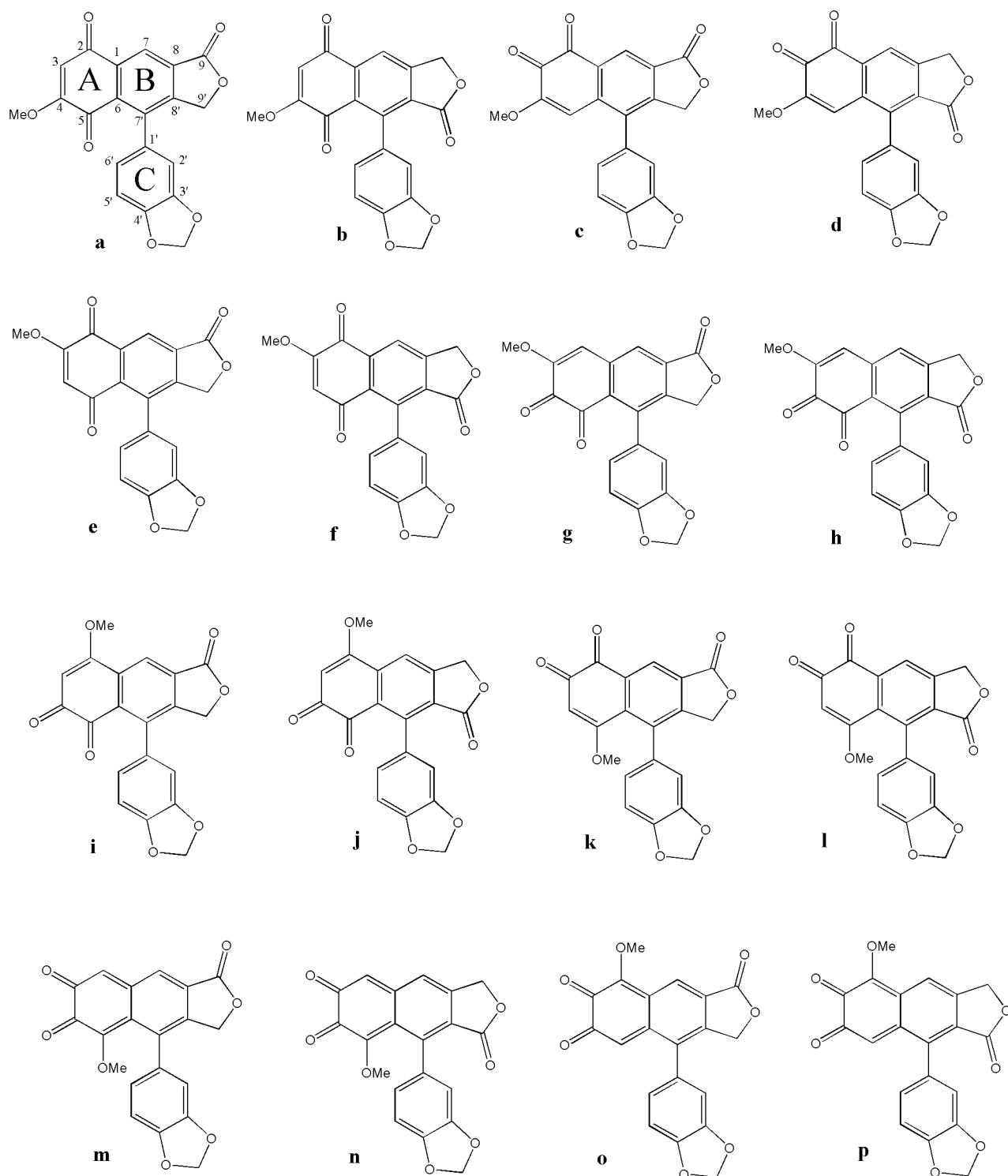


Figura 22. Posibles estructuras para la justicidona

El estudio detallado de los experimentos HSQC (Fig. 26) y HMBC (Fig. 27) permite establecer totalmente los valores del espectro de ^{13}C y, al mismo tiempo, hacer importantes deducciones de tipo estructural.

Tomando como hipótesis una estructura tipo *para*-quinona, nos queda como única posibilidad a considerar la estructura (**a**), ya que todas las demás quedan excluidas por las razones ya expuestas, a saber, ausencia de función oxigenada en C-4 y situación de la lactona. Los datos aportados por el experimento HMBC están de acuerdo con esta estructura. Así pues, existe una correlación a tres enlaces entre el protón H-7 y un carbono carbonílico a δ 182.9. Este carbono también está en correlación con otro protón que, en la fórmula (**a**), puede asignarse al protón H-3.

Por otra parte, las correlaciones existentes entre la señal del protón H-7 y la correspondiente al carbonilo lactónico en el experimento HMBC y entre la señal del metileno lactónico y los protones H-2' y H-6' en el espectro ROESY (Fig. 28), fijarían el anillo lactónico con el carbonilo del mismo lado que el protón H-7. Todo lo expuesto está de acuerdo con la estructura (**a**). Este lignano, cuyo nombre sistemático es 4-(1,3-benzodioxol-5-il)-6-metoxinafto [2,3-C] furan-1,5,8 (3H)-triona, es el primer compuesto conocido que participa tanto de la estructura típica de un lignano arilnaftalénico como de una naftoquinona.

No obstante, los datos aportados por el estudio espectroscópico de ^1H -NMR y ^{13}C -NMR, podrían estar de acuerdo con cualquiera de las estructuras ortoquinónicas **c**, **g**, **i**, **m** y **o** dadas en la Figura 22.

El espectro ROESY muestra una relación del único protón aromático del anillo A (H-3) con un metoxilo, que solamente podría darse en las estructuras **a**, **c**, **g** e **i**, ya que la relación 1,4 en la que se presentan estos grupos en las estructuras **m** y **o**, hace imposible esta correspondencia. En cuanto a las estructuras **g** e **i**, la relación observada en el experimento HMBC entre H-7 con un carbono carbonílico distinto del lactónico, es más incoherente ya que exigiría una relación a cuatro centros con el carbonilo C-5. Otro dato adicional para descartar la estructura **i** es que no se observa el esperado efecto NOE, en el experimento ROESY, entre el metoxilo y el protón H-7.

La estructura **c** tampoco parece la más probable, ya que no se observan los efectos NOE esperados entre el protón aromático del anillo A, que estaría en este caso sobre C-5, y los protones H-2' y H-6'.

Por lo tanto, la estructura mostrada en la Figura 23 es la que guarda una mayor coherencia con los datos aportados por el estudio espectroscópico de este nuevo lignano, al que hemos dado el nombre de justicidona. No obstante, buscando una mayor evidencia, se llevó a cabo la síntesis total de este compuesto. Además la justicidona podría tener actividades biológicas relevantes, cuya evaluación requiere de cantidades relativamente importantes del compuesto y dado que *Justicia hyssopifolia* es una planta protegida, en general rara y no parece rendir justicidona en cantidades notables, la síntesis de este lignano tenía aún más interés.

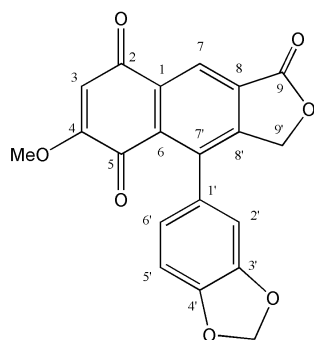


Figura 23. Estructura de la justicidona

Posición	$^1\text{H}(\delta)$	$^{13}\text{C}(\delta)$	HMBC	ROESY
1		135.1	H-3	
2		182.9	H-7, H-3	
3	6.26 (s)	109.2		Metoxilo
4		161.0	Metoxilo, H-3	
5		179.3	H-3	
6		129.1	H-9'	
7	8.72 (s)	123.9		
8		131.7	H-7	
9		169.2	H-9', H-7	
1'		129.8	H-5'	
2'	6.62 (s)	120.3	H-6'	H-9'
3'		147.9	-OCH ₂ O-, H-2', H-6', H-5'	
4'		148.3	-OCH ₂ O-, H-2', H-6', H-5'	
5'	6.90 (d)	109.0	H-6'	H-6'
6'	6.63 (dd)	107.9	H-2', H-5'	H-5', H-9'
7'		138.6	H-2', H-6'	
8'		151.4	H-7, H-9'	
9'	5.06 (d), 5.17 (d)	69.7		H-2', H-6'
-OCH ₂ O-	6.05 (d)	101.5		
-OMe	3.86 (s)	56.7		H-3

Tabla 2. Datos espectroscópicos de $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, HMBC y ROESY de justicidona

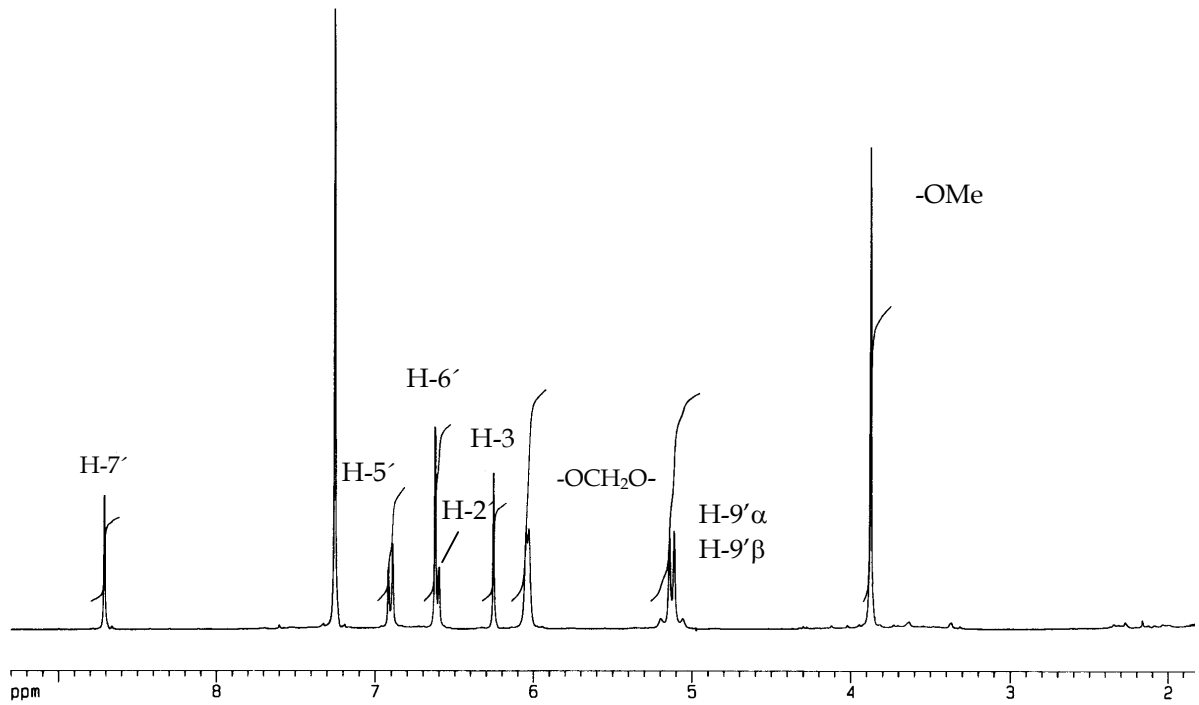


Figura 24. Espectro de $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) de la justicidona con asignaciones

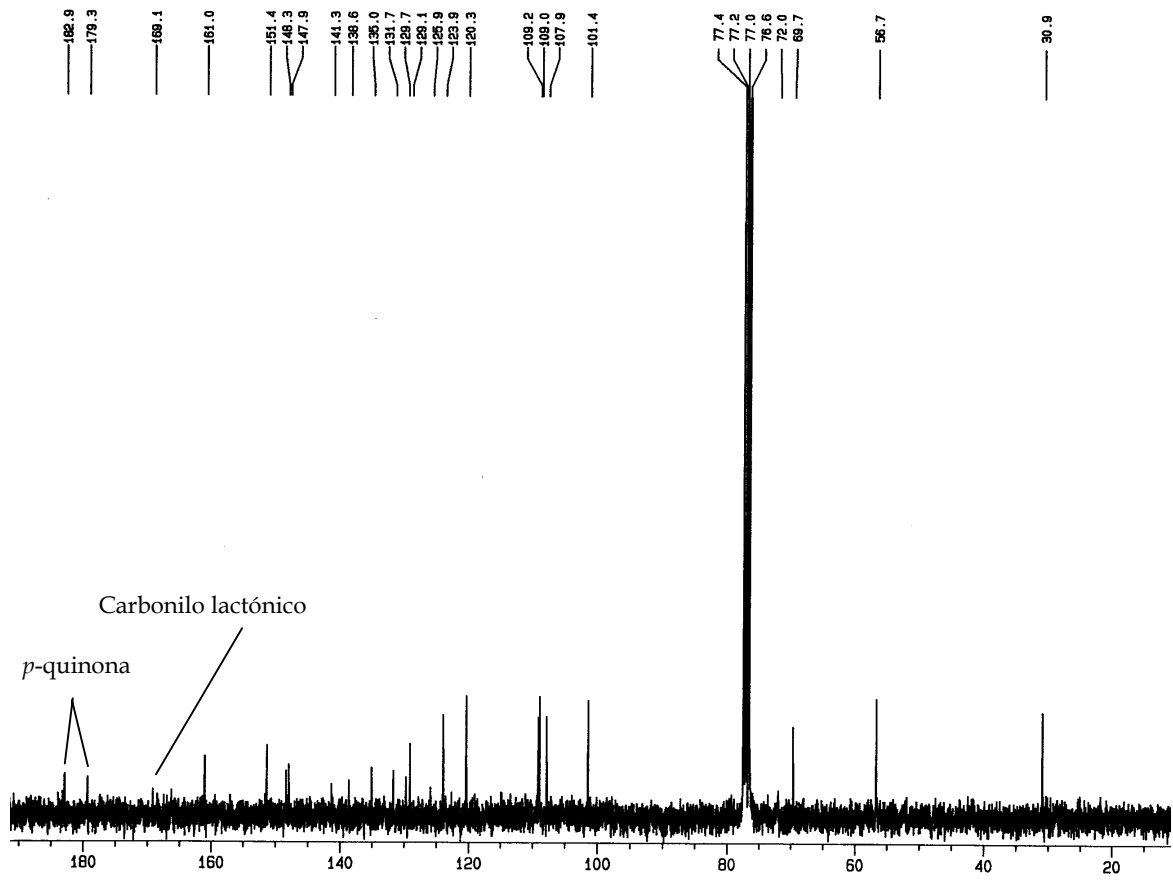


Figura 25. Espectro de $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) de justicidona

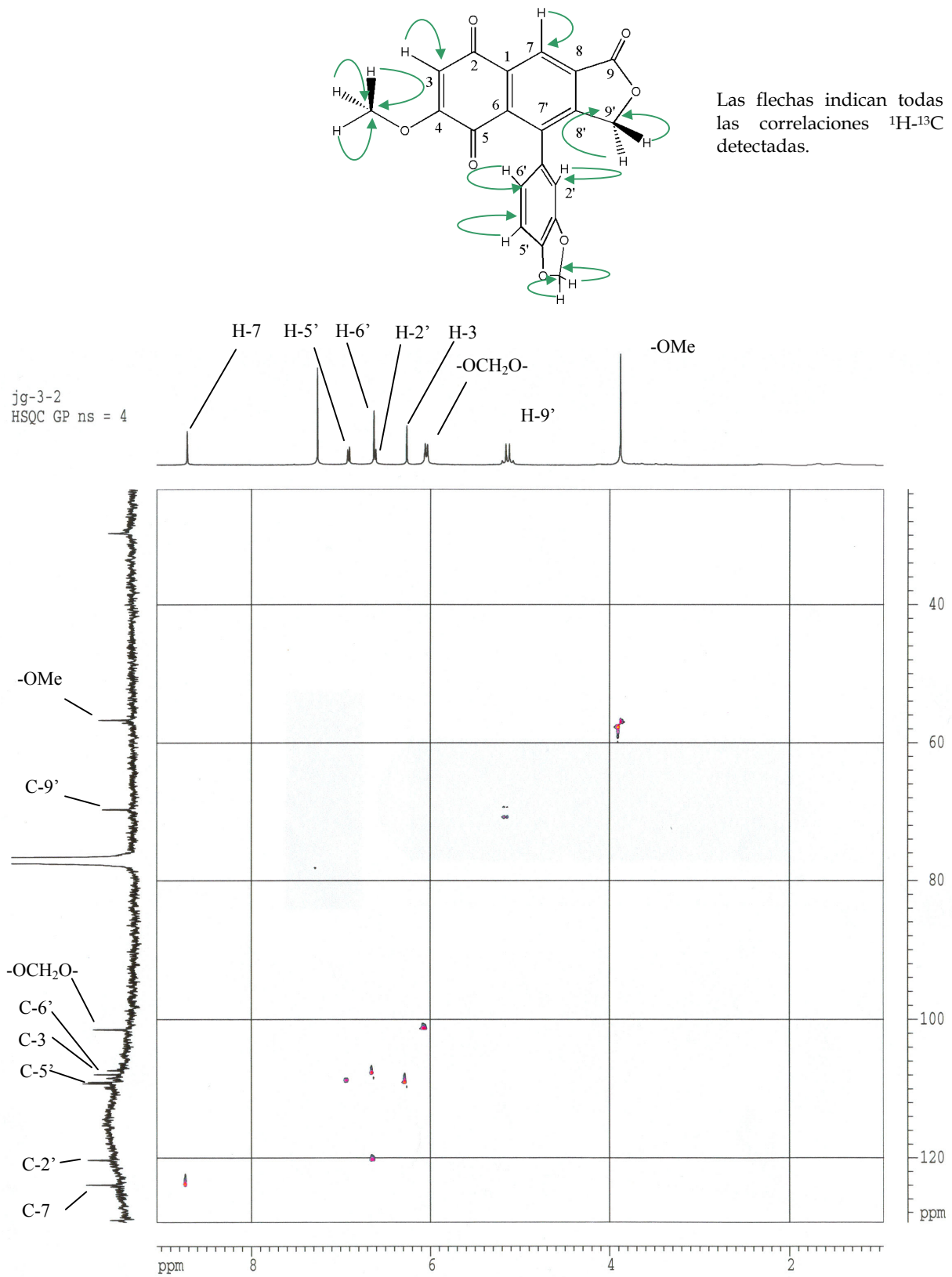
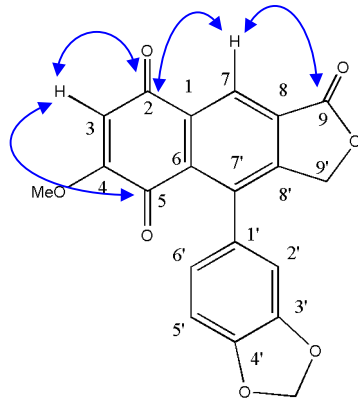


Figura 26. Experimento HSQC de la justicidona



Las flechas indican las correlaciones ^1H - ^{13}C más relevantes.

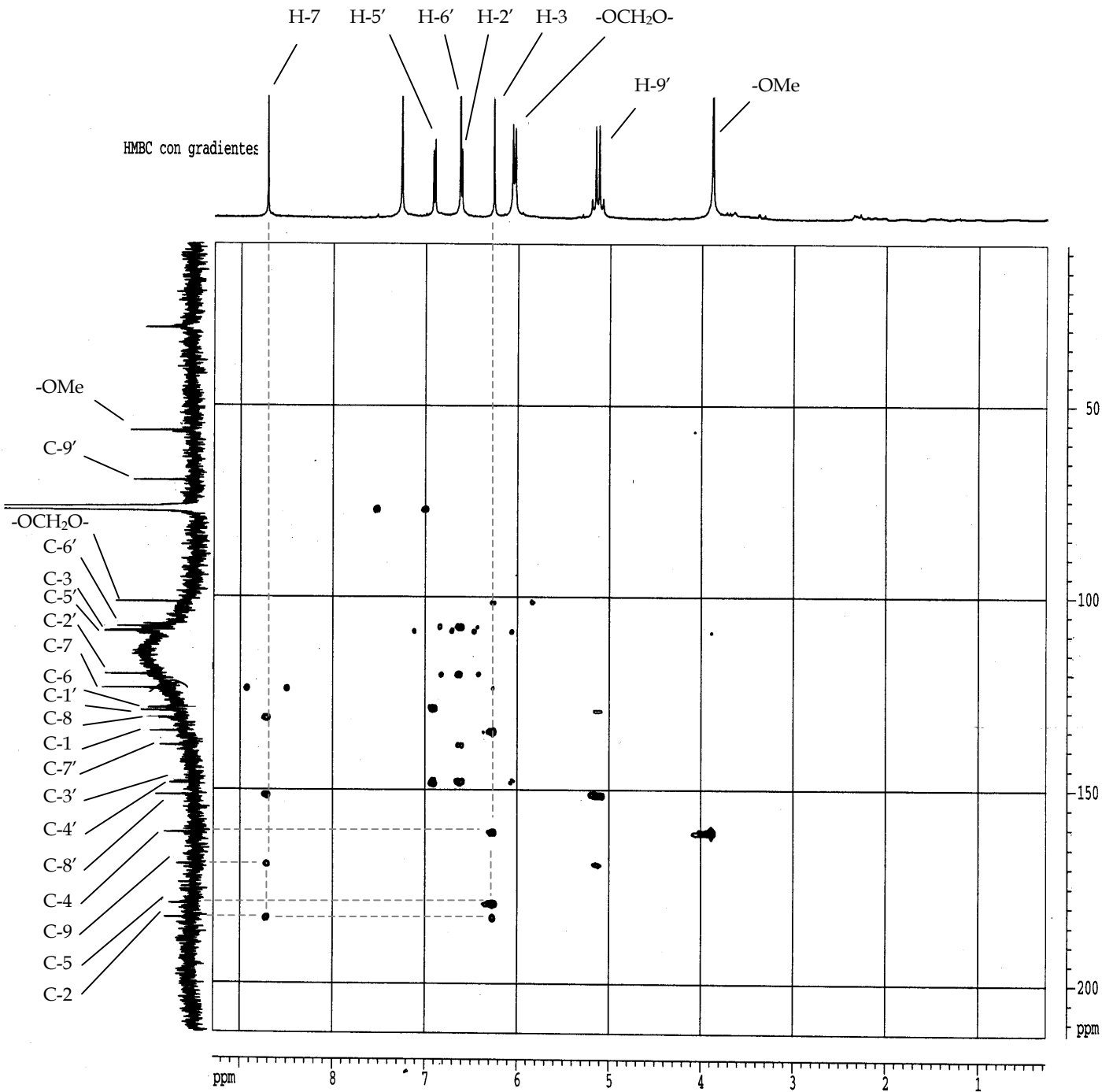
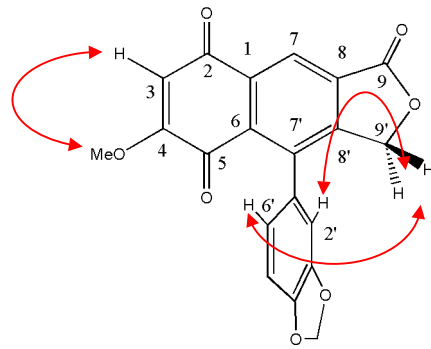


Figura 27. Experimento HMBC de la justicidona.



Las flechas indican las correlaciones ^1H - ^1H más relevantes.

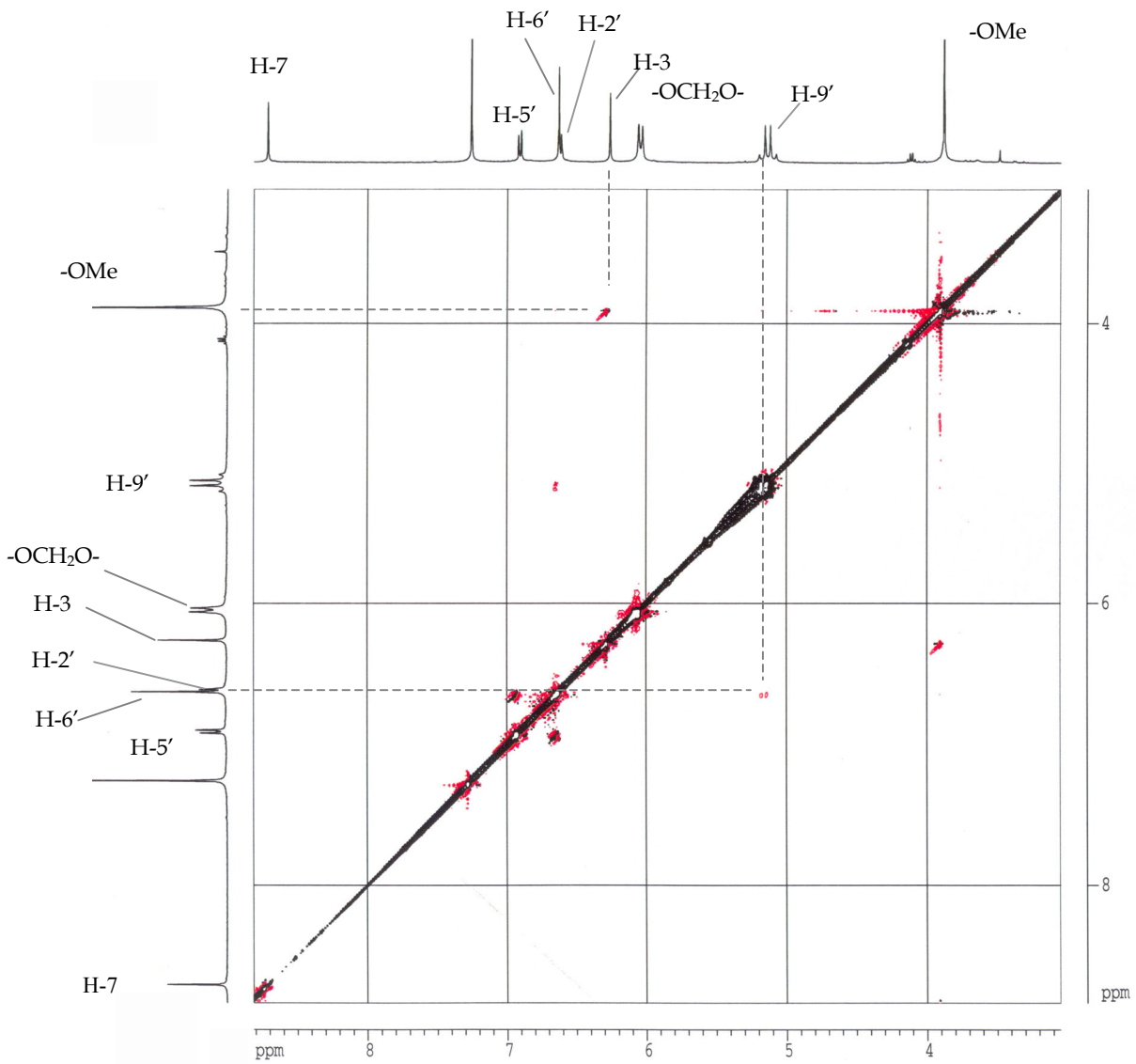


Figura 28. ROESY de la justicidona.

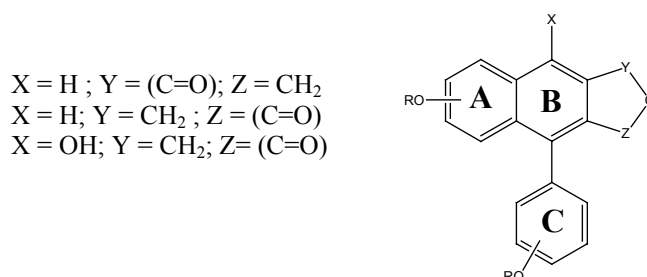
Capítulo II. Síntesis total de la justicidona



Introducción: síntesis de lignanos arilnaftalénicos

Parte teórica

Los lignanos arilnaftalénicos (Esq. 1) han despertado el interés de los investigadores en años recientes debido a estudios biológicos que han revelado sus actividades potenciales, tal como se ha indicado. La mayoría de los lignanos arilnaftalénicos naturales son lactonas con la estructura siguiente:



Esquema 1. Estructura de los lignanos arilnaftalénicos

Aunque existe una amplia variedad de métodos para sintetizar el esqueleto básico de los lignanos de esta subclase, todos ellos tienen en común su objetivo final, que es construir el anillo B del resto naftilo. Esto puede conseguirse por ciclación de un arilo convenientemente sustituido, seguido de una reacción de aromatización³¹⁴. Estos lignanos también pueden obtenerse mediante la adición conjugada del derivado de un aldehído aromático, por ejemplo un derivado 1,3-ditiano, sobre un éster α - β insaturado, seguido de la captura del enolato resultante por parte de otro aldehído aromático y posterior ciclación-aromatización del aducto resultante³¹⁵.

La síntesis de lignanos arilnaftalénicos también se han llevado a cabo mediante condensación aldólica del enolato de un éster con dos aldehídos aromáticos (anillos A y C), método conocido como reacción de Stobbe²⁸¹.

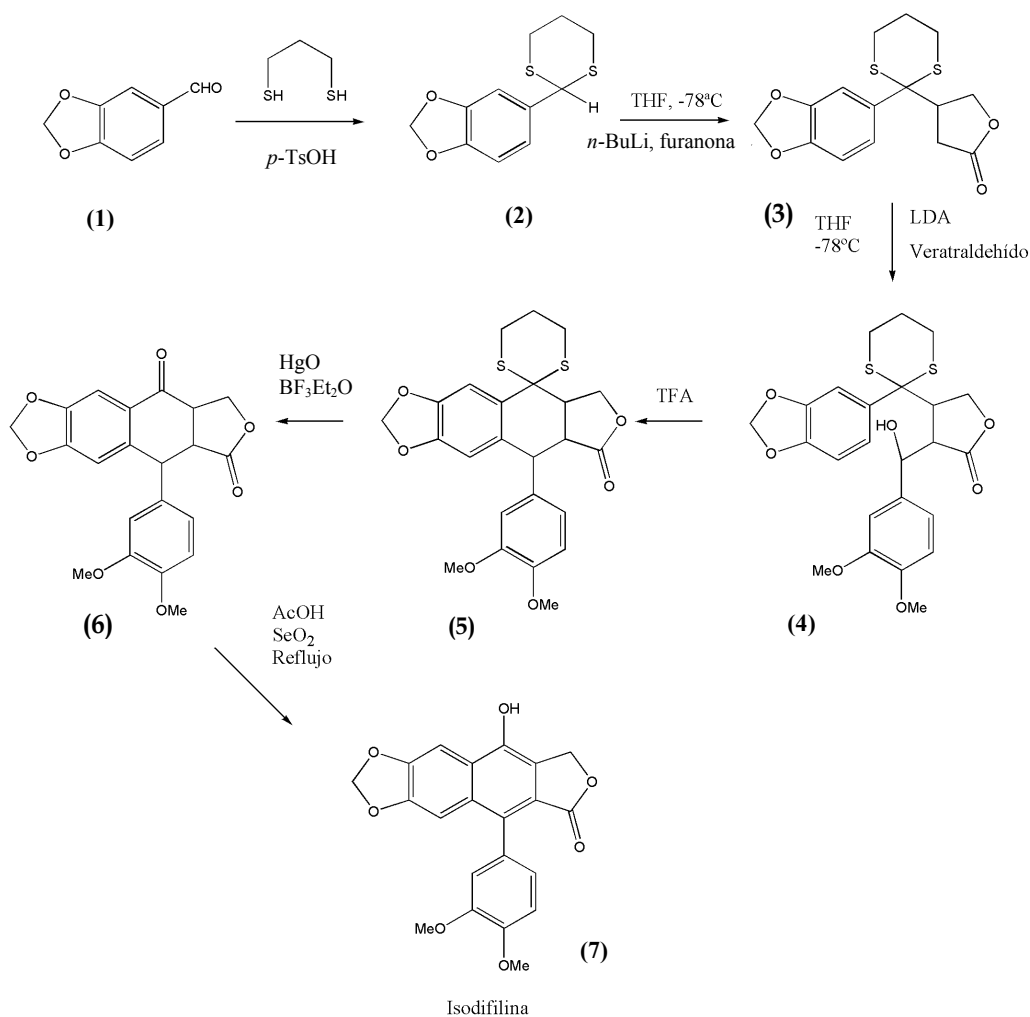
A continuación se muestran por orden cronológico varias síntesis de lignanos arilnaftalénicos, algunas de las cuales han sido empleadas o tenidas muy en cuenta en la aproximación y síntesis total de la justicidona.

³¹⁴ Cochran J.E., Padwa A. *J. Org. Chem.*, **60** (13), 3938-9, (1995)

³¹⁵ Yus M., Nájera C., Foubelo F. *Tetrahedron*, **59** (33), 6147-212, (2003)

Síntesis de isodifilina empleando 1,3-ditiano

En 1977, González et al.³¹⁶ desarrollaron la síntesis total de isodifilina (7), (Esq. 2), un lignano aislado de *Bupleurum frutiscens*, empleando 2-(3,4-metilendioxfenil)-1,3-ditiano (2), obtenido a partir del piperonal.



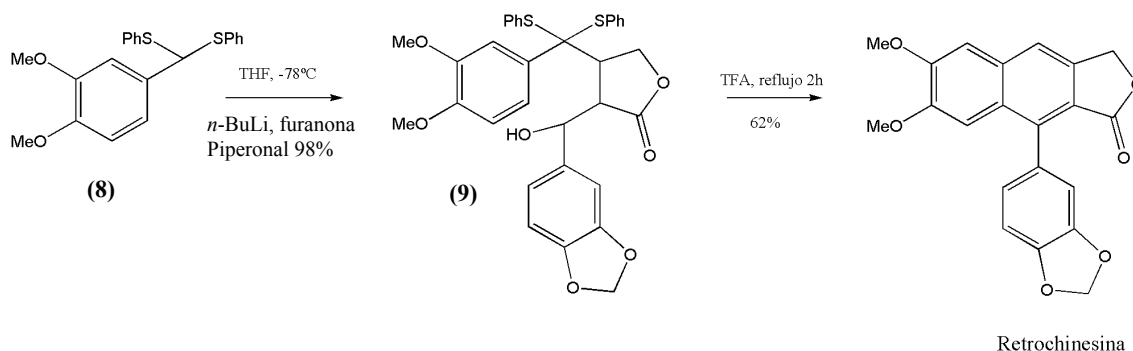
Esquema 2. Síntesis de la isodifilina. González et al. 1973

La adición de Michael del ditiano **2** sobre la furanona conduce al aducto **3**. La condensación aldólica de **3** con veratraldehído conduce al compuesto **4**, que es ciclado a **5** empleando ácido trifluoroacético (TFA). La desprotección de **5** con HgO/BF₃Et₂O conduce a **6**, que es finalmente aromatizado dando lugar al compuesto **7**.

³¹⁶ González A.G., Pérez J.P., Trujillo J.M. *Tetrahedron*, **34** (7), 1011-3, (1978)

Síntesis de retrochinesina empleando difenil ditioacetales

En 1988, Pelter et al.³¹⁷ emplearon la adición conjugada del carbanión del difenil ditioacetal (**8**) de un aldehído aromático sobre la furanona, seguido de la captura del enolato resultante por otro aldehído aromático, formando un derivado de la dibencilbutirolactona (**9**). Ésta puede transformarse en varios tipos de lignanos, entre ellos, los arilnaftalénicos.



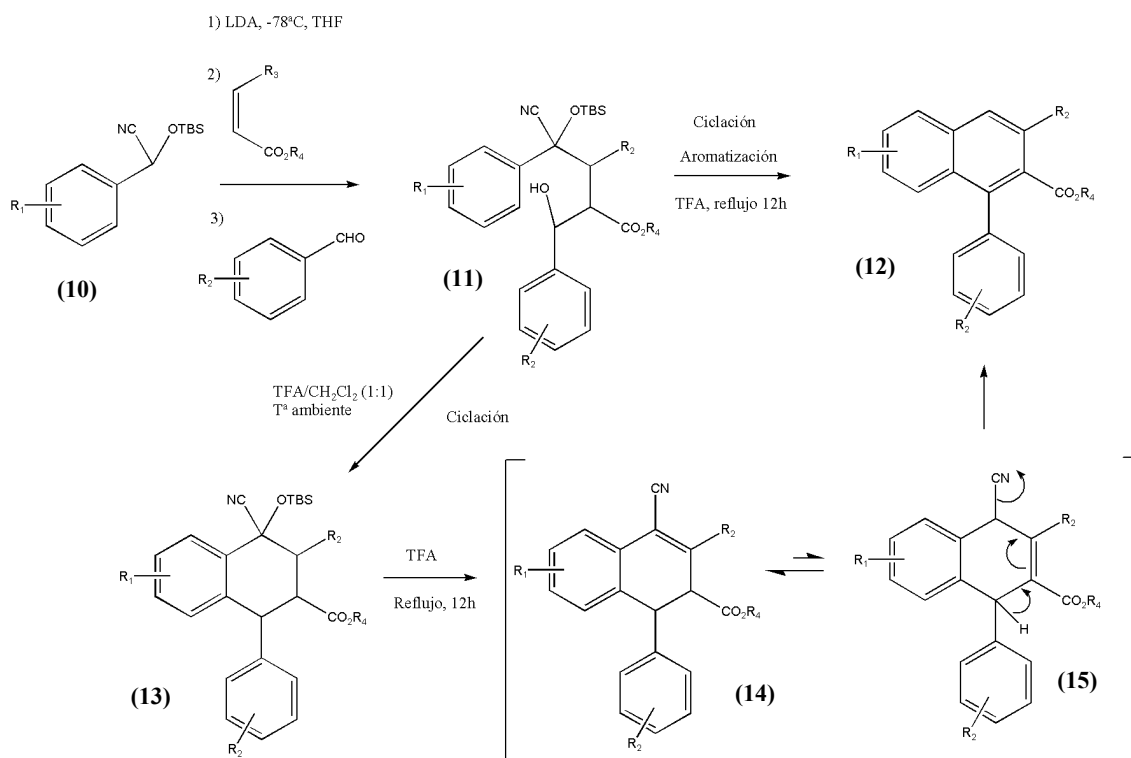
Esquema 3. Síntesis de retrochinesina. Pelter et al. 1988

Síntesis de lignanos arilnaftalénicos a partir de cianhidrinas

En 1990, Ogiku et al.³¹⁸ desarrollaron un nuevo método para sintetizar lignanos arilnaftalénicos a partir de *O*-*t*-butildimetilsililcianhidrinas en sólo dos pasos (Esq. 4). Esta nueva aproximación emplea una adición conjugada de Michael sobre un éster α - β -insaturado, en tándem con una adición aldólica del enolato resultante sobre un aldehído aromático debidamente sustituido, formándose así **11**. La ciclación y aromatización que conducen a la formación del anillo naftalénico se llevan a cabo con ácido trifluoroacético (**12**).

³¹⁷ Pelter A., Ward R.S., Pritchard M.C., Kay I.T. *J. Chem Soc. Perkin Trans. I*, 1603-13, (1988)

³¹⁸ Ogiku T., Seki M., Takahashi M., Ohmizu H., Iwasaki T. *Tetrahedron Letters*, **31** (38), 5487-90, (1990)



Esquema 4. Síntesis de lignanos arilnaftalénicos a partir de cianhidras. 1990

El aislamiento del intermedio de reacción **14**, permitió a los autores proponer un mecanismo para la aromatización de **11**. En la Tabla 1 se muestran varios lignanos sintetizados por este procedimiento.

En 1995, Ogiku et al.³¹⁹ extendieron este método a la síntesis de lignanos 4-hidroxi-1-arilnaftalénicos al sintetizar la difilina (Esq. 5). La adición conjugada sobre el metilacrilato, del anión generado a partir de **16** y posterior captura del enolato por el piperonal, conduce a la mezcla de diastereómeros del compuesto **17**. La ciclación de **17** en condiciones suaves rinde el compuesto **18**, cuya desprotección para dar **19** y posterior formilación, seguida de isomerización (aromatización), da el compuesto **21**. Éste, sin ser aislado, es tratado con ácido clorhídrico para dar difilina con un 57% de rendimiento desde **19**.

³¹⁹ Ogiku T., Yoshida S.-i., Ohmizu H., Iwasaki T. *J. Org. Chem.*, **60** (14), 4585-90, (1995)

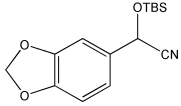
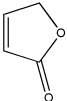
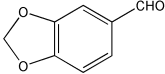
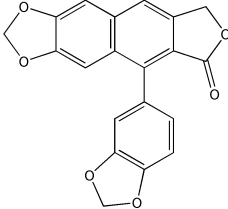
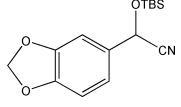
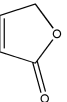
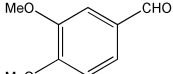
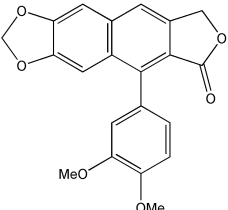
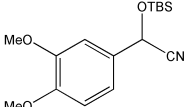
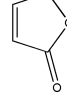
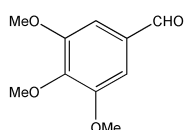
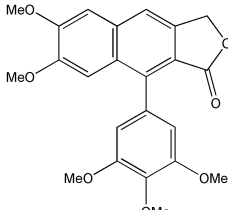
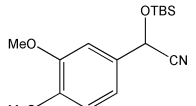
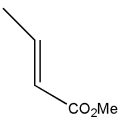
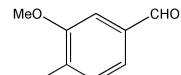
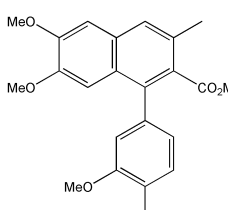
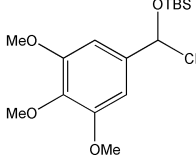
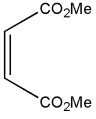
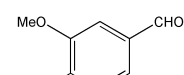
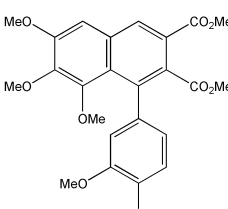
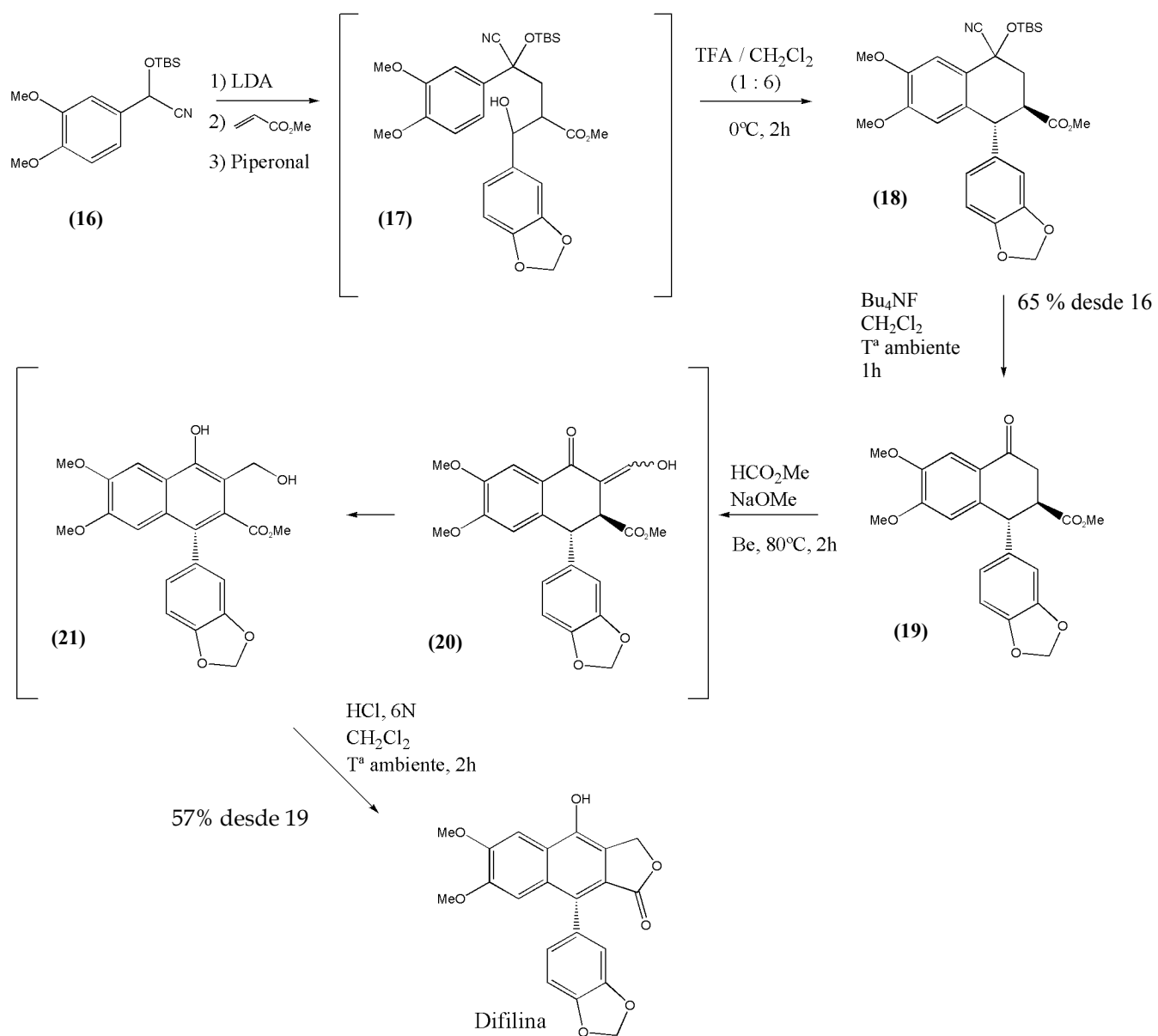
Cianhidrina	Éster α - β insaturado	Aldehído aromático	Producto	R (%)
				62
				71
				62
				61
				78

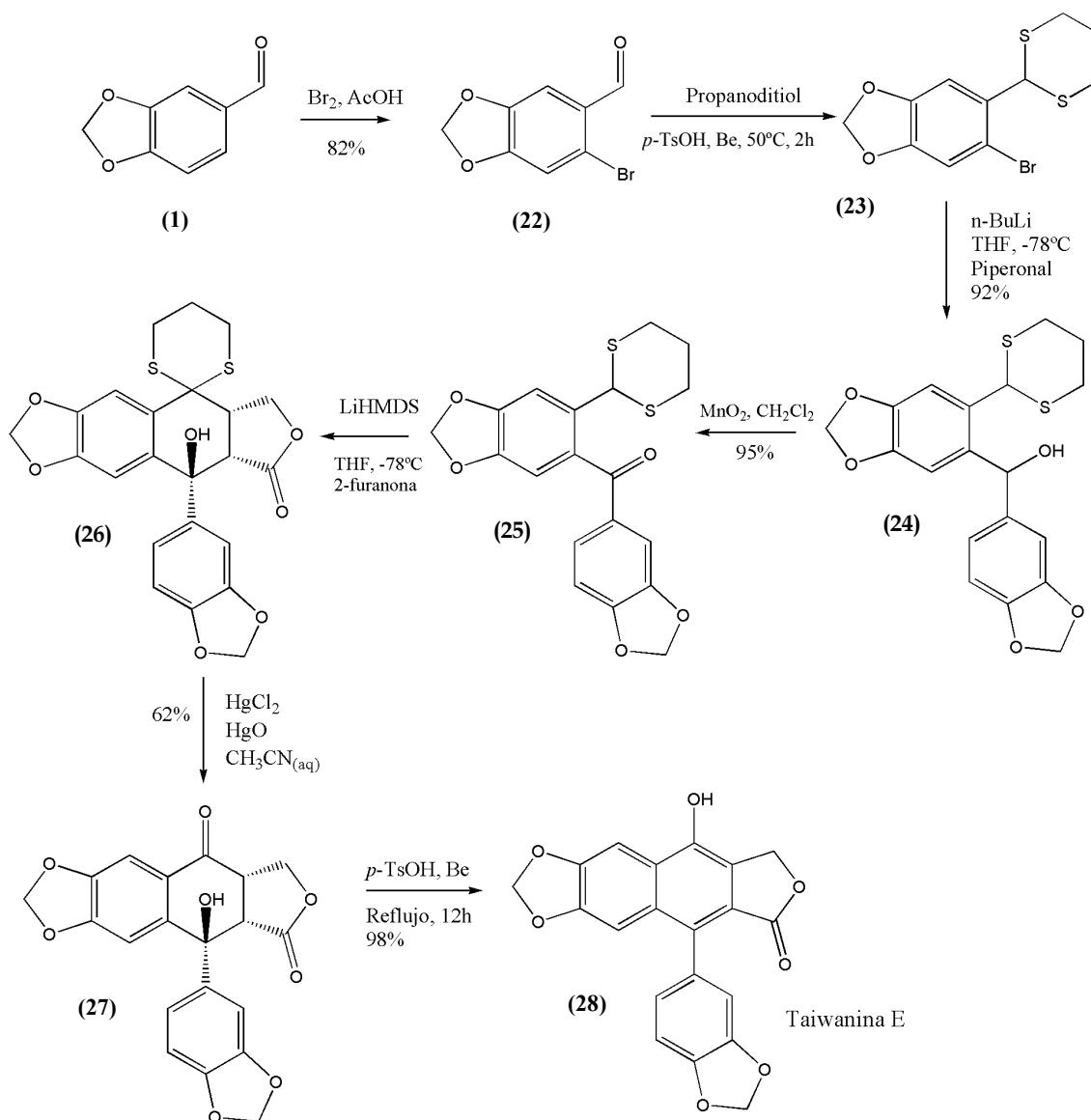
Tabla 1. Lignanos arilnaftalénicos sintetizados a partir de cianhidrinas por Ogikú et al. 1990



Esquema 5. Síntesis de difilina a partir de cianhidrinas. Ogiku et al. 1995

Síntesis a partir de cetoditiolanos

En el Esquema 6 se muestra la síntesis de taiwanina E, desarrollada por Harrowven³²⁰ en 1991, a partir del ditiano **23**.

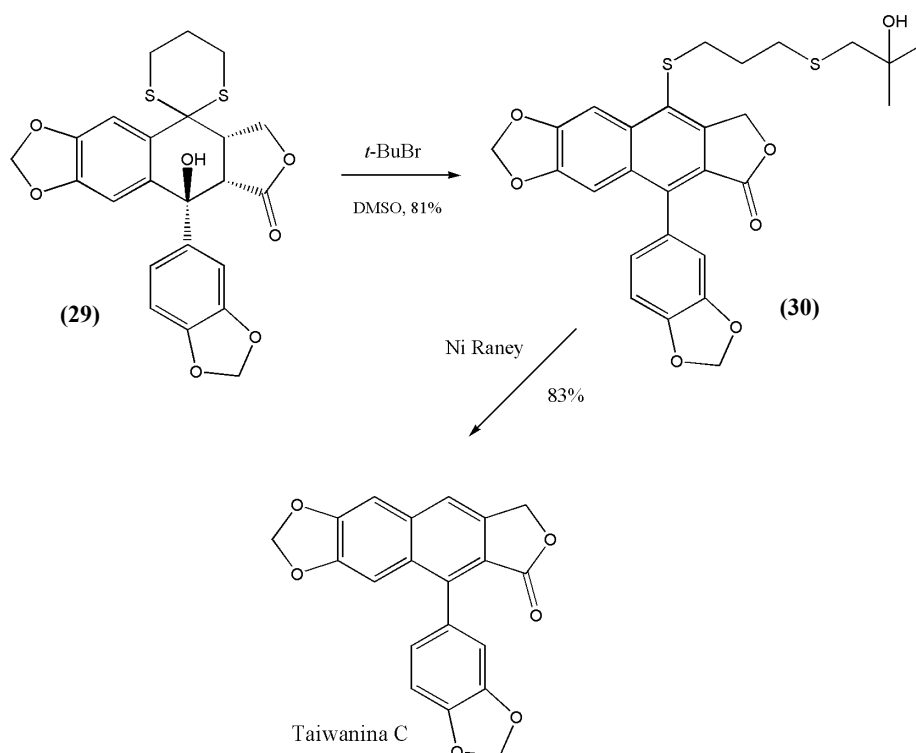


Esquema 6. Síntesis de taiwanina E. Harrowven 1991

³²⁰ Harrowven D.C. *Tetrahedron Letters*, **32** (30), 3735-8, (1991)

El piperonal (**1**) es tratado secuencialmente con bromo y 1,3-propanoditiol bajo catálisis ácida para dar el ditiano **23**. La transmetalación de **23** al correspondiente aril-litio (*n*-BuLi) y posterior tratamiento con piperonal conduce a **24**. La oxidación del hidroxilo bencílico de **24** con MnO₂ da lugar al cetoditiolano **25**, que al ser tratado con hexametil disililazano (LiHMDS) dio lugar a un anión púrpura que es capturado por la 2-furanona dando lugar a **26**. La desprotección de este compuesto da la hidroxicetona **27**, que es deshidratada y aromatizada a taiwanina E (**28**) por acción del ácido *p*-toluensulfónico o de la sal de Meerwein.

En 1992 Harrowven y Dennison³²¹ extendieron este método para lignanos arilnaftalénicos no sustituidos como la taiwanina C (Esq. 7).



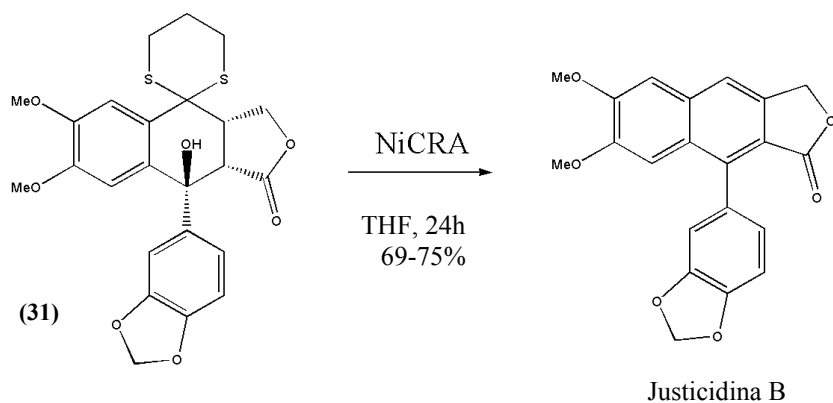
Esquema 7. Síntesis de taiwanina C. Harrowven y Dennison 1993

³²¹ Harrowven D.C., Dennison S.T. *Tetrahedron Letters*, **34** (20), 3323-6, (1993)

El tratamiento del aducto **29** con bromuro de *t*-butilo en dimetilsulfóxido conduce al compuesto **30**, un sólido blanco y cristalino que es reducido con níquel-Raney obteniéndose taiwanina C.

Empleando esta metodología Kamal y Daneshtalab³²² sintetizaron en 1994 justicidina B (Esq. 8).

En el último paso de esta síntesis tiene lugar una desulfurización del intermedio **31** con NiCRA (nickel-containing complex reducing agent), seguido de la aromatización para formar justicidina B.

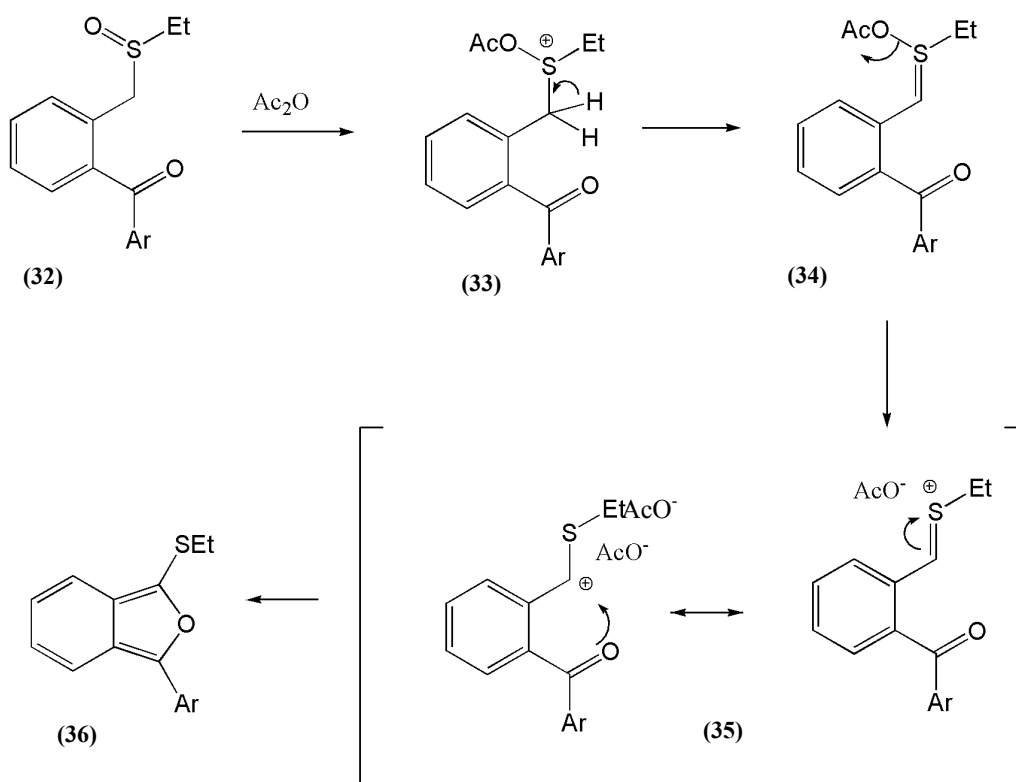


Esquema 8. Último paso en la síntesis de justicidina B.
Kamal y Daneshtalab 1994

³²² Kamal A., Daneshtalab M., Micetich R.G. *Tetrahedron Letters*, **35** (23), 3879-82, (1994)

Reacción de Pummerer y adición de Diels-Alder en tándem

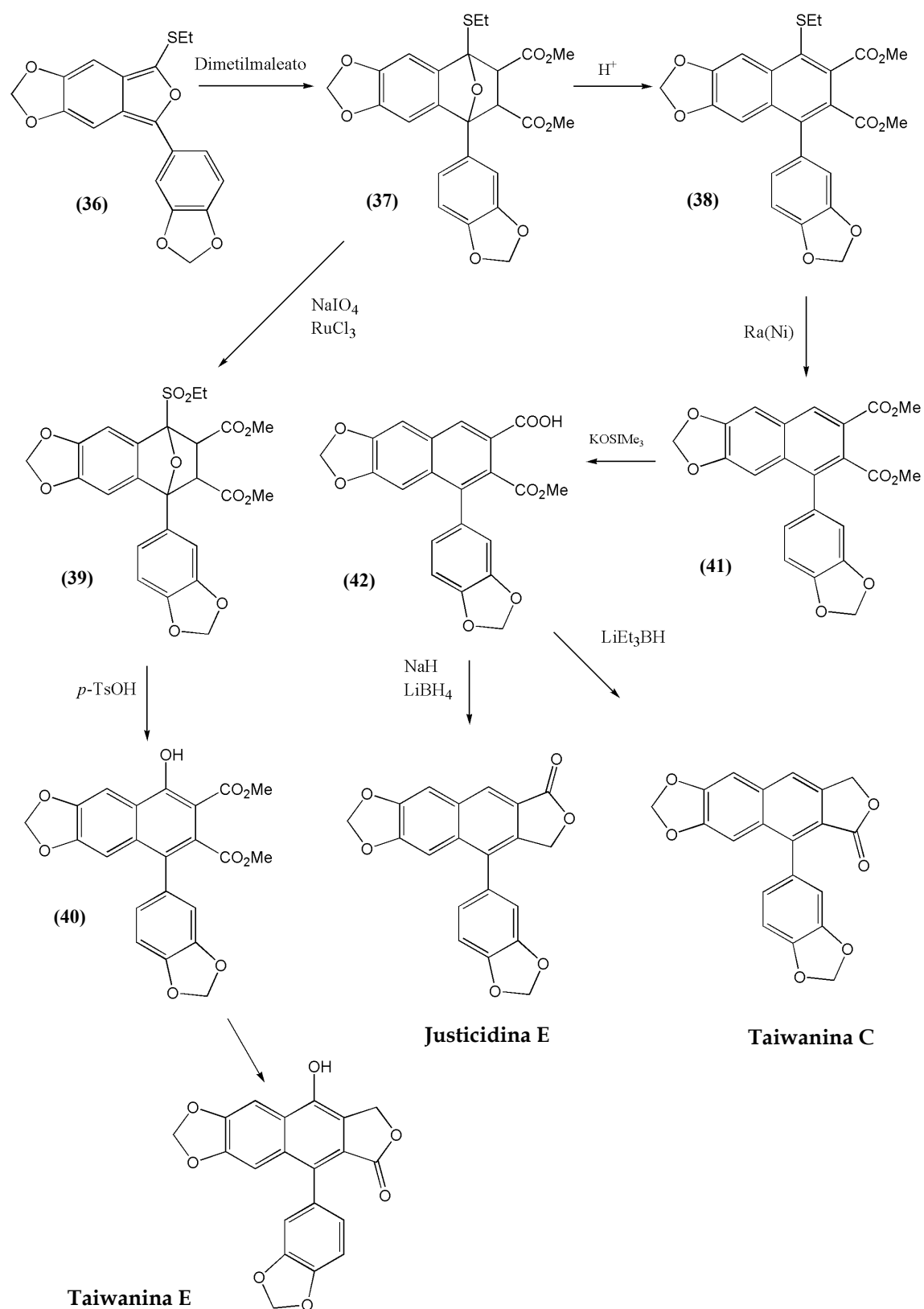
En 1995, Cochran et al.³¹⁴ emplearon el reordenamiento Pummerer en tándem con la reacción de Diels-Alder para sintetizar lignanos arilnaftalénicos.



Esquema 9. Formación del α -tioisobenzofurano a partir del sulfóxido **32**

Esta estrategia se basa en la formación, a partir del sulfóxido **32** (Esq. 9) y por medio del reagrupamiento de Pummerer, de un α -tioscarbocación (**35**) que es capturado por el carbonilo adyacente para producir un α -tioisobenzofurano (**36**). Éste, por medio de una cicloadición de Diels-Alder con dimetilmaleato, da lugar al aducto **37** que puede convertirse en varios tipos de lignanos arilnaftalénicos, como justicidina E, taiwanina C y taiwanina E³²³.

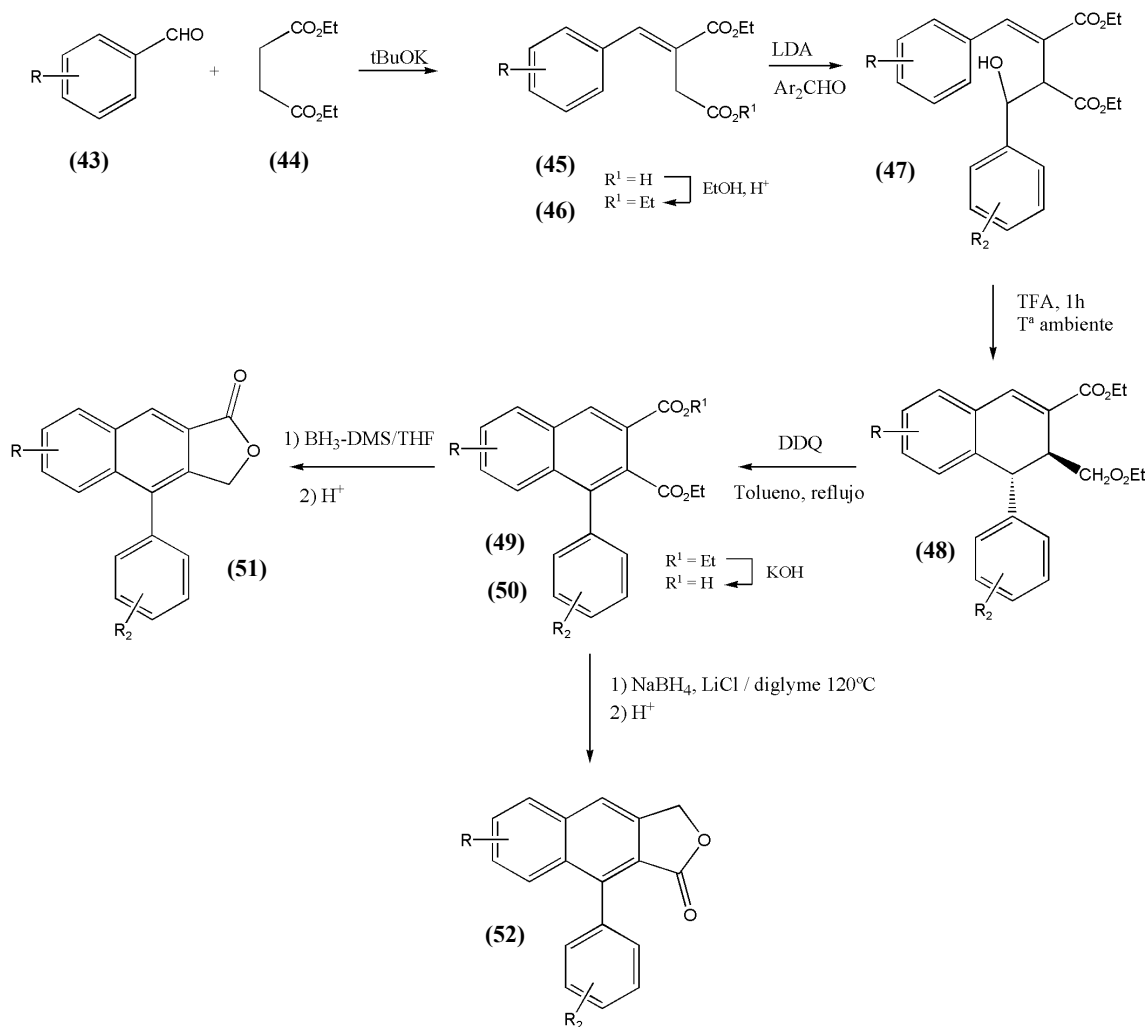
³²³ Arnold B.J., Mellows S., Sammes P.G. *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1*, 1266, (1973)



Esquema 10. Síntesis de las taiwaninas C y E y de la justicidina E. Cochran et al. 1995

La condensación de Stobbe

En 2000, Cow et al.²⁷⁸ emplearon la condensación de Stobbe, seguida de la aromatización con DDQ, para sintetizar varios lignanos arilnaftalénicos (Esq. 11).



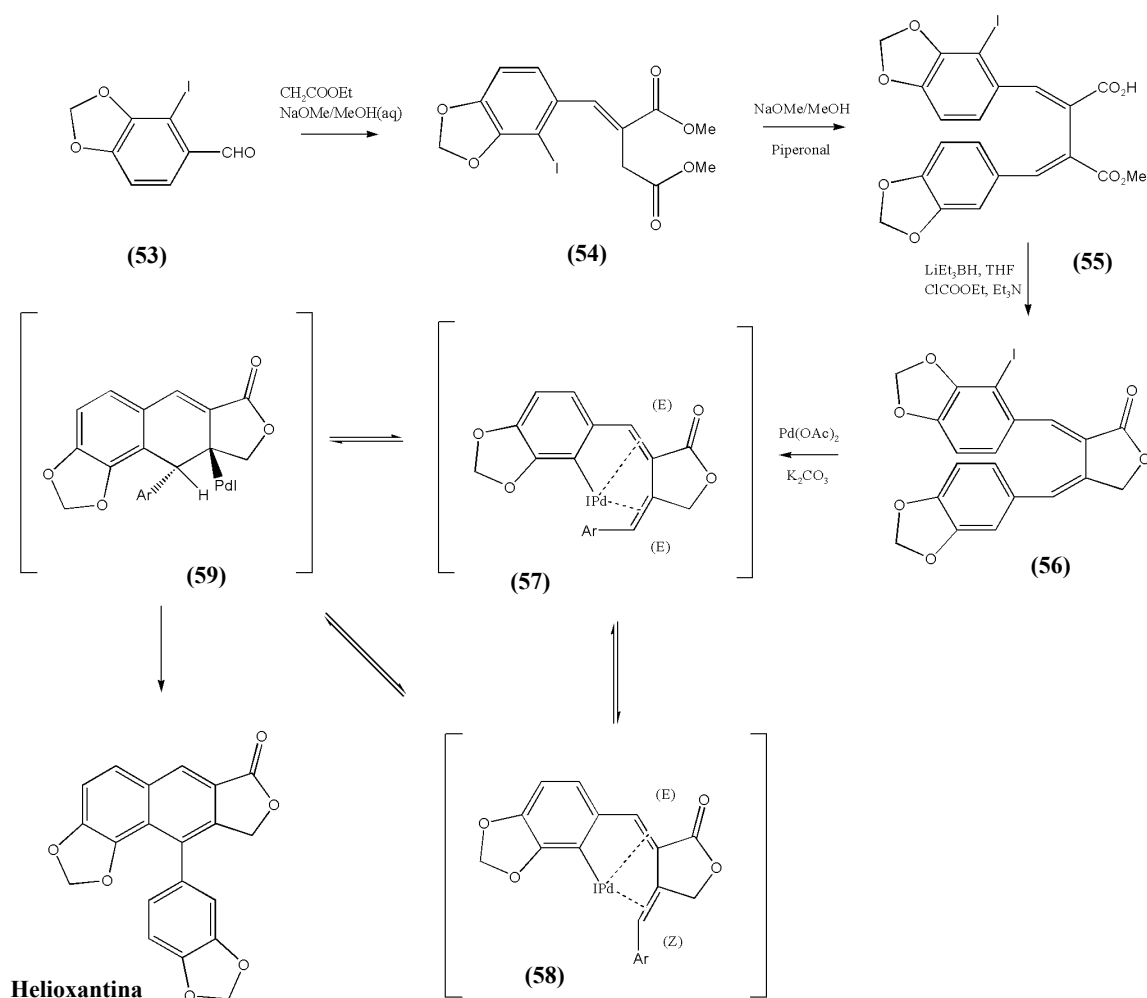
Esquema 11. Síntesis de lignanos arilnaftalénicos empleando la reacción de Stobbe. Cow et al. 2000

La condensación de Stobbe del succinato de dietilo (44) con un aldehído aromático (43) (piperonal, veratraldehído o 3,4,5-trimetoxibenzaldehído) da lugar al correspondiente monoéster 45, que es esterificado para dar el diéster 46. El tratamiento de éste con LDA y posterior adición de otro aldehído aromático conduce al alcohol 47 que, sin ser purificado, fue ciclado con TFA (48).

La aromatización de **48**, que se lleva a cabo con dicianodiclono-*p*-benzoquinona (DDQ), da el diéster **49** cuya hidrólisis selectiva, con hidróxido potásico en metanol/agua, da el monoácido **50**.

La formación de lactonas del tipo I (**51**), tales como taiwanina C, chinesina, justicidina B y deshidroanhidropodofilotoxina, fue llevada a cabo con $\text{BH}_3\text{-DMS}$, seguido de lactonización en medio ácido. Por otra parte, la reducción de los ésteres con borohidruro sódico, seguida de lactonización en medio ácido, conduce a la formación de retrolactonas (tipo II) (**52**), como justicidina E, retrochinesina, 5'-metoxi-retrochinesina y retrojusticidina B.

Ciclación intramolecular de α,β -bisbencilidén- γ -lactona catalizada por paladio



Esquema 12. Síntesis regioselectiva de helioxantina. Mizufune et al. 2001

En 2001, Mizufune et al.³²⁴ desarrollaron la primera síntesis regioselectiva de helioxantina (Esq. 12). Otras síntesis de este lignano^{307,325,326} tenían el inconveniente de la formación de otros regioisómeros tales como la justicidina E, taiwanina C y retrohelioxantina.

El intermedio clave para la síntesis, α,β -bisbencilidén- γ -lactona (**56**), se obtiene a partir de iodopiperonal (**53**) mediante una condensación de Stobbe que da lugar al monoéster **55**. La reducción y lactonización de **55** conduce a **56** cuya configuración (*E,E*) se determinó mediante un experimento NOESY. La siguiente etapa de esta síntesis consiste en la obtención de **59** por adición de Pd²⁺ que se une al enlace C-I del compuesto **56**. La interacción del paladio con el sistema 1,3-dieno (dieno conjugado) obliga al anillo A a adquirir la conformación adecuada (**57**) para obtener regioselectivamente helioxantina, a la vez que genera una deficiencia electrónica sobre el carbono en posición bencílica respecto al anillo C, que favorece la sustitución electrofílica aromática sobre el carbono que posee el complejo σ -arilpaladio.

Reacción de Horner-Emmons y condensación de Claisen

En 2001, Harrowven et al.³²⁷ desarrollaron una nueva reacción de anelación para sintetizar justicidina B y retrojusticidina B, empleando la reacción de Horner-Emmons en tándem con la condensación de Claisen (Esq. 13). En 2002, los autores generalizaron este método al sintetizar taiwanina C, justicidina E, chinesina y retrochinesina³²⁸.

La adición conjunta del cetoaldehído **64** y el fosfonato **65** a una solución de etóxido sódico en THF/EtOH enfriada a 0°C, conduce a la formación de los compuestos **66** y **67** en la proporción 14/1. La hidrólisis del diéster **66** conduce a **67**, que es reducido con el complejo borano dimetilsulfuro y tratado con HCl en etanol, rindiendo justicidina B. El tratamiento de **67** con hidruro sódico y borohidruro de litio conduce a la formación de retrojusticidina B como producto mayoritario y justicidina B.

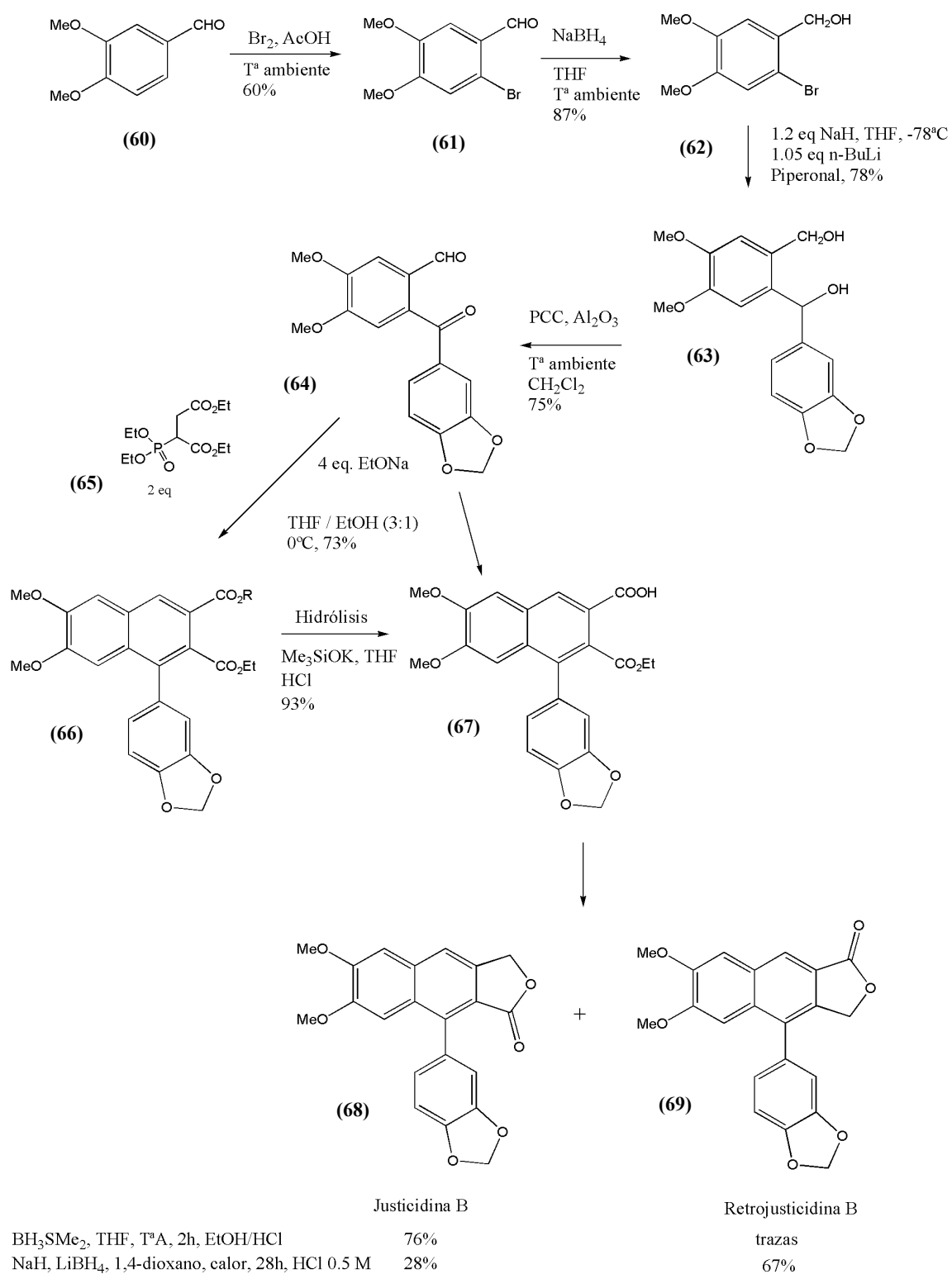
³²⁴ Mizufune H., Nakamura M., Mitsudera H. *Tetrahedron Letters*, **42**, 437-9, (2001)

³²⁵ Charlton J.L., Oleschuk C.J., Chee G. *J. Org. Chem.*, **61**, 3452, (1996)

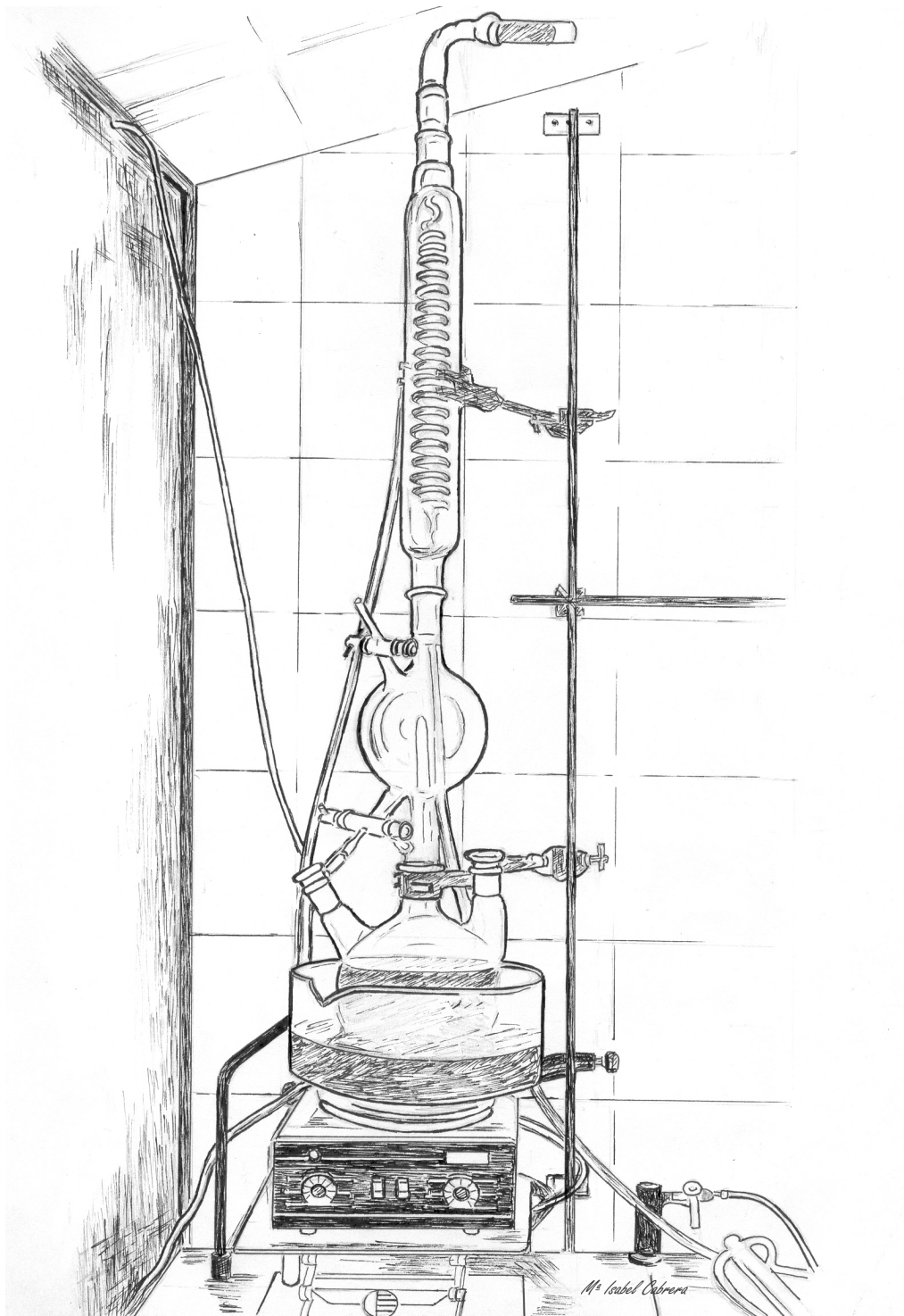
³²⁶ Stevenson R., Weber J.V. *J. Nat. Prod.*, **52**, 367, (1989)

³²⁷ Harrowven D.C., Bradley M., Castro J.L., Flanagan S.R. *Tetrahedron Letters*, **42**, 6973-5, (2001)

³²⁸ Flanagan S.R., Harrowven D.C., Bradley M. *Tetrahedron*, **58**, 5989-6001, (2002)



Esquema 13. Reacción de Horner-Emmons y condensación de Claisen. Harrowven et al. 2001



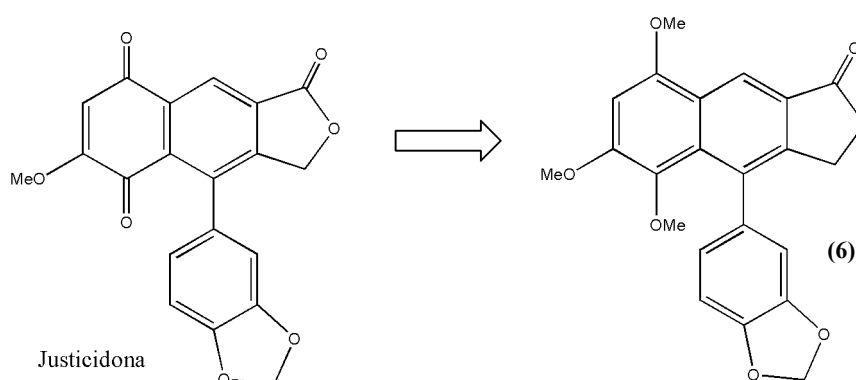
Aproximaciones y síntesis total de la justicidona

Parte teórica

Se decidió abordar la síntesis de la justicidona con el objeto de confirmar su estructura y tener cantidad suficiente para evaluar sus posibles actividades biológicas.

Este compuesto carece de centros quirales y dado que existen diversos métodos eficaces para sintetizar lignanos arilnaftalénicos, en principio se consideró que su síntesis total no debería conllevar demasiadas dificultades. No obstante, empleando métodos convencionales para la síntesis de lignanos de este tipo, se presentaron ciertos problemas inesperados, algunos de los cuales pueden tener más interés teórico y académico que la síntesis en sí misma. A continuación se describen las diferentes aproximaciones que finalmente condujeron a la primera síntesis total de este compuesto.

Desde un principio, la estrategia sintética consistió en la fabricación del compuesto **6** (Esq. 1) como precursor inmediato de la justicidona, ya que esperábamos que su oxidación con nitrato cérico amónico (CAN) nos condujera directamente a nuestro objetivo sintético³²⁹.

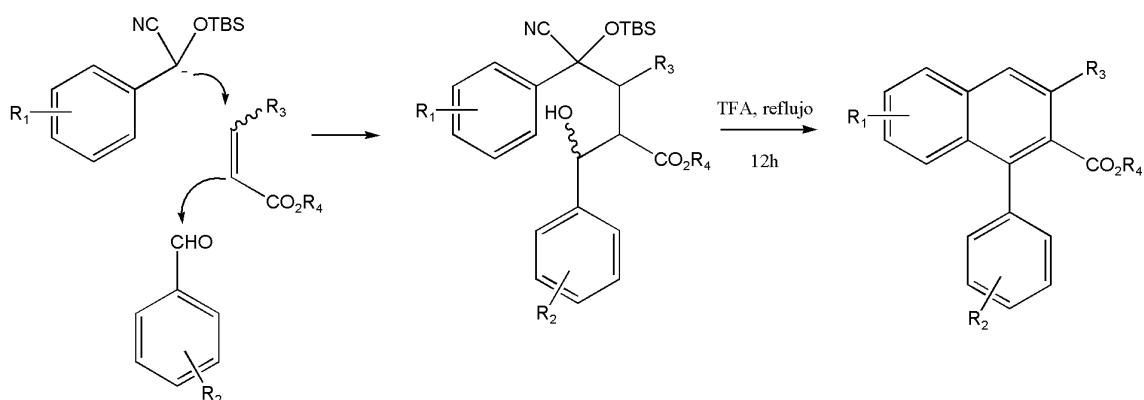


Esquema 1. Análisis retrosintético

Como se ha explicado en la introducción, existen varias formas de sintetizar el esqueleto de un lignano arilnaftalénico y, entre ellas, se eligió la síntesis a partir de cianhidrinas por su facilidad y buen rendimiento³¹⁸.

³²⁹ Hart D.J., Huang H.-C. *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 1634-5, (1988)

El procedimiento no sólo permitía la adición conjugada sobre un éster α,β -insaturado en tándem con la adición aldólica a un aldehído aromático, sino que además permitía ciclar, eliminar los grupos protectores y aromatizar el producto en un solo paso, tal como se muestra en el Esquema 2.



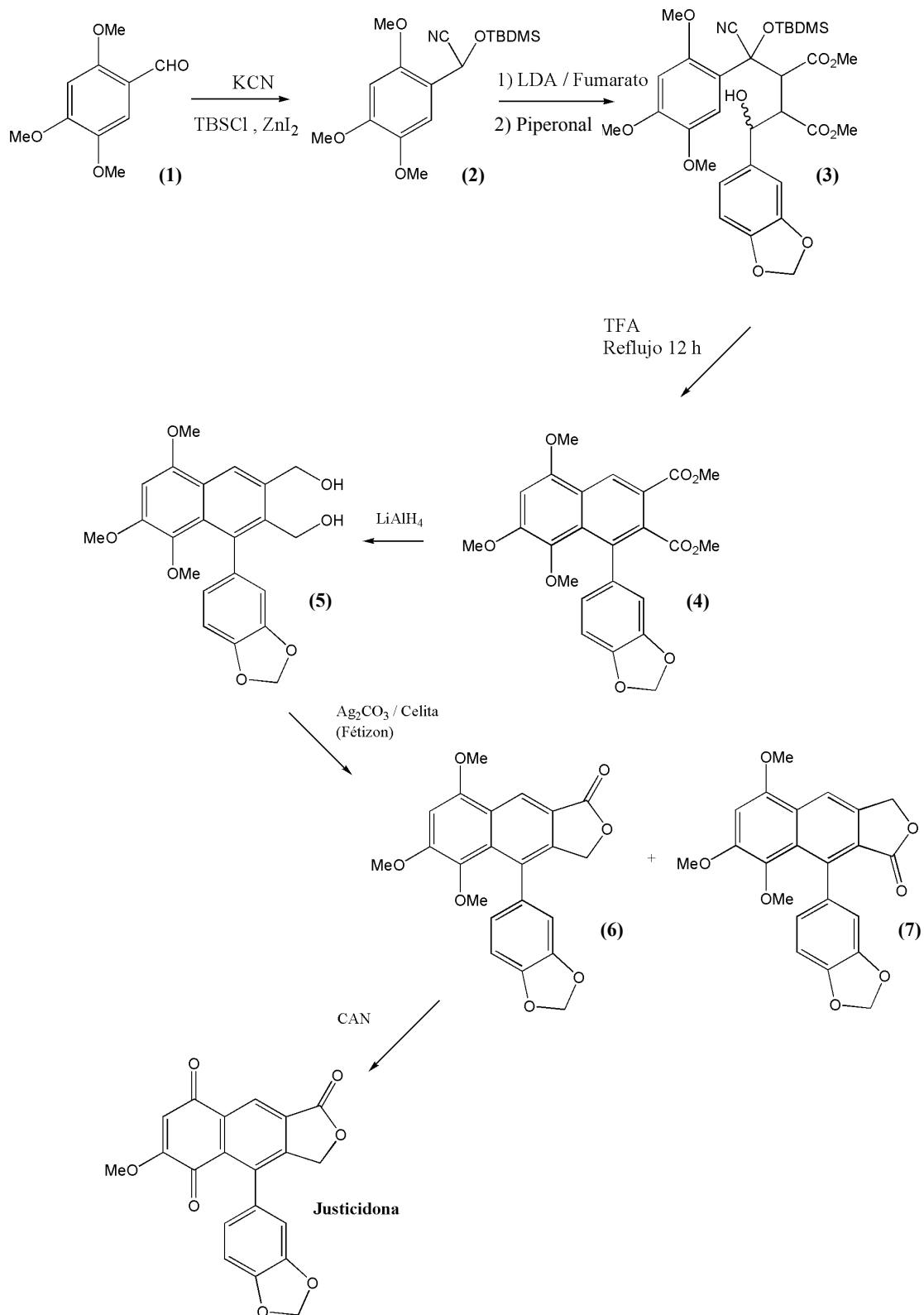
Esquema 2. Estrategia para la síntesis de un lignano arilnaftalénico a partir de cianhidrinas

De este modo, se planteó una primera estrategia para la síntesis de la justicidona (Esq. 3). Esta primera aproximación comienza con la preparación de la *O*-*t*-butildimetilsililcianhidrina (**2**) a partir del 2,4,5 trimetoxibenzaldehído (**1**)³³⁰. La adición de Michael sobre el fumarato de dimetilo del carbanión generado por la reacción de **2** con diisopropilamido de litio (LDA) a -78°C , seguida de la posterior captura del carbanión resultante por el piperonal, debe conducir al aducto **3**. A partir de este punto, la construcción del núcleo arilnaftalénico (**4**) debe tener lugar en un solo paso al mantener el compuesto **3** a reflujo en ácido trifluoroacético (TFA) durante 12 horas.

La obtención del compuesto clave (**6**) tendría lugar por reducción de **4** con LiAlH_4 para dar **5** y su posterior oxidación con el reactivo de Fétizon (Ag_2CO_3 / celita) para dar los compuestos **6** y **7**. La oxidación de **6** con nitrato cérico amónico (CAN)³²⁹ o con AgO ³³¹ conduciría a la justicidona.

³³⁰ Rawal V.H., Rao A., Cava M.P. *Tetrahedron Letters*. Vol 26, n°36 36, pp4275-4278, (1985).

³³¹ Clinton D. Snyder and Rapoport. *J. Amer. Chem. Soc.*, **12**,227-231. (1972)



Esquema 3. Primera estrategia para la síntesis de la justicidona

Obtención del compuesto 2

El compuesto **2** se obtuvo como un aceite viscoso de color amarillento, de peso molecular 337 uma y fórmula $C_{17}H_{27}NO_4Si$, determinada por espectrometría de masas de alta resolución. Su espectro de 1H -NMR ($CDCl_3$) (Fig. 1) muestra las señales propias del producto esperado: a δ 0.10 y 0.21 se observan dos singuletes que integran para tres protones cada uno y que se atribuyen a los grupos metilo unidos al silicio del grupo *t*-butildimetilsililo. Otro singulete, a δ 0.92 con integral para nueve protones, corresponde a los metilos del grupo *t*-butilo. Los singuletes a δ 3.85, 3.86 y 3.90, que integran para tres protones en cada caso, corresponden a los tres grupos metoxilo. El singulete observado a δ 5.76 (1H) corresponde a H-7 y, como era de esperar, las señales de los dos protones aromáticos se corresponden con dos singuletes a δ 7.12 (H-6) y 6.50 (H-3).

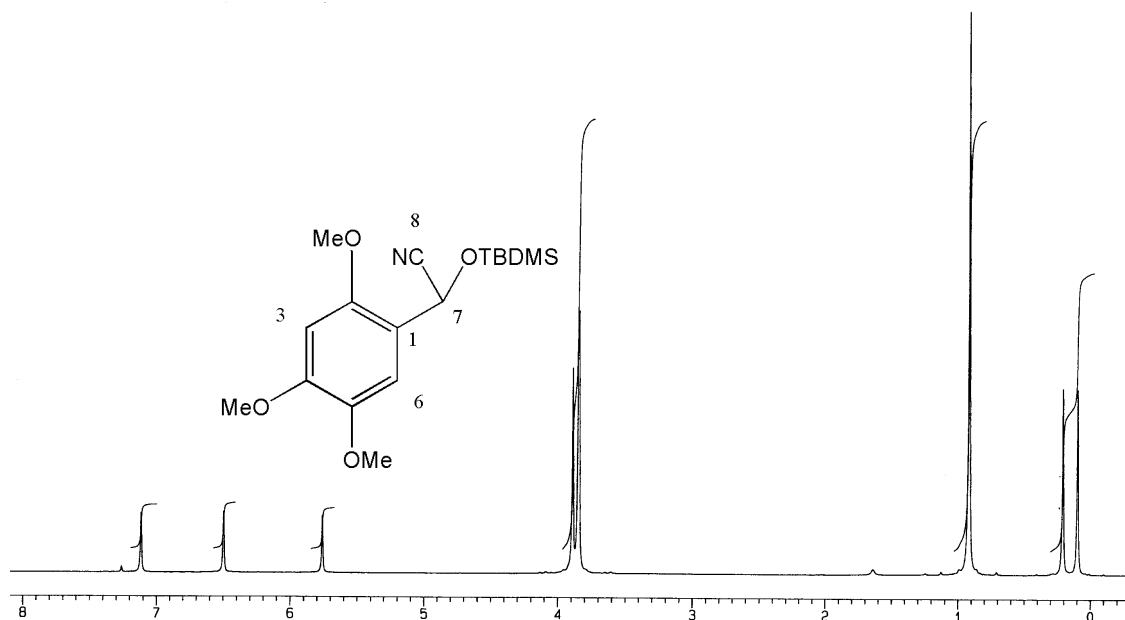


Figura 1. Espectro de 1H -NMR ($CDCl_3$) del compuesto **2**

Compuesto **3b**

La adición de **2** sobre el dimetilfumurato y la posterior captura del carbanión por el piperonal (Esq. 3) no condujo al compuesto **3**, de peso molecular esperado de 631 uma, sino que dio lugar, como producto mayoritario, a un sólido cristalino de peso molecular 599 uma y con fórmula $C_{30}H_{37}NO_{10}Si$ (HR-MS). El espectro de 1H -NMR (Fig. 2) muestra las siguientes señales: a δ 0.16 y 0.36 dos singuletes que integran para tres protones cada uno y que se corresponden con los metilos unidos a silicio del grupo *t*-butildimetilsililo, a δ 1.04 un singulete que integra para nueve protones y que corresponde a los tres grupos metilo del *t*-butilo. Además se observa un doble doblete centrado a δ 3.52 que integra para un protón y cuatro singuletes a δ 3.75, 3.85, 3.90 y 3.92 que integran para tres protones cada uno y que atribuimos a los grupos metoxilo. Centrados a δ 4.38 y 5.16 se observan dos dobletes que integran para un protón cada uno. El singulete (2H) a δ 5.99 debe corresponder con el grupo metilendioxi, mientras que el multiplete localizado entre δ 6.78 y 6.82 podría atribuirse a los protones aromáticos del piperonilo. Finalmente se observan dos singuletes con integral para un protón en cada caso a δ 6.54 y 7.16.

La diferencia de masa entre el producto obtenido (**3b**) y el esperado (**3**) fue de 32 uma, lo que nos llevó a pensar en una pérdida de metanol. Esta hipótesis estaba apoyada por la existencia de señales para cuatro y no cinco metoxilos como era de esperar. Con estos datos era bastante probable que el producto **3b** tuviera la estructura mostrada en la Figura 2, cuyo nombre sistemático es **2-Benzo[1,3]dioxol-5-il-4-[(*tert*-butil-dimetil-silaniloxi)-ciano-(2,4,5-trimetoxi-fenil)-metil]-5-oxo-tetrahydro-furan-3-ácido carboxílico metil éster**. Esta estructura es consistente con la presencia de dos singuletes a δ 6.54 (1H) y 7.16 (1H) en su espectro de 1H -NMR ($CDCl_3$) y que asignamos a los dos protones aromáticos del anillo A.

Mediante un experimento de espectroscopía de correlación bidimensional homonuclear 1H - 1H COSY (Fig. 4), las señales a δ 3.52 (dd, 1H), 4.38 (d, 1H) y 5.16 (d, 1H) fueron asignadas a H-8', H-8 y H-7' respectivamente. Por otra parte, el experimento ROESY (Fig. 5) permitió establecer la configuración relativa de los protones H-8, H-8' y H-7'.

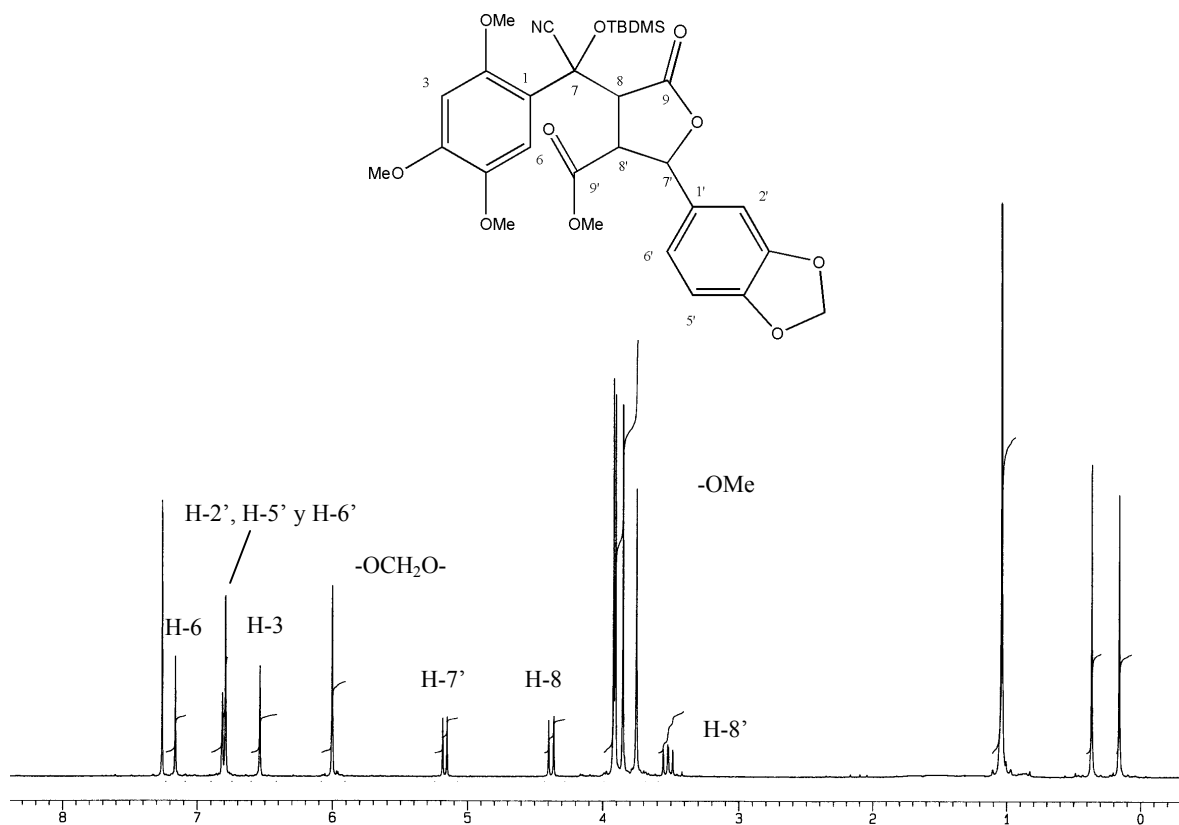


Figura 2. Espectro de $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) y estructura del compuesto 3b

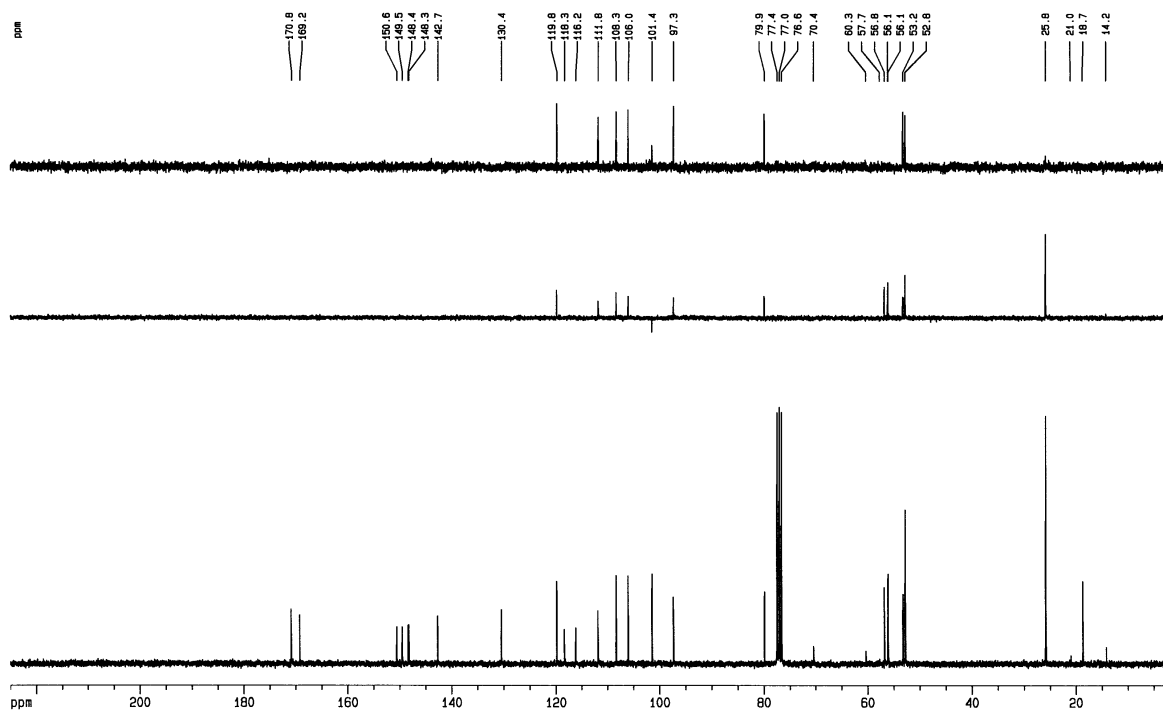


Figura 3. Espectro de $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) del compuesto 3b

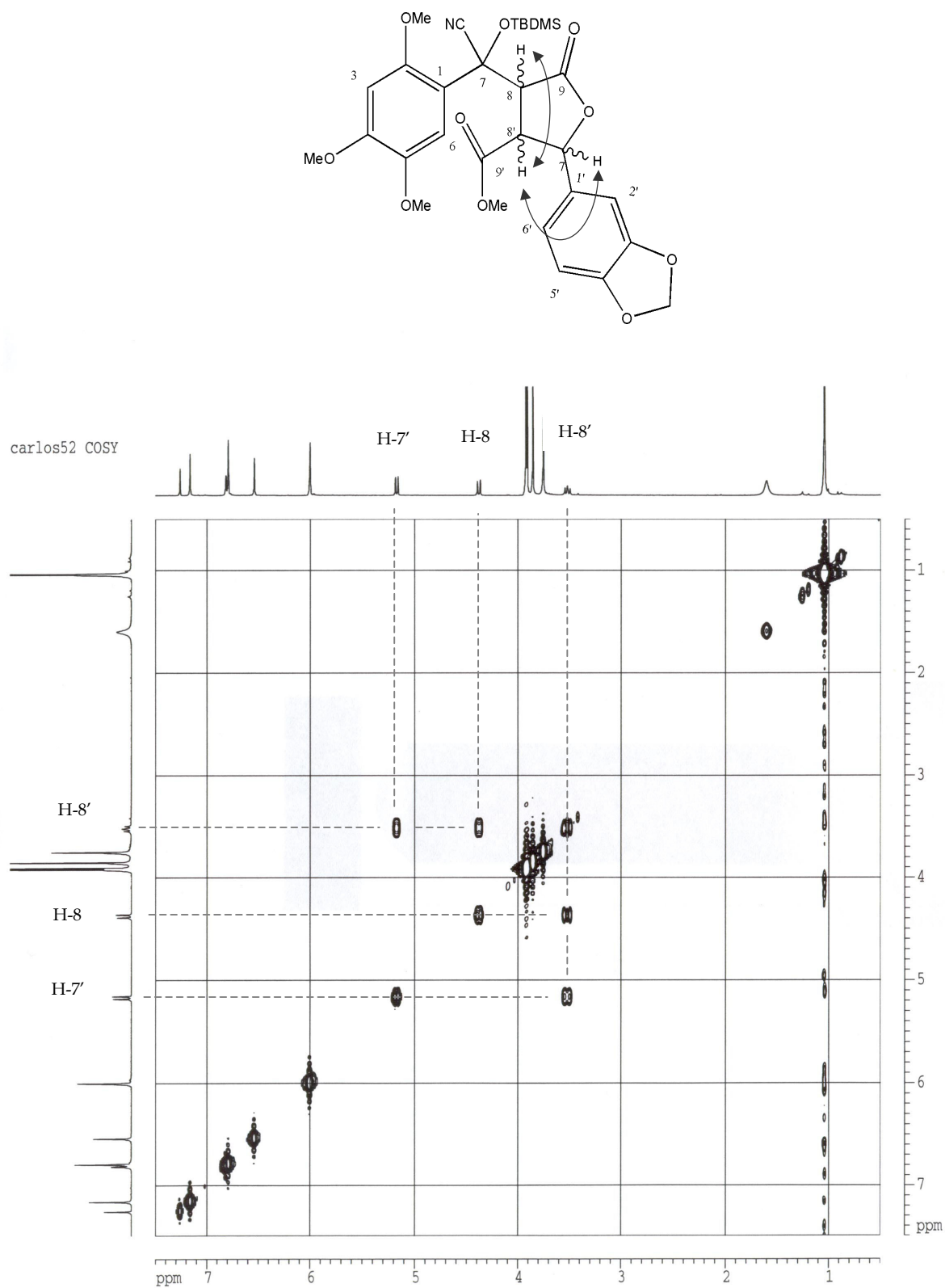


Figura 4. Experimento ^1H - ^1H COSY del compuesto **3b**

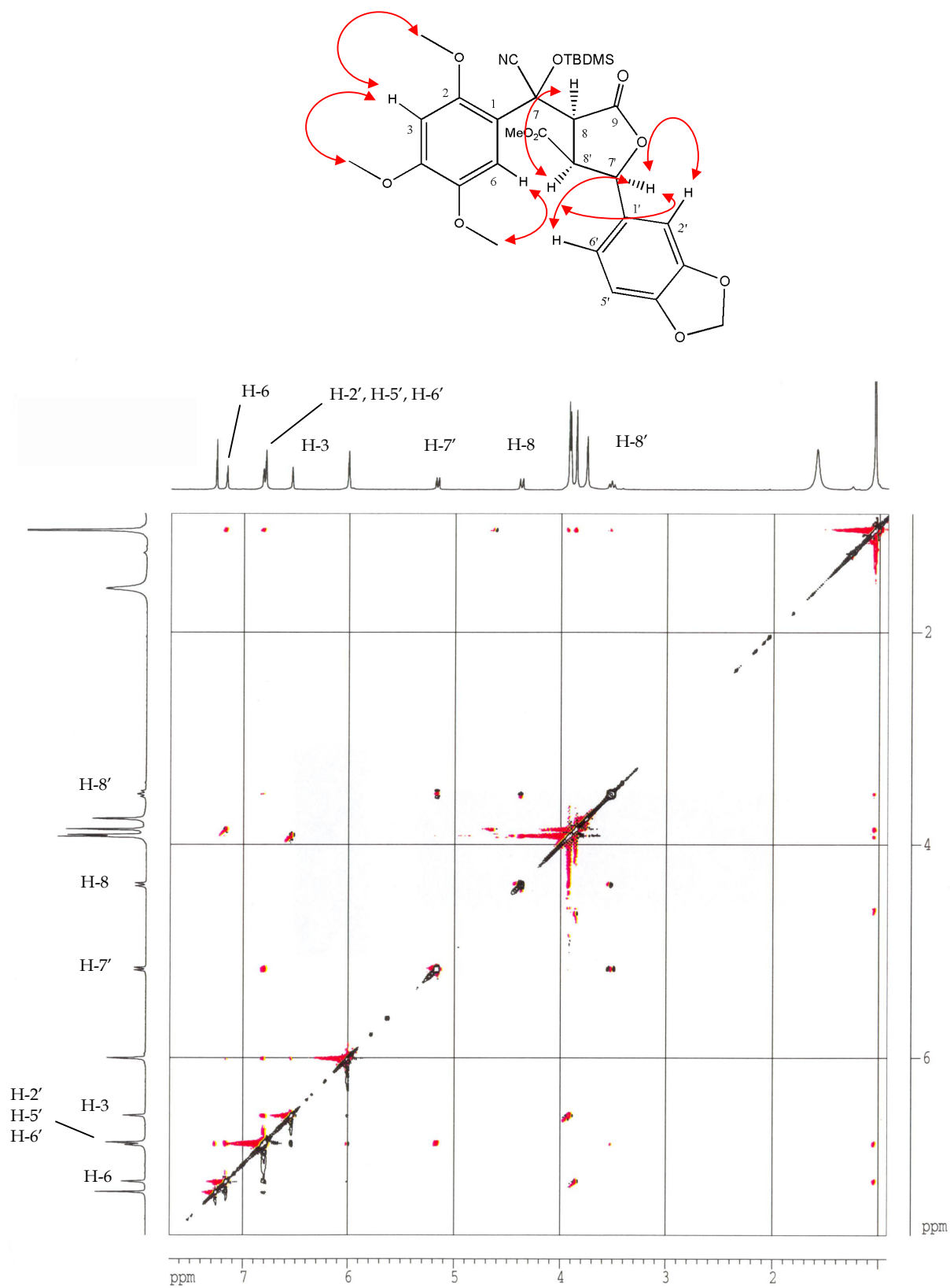


Figura 5. Experimento ROESY del compuesto 3b

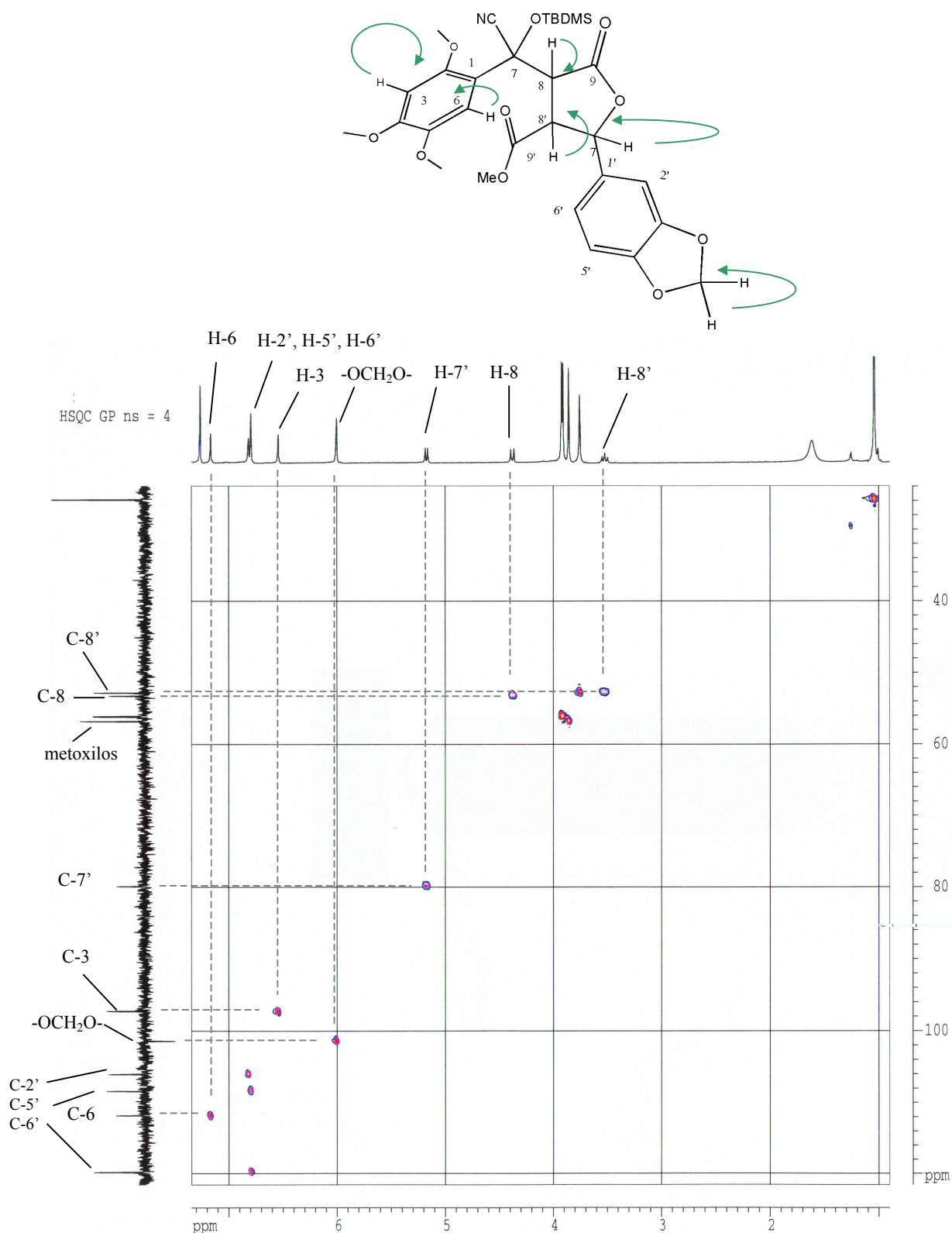


Figura 6. Experimento HSQC del compuesto **3b**

El experimento HSQC permitió hacer las asignaciones de las señales a δ 52.8 (C-8'), 53.2 (C-8), 79.9 (C-7'), 97.3 (C-3), 101.4 (-OCH₂O-) y 111.8 (C-6), así como identificar las señales que corresponden a los metinos del grupo piperonilo (C-2', C-5' y C-6').

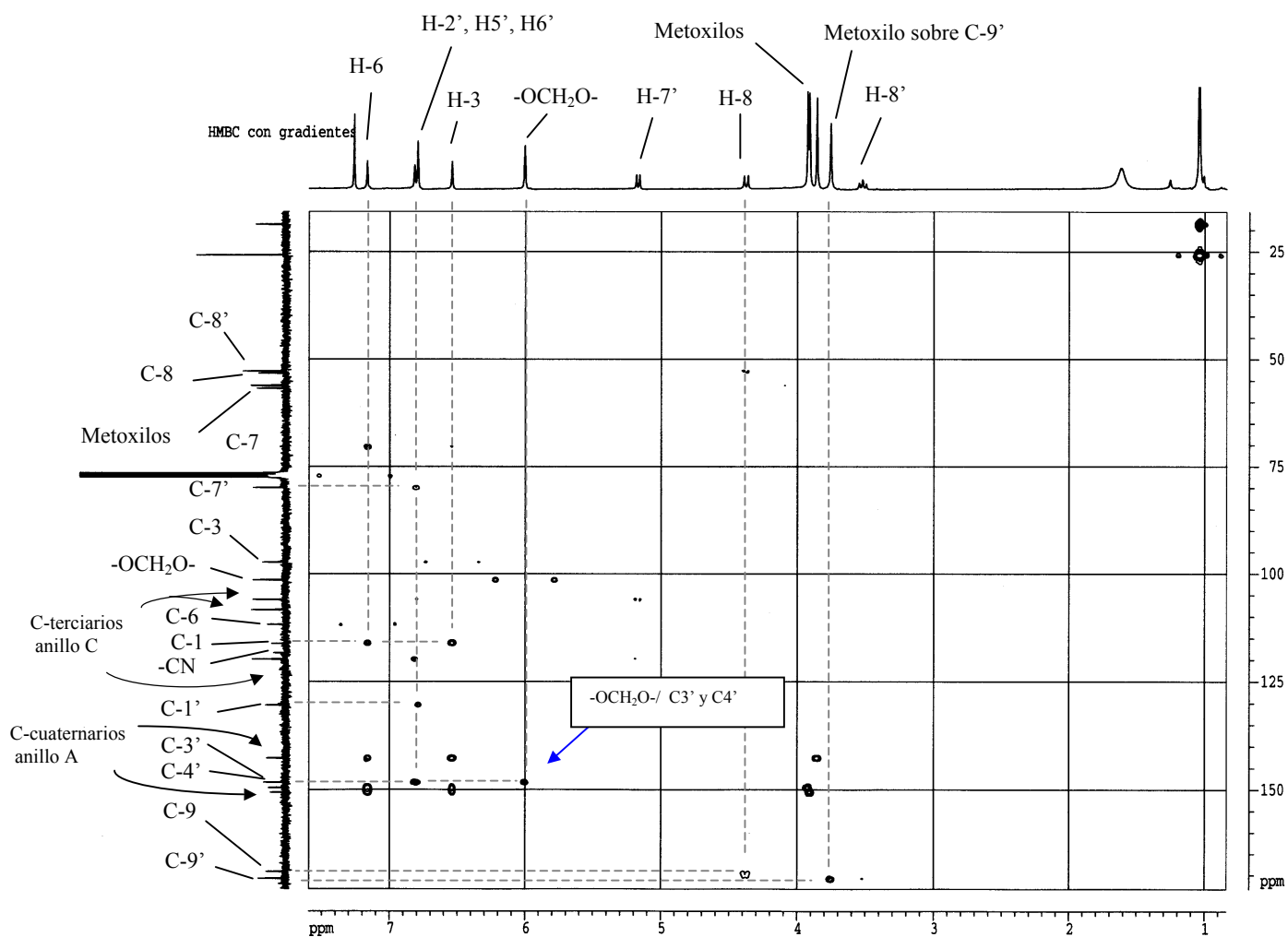
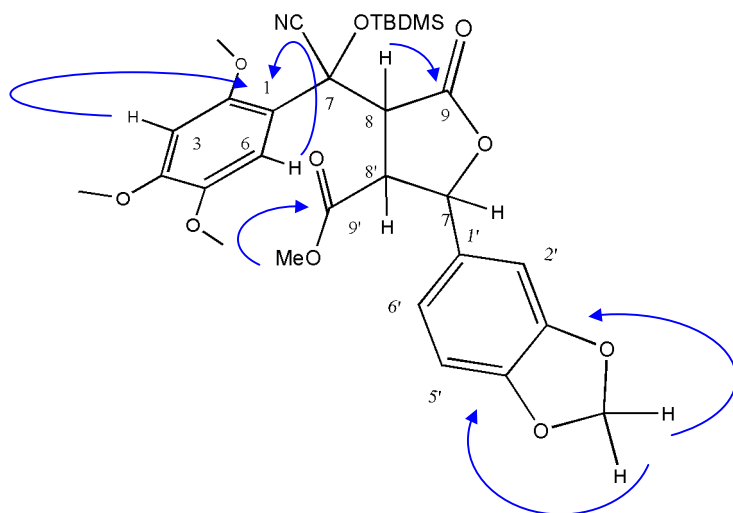
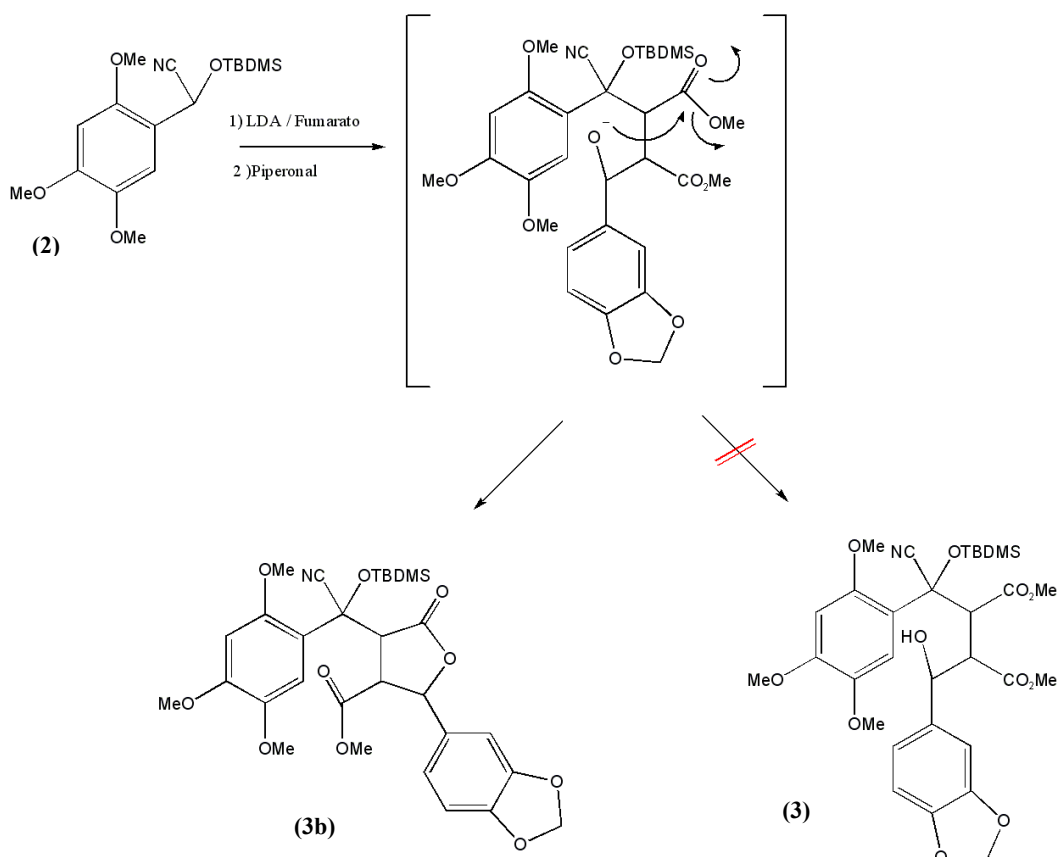


Figura 7. Experimento HMBC del compuesto 3b

El experimento HMBC (Fig. 7) muestra dos señales de carbonos cuaternarios en la zona típica de los grupos ciano (δ 110-120), una de ellas corresponde a dicho grupo (δ 116.2) y la otra a C-1 (δ 108.3), mostrando esta última una correlación con H-6 y H-3 a dos y tres enlaces respectivamente.

La correlación a tres enlaces entre los protones del grupo metilendioxi y los carbonos 3' y 4' del piperonilo (Fig. 7), indica que la señal a δ 130.4 corresponde al tercer carbono cuaternario del anillo C, es decir a C-1'.

En cuanto al mecanismo de formación, el compuesto **3b** debe de haberse formado mediante una ciclación intramolecular con eliminación de una molécula de metanol tal como se muestra en el Esquema 4.



Esquema 4. Formación del compuesto **3b**

Además de **3b** se aislaron del crudo de la reacción dos compuestos con espectro de $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) similar y de idéntica fórmula ($\text{C}_{32}\text{H}_{44}\text{NO}_{10}\text{Si}$) y que denominamos **3c** y **3d**. Probablemente estos compuestos son isómeros de **3b**.

Compuesto 3c

En el espectro de $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) (Fig. 8) de **3c** se pueden observar los metilos del grupo *t*-butildimetilsililo a δ 0.20 (s, 3H), 0.45 (s, 3H) y 1.05 (s, 9H), los cuatro grupos metoxilo a δ 3.04 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 3.83 (s, 3H) y 3.88 (s, 3H), el grupo metilendioxi a δ 5.93 (s, 2H) y señales para otros tres protones no aromáticos a δ 3.63 (t, 1H), 4.40 (d, 1H) y 5.57 (d, 1H). En la zona aromática se observa un multiplete a δ 6.54-6.73 (3H) que corresponde al grupo piperonilo y dos singuletes a δ 6.47 (1H) y 7.02 (1H) que corresponden a H-3 y H-6.

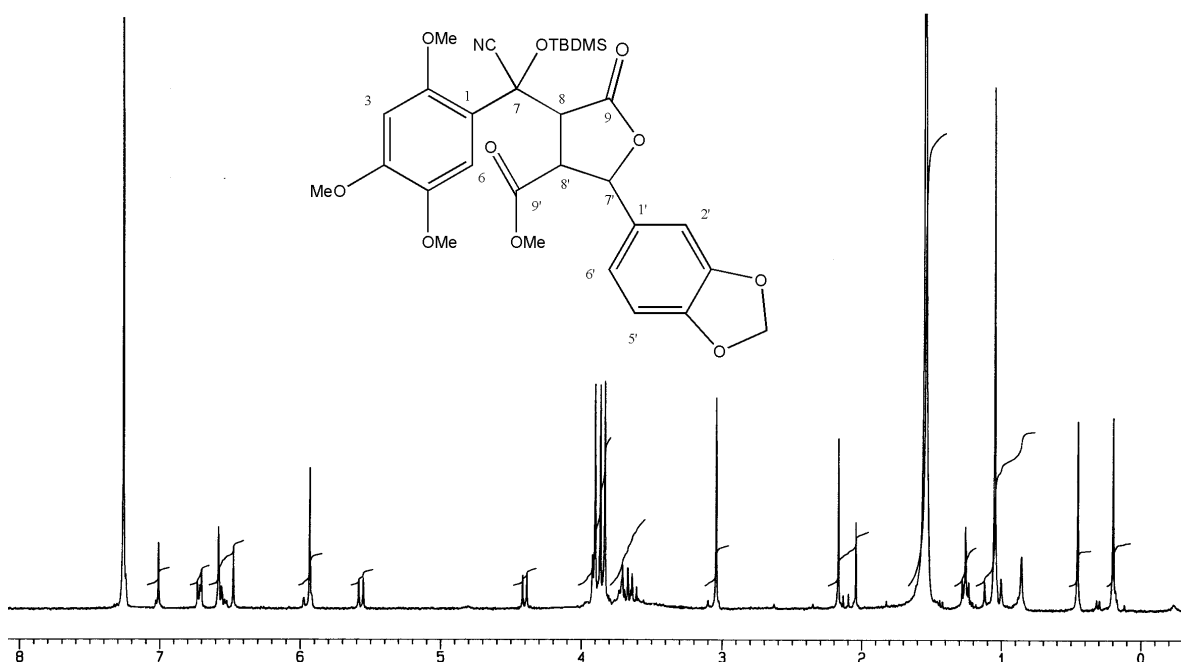


Figura 8. Espectro de $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) del compuesto **3c**

Compuesto 3d

El espectro de $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) del compuesto **3d** muestra señales correspondientes a los grupos protectores, a δ 0.21 (s, 3H), 0.49 (s, 3H) y 1.04 (s, 9H) y a cuatro grupos metoxilo, a δ 3.15 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 3.89 (s, 3H) y 3.94 (s, 3H). También se observan señales para otros tres protones a δ 3.20 (complejo, 1H), 4.48 (d, 1H) y 5.09 (d, 1H).

Las señales restantes son un singlete a δ 5.98 (2H) que corresponde al grupo metilendioxi y dos singletes que integran para un protón en ambos casos a δ 6.51 y 7.01 y que deben corresponder a H-6 y H-3 respectivamente. Finalmente se observa un multiplete entre δ 6.66 y 6.76 que integra para tres protones y que atribuimos al piperonilo.

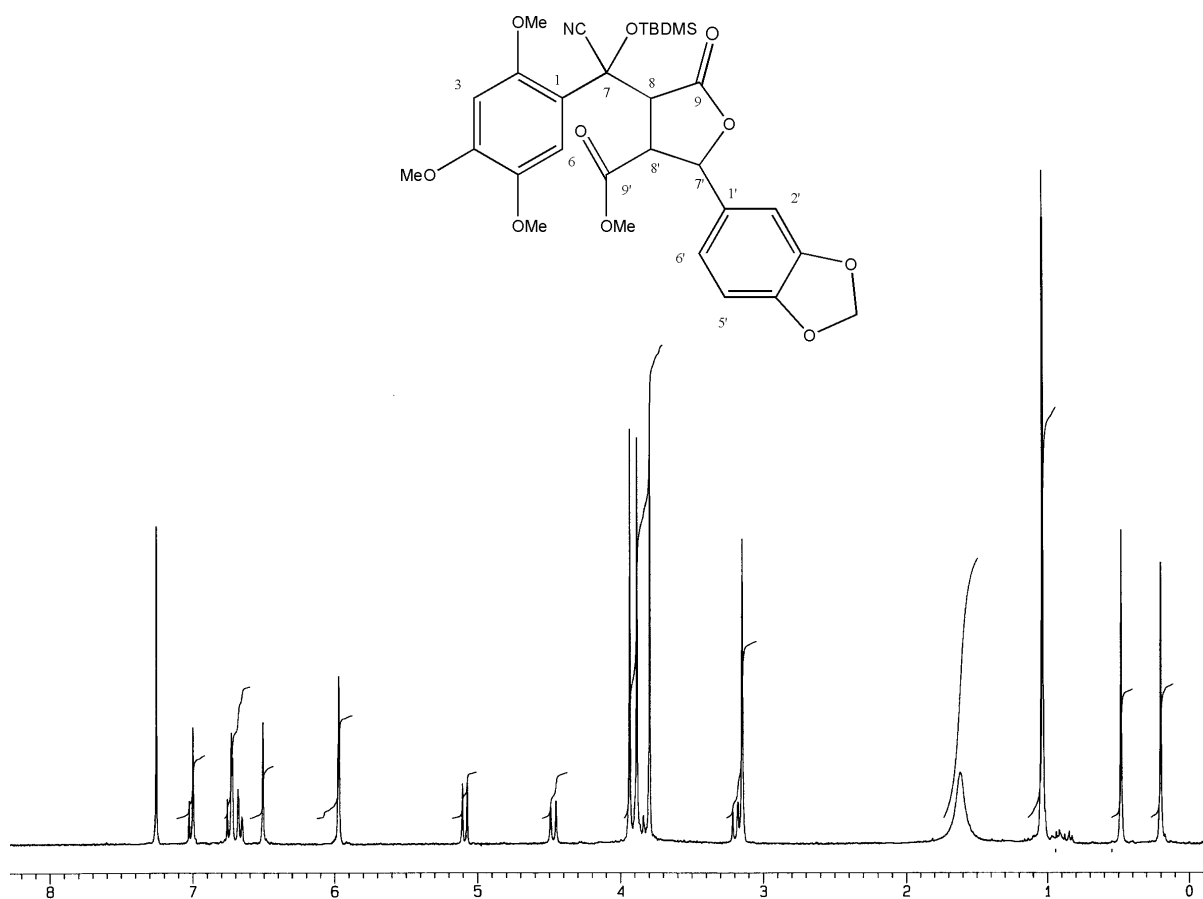
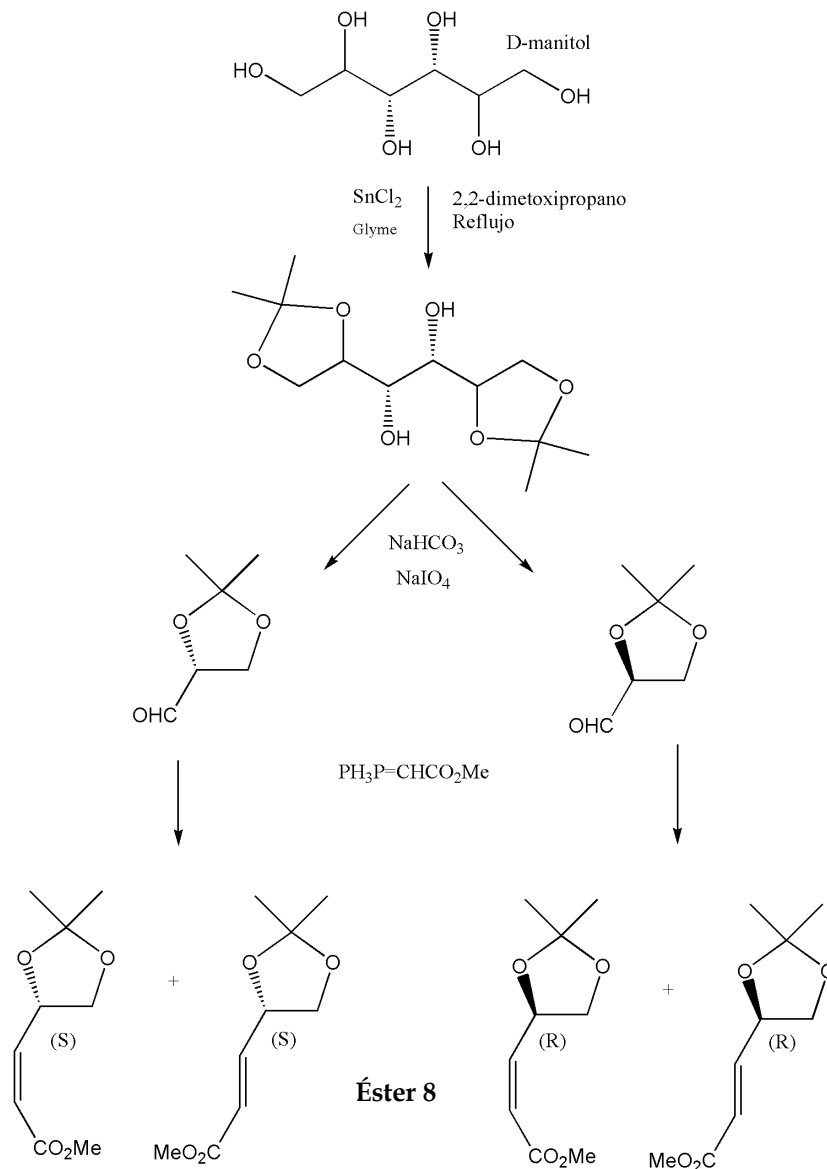


Figura 9. Espectro de $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) del compuesto **3d**

En ninguna de las ocasiones en que se repitió la reacción se detectó la presencia del compuesto **3** (Esq. 3). Por otra parte no parecía lógico continuar la síntesis a partir de **3b** abriendo la lactona, ya que el rendimiento de la obtención de **3b** era muy bajo (17%), por lo que se decidió abandonar esta línea y buscar una nueva estrategia.

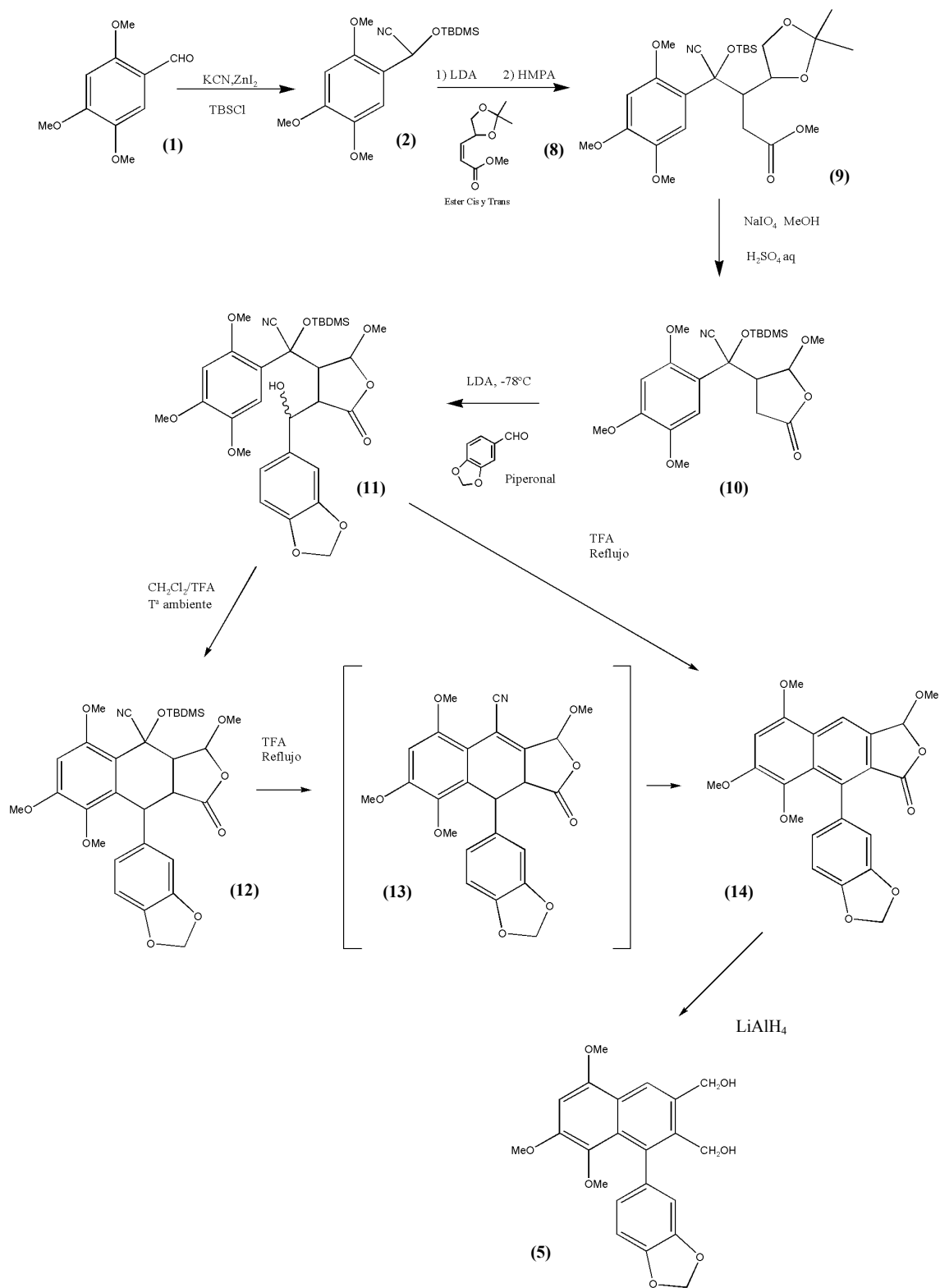
Con el objeto de eliminar la posibilidad de ciclación intramolecular, se decidió cambiar el dimetilfumarato por otro éster α,β -insaturado (**8**)³³², cuya síntesis se describe en el Esquema 5³³³. La nueva estrategia sintética se muestra en el Esquema 6.



Esquema 5. Obtención del éster 8

³³² Yoshida S.-i., Yamanaka T., Miyake T., Moritani Y., Ohmizu H. and Iwasaki T. *Tetrahedron*, **53** (28), 9585-98, (1997)

³³³ Schmid C.R., Bryant J.D., Dowlatzedah M., Phillips J.L., Prather D.E., Schantz R.D., Sear N.L., Vianco C.S. *J.Org. Chem.*, **56** (12), 4056-8, (1991)



Esquema 6. Segunda estrategia sintética

Según el nuevo esquema sintético, la adición conjugada del carbanión derivado de **2** sobre los isómeros del éster **8**, conduciría a **9** que, tratado con ácido sulfúrico acuoso y peryodato sódico, debe dar el compuesto **10**.

La adición aldólica del enolato obtenido al tratar **10** con LDA a -78°C sobre el piperonal, conduciría al lignano **11**, que podría entonces ser ciclado para dar **12** y luego aromatizado, obteniéndose de este modo el compuesto **14**. Otra alternativa consistiría en llevar a cabo estas dos reacciones en un solo paso, al mantener a reflujo con ácido trifluoroacético (TFA), durante 12h, el compuesto **11**. Finalmente, el compuesto **14** sería reducido para dar **5** que, como se explicó anteriormente (Esq. 3), podría oxidarse a **6**.

Obtención de los compuestos **10a** y **10b**

La adición de Michael del carbanión derivado de **2** sobre el éster **8** condujo a una mezcla compleja de isómeros del compuesto **9**, con peso molecular de 523 uma. Tras ser purificada mediante cromatografía en columna, dicha mezcla fue tratada con NaIO_4 en metanol y ácido sulfúrico acuoso. De este modo, se obtuvieron dos diastereómeros (**10a** y **10b**) de peso molecular el esperado (451 uma) y con fórmula molecular $\text{C}_{22}\text{H}_{33}\text{NO}_7\text{Si}$, determinada mediante espectrometría de masas de alta resolución.

El espectro de $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) (Fig. 10) del isómero mayoritario (**10a**) muestra las siguientes señales: dos singuletes que integran para tres protones cada uno a δ 0.12 y 0.38 y que corresponden a los dos metilos unidos al silicio del grupo *t*-butildimetilsililo, un singulete a δ 1.00 que integra para nueve protones y que corresponde a los tres metilos del grupo *t*-butilo, dos dobles dobletes que integran para un protón cada uno, centrados a δ 2.66 y 2.92 y una señal compleja que integra para un protón entre δ 3.35-3.36. Estas señales deben corresponder a los protones H-3', H-4'a y H-4'b. También se observa un singulete a δ 3.20 que integra para tres protones y que atribuimos al metoxilo acetálico. El espectro muestra además tres singuletes a δ 3.82, 3.91 y 3.92 que integran para tres protones cada uno y que corresponden a los grupos metoxilo sobre el anillo aromático. El singulete a δ 4.99 con integral para un protón fue atribuido al protón acetálico. Finalmente, a δ 6.60 y 7.06 se observan dos singuletes con

integral para un protón en cada caso y que corresponden a los dos protones aromáticos (H-3 y H-6).

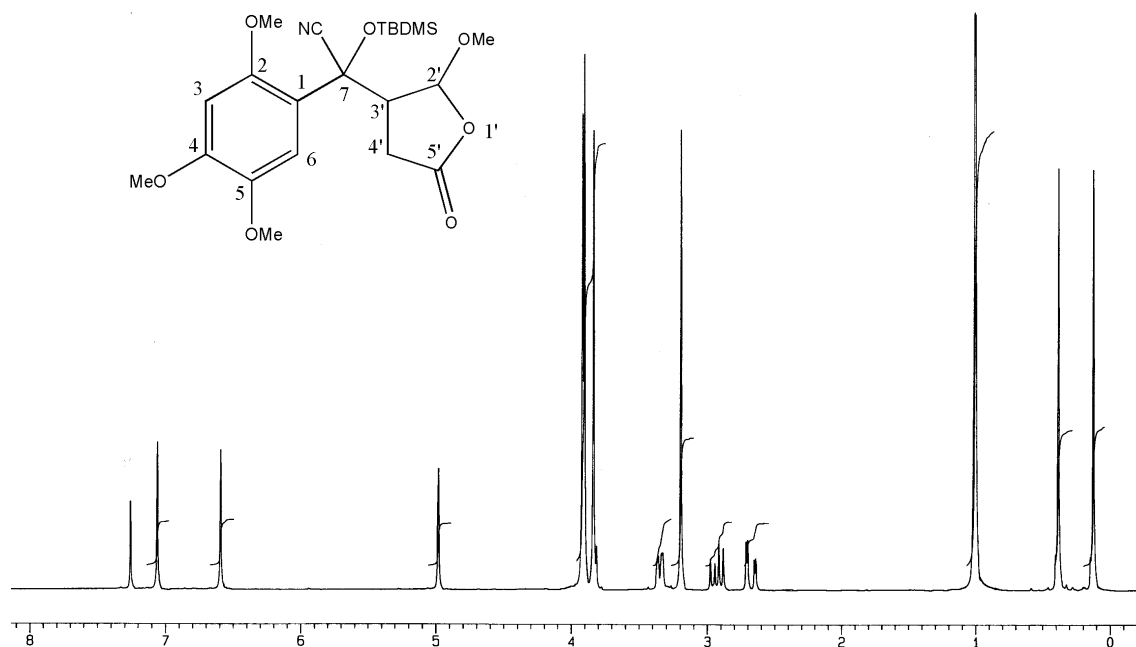


Figura 10. Espectro de $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) y estructura de **10a**

El espectro de $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) del isómero **10b** mostró señales similares: tres singuletes a δ 0.14 (3H), 0.39 (3H) y 1.01 (9H), dos dobles dobles a δ 2.21 (1H) y 2.36 (1H), una señal compleja a δ 3.31 que integra para un protón, cuatro singuletes con integral para tres protones cada uno a δ 3.54, 3.80, 3.90 y 3.91, un singulete con integral para un protón a δ 5.54 y dos singuletes aromáticos con integral para un protón a δ 6.55 (1H) y 6.97 (1H).

Obtención del compuesto 11

La adición del enolato, formado al tratar el compuesto **10a** con LDA a -78°C , sobre el piperonal, condujo a un compuesto de peso molecular 601 uma y fórmula $\text{C}_{30}\text{H}_{39}\text{NO}_{10}\text{Si}$ (HR-MS). Su espectro de $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) (Fig. 11) muestra las señales propias del producto esperado: dos singletes con integral para tres protones a δ 0.07 y 0.38 que corresponden a los metilos unidos al silicio del grupo *t*-butildimetilsililo, un singlete a δ 1.01 que integra para nueve protones y que corresponde a los tres metilos del grupo *t*-butilo, un doblete con integral para un protón centrado a δ 2.47, un singlete a δ 2.88 (1H), un singlete a δ 3.62 (6H) que atribuimos a dos grupos metoxilo, 2 singletes a δ 3.90 y 3.92 con integral para tres protones en cada caso y que corresponden a los otros dos grupos metoxilo, un doblete a δ 4.61 (1H), un singlete a δ 5.60 (1H), dos singletes a δ 5.85 (1H) y 5.92 (1H) que corresponden al grupo metilendioxi, dos singletes con integral de un protón en ambos casos a δ 6.14 y 6.86 que corresponden a los protones aromáticos H-3 y H-6, respectivamente. Finalmente, se observan las señales características (δ 6.32 (s, 1H), 6.41 (d, 1H) y 6.51 (d, 1H)) del grupo piperonilo.

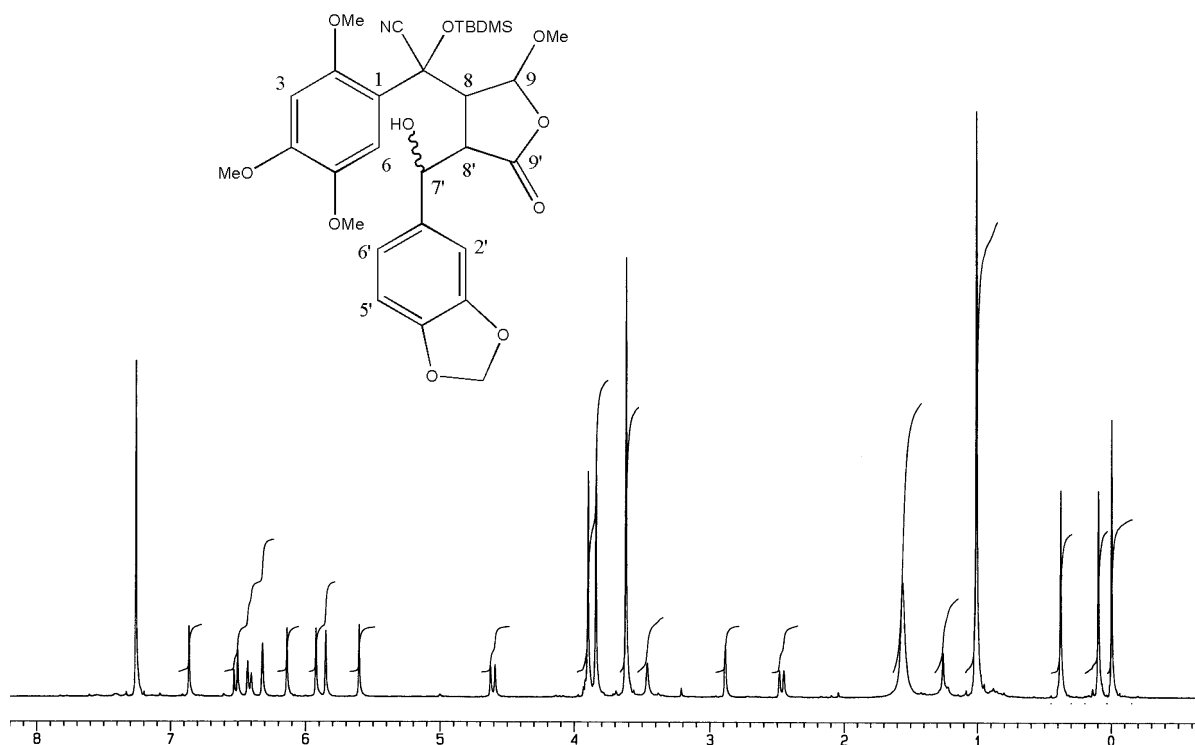


Figura 11. Espectro de $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) y estructura de **11**

Por otra parte, el espectro de ^{13}C -NMR y los experimentos DEPT revelan la existencia de señales para 11 carbonos cuaternarios, 9 terciarios, 1 metileno y 9 metilos, lo cual es coherente con la estructura de **11**. Mediante los experimentos COSY y ROESY fue posible asignar las señales del espectro de ^1H -NMR. El singulete a δ 5.60 corresponde al protón acetálico H-9, ya que en el experimento ROESY (Fig. 13) muestra efecto NOE con el singulete a δ 3.56, donde está incluida la señal para el metoxilo acetálico. En el experimento ^1H - ^1H COSY (Fig. 12), el doblete centrado a δ 2.47 muestra un doble acoplamiento con el doblete centrado a δ 4.60 y el singulete a δ 2.88, pero no muestra acoplamiento con el protón acetálico H-9, por lo tanto el doblete centrado a δ 2.47 corresponde a H-8', el doblete a δ 4.60 al protón geminal al hidroxilo (H-7') y el singulete a δ 2.88 al protón H-8. Los datos obtenidos del experimento ROESY apoyan esta hipótesis ya que se observa efecto NOE entre H-8 y H-9, entre H-8' y H-2' así como entre H-7' y H-6' entre otros.

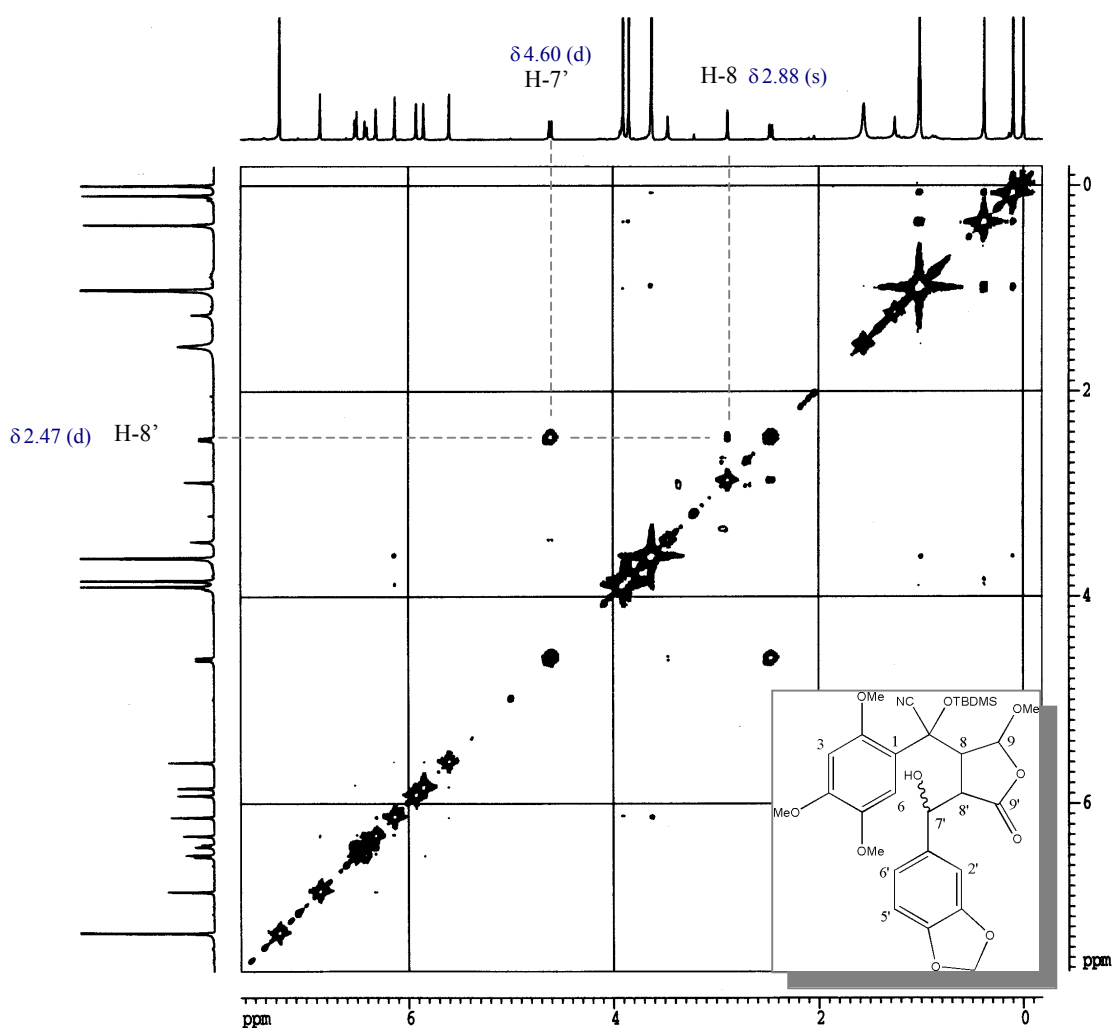


Figura 12. Experimento COSY del compuesto **11**

Los experimentos bidimensionales de correlación heteronuclear HSQC (Fig. 14) y HMBC (Fig. 15) fueron empleados para asignar las señales del espectro de carbono.

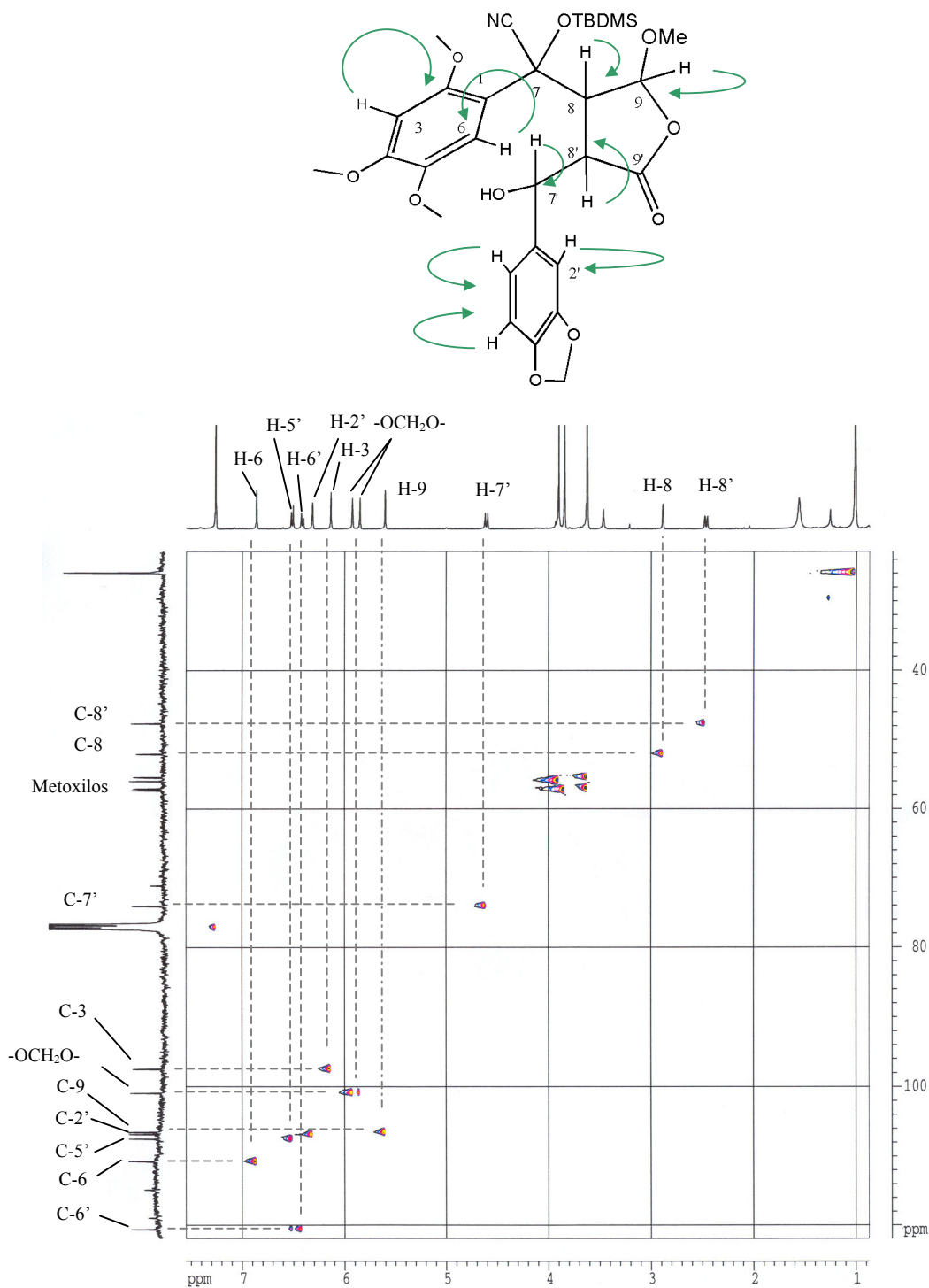


Figura 14. Experimento HSQC de 11

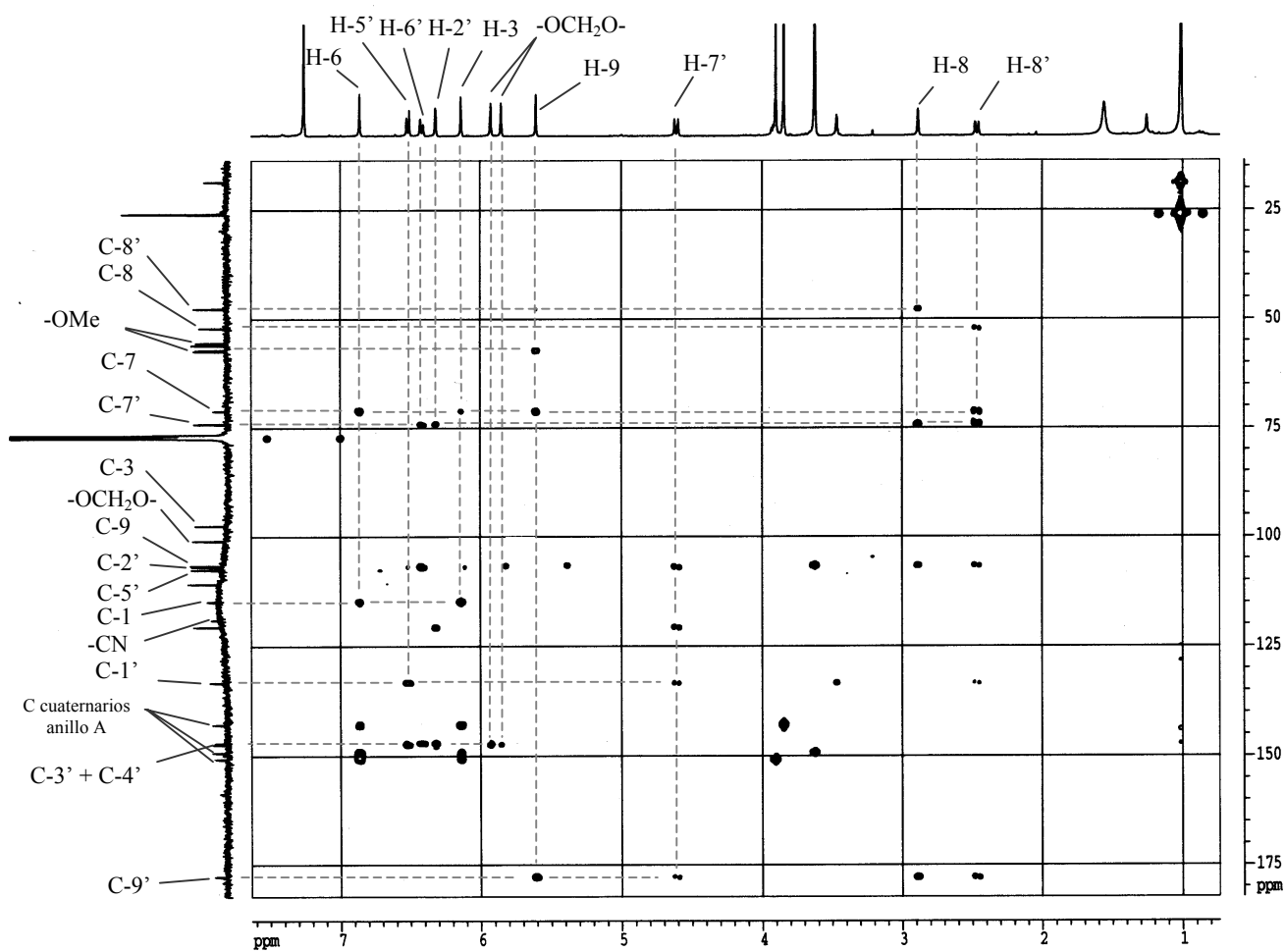
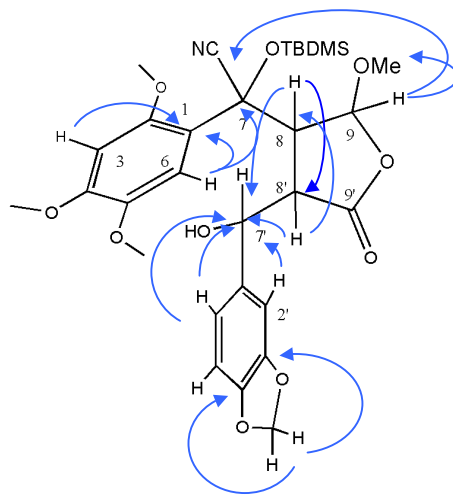
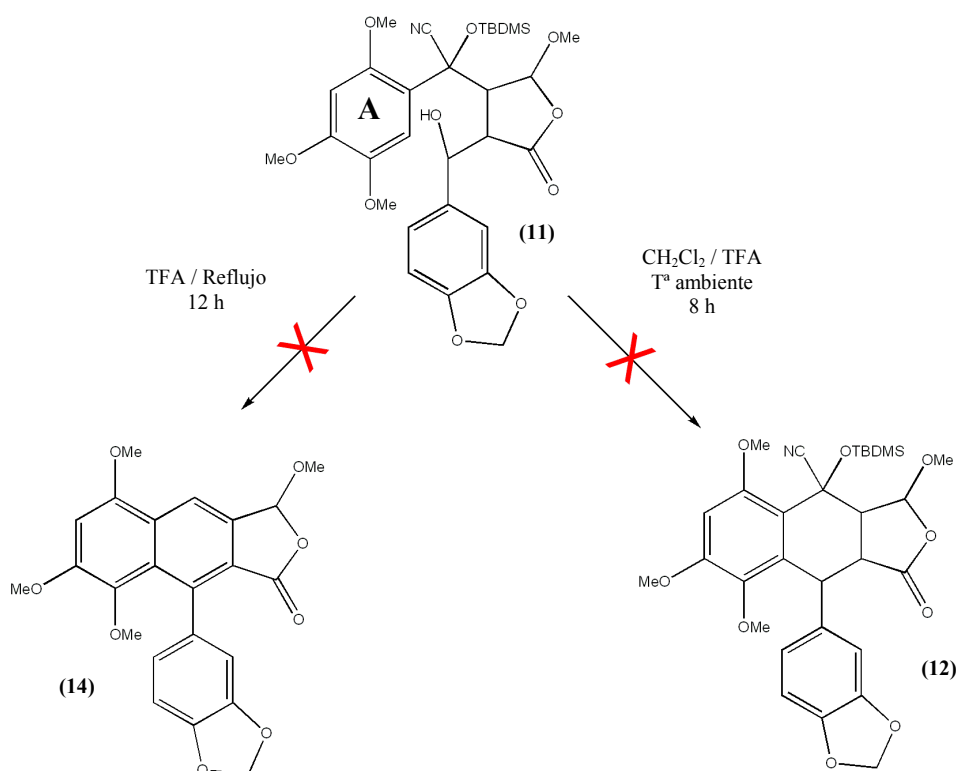


Figura 15. Experimento HMBC de 11

El intento de ciclación de **11** para obtener **12** (Esq. 7) empleando ácido trifluoroacético (TFA) y diclorometano al 50% a temperatura ambiente fracasó, recuperándose gran parte del producto de partida. Por otra parte, al intentar forzar la reacción sometiendo al compuesto **11** a reflujo durante 12 horas en TFA con el objeto de obtener el compuesto **14** (Esq. 7), se recuperó parte del producto de partida y además se detectó la presencia de un compuesto (**15**) (Esq. 8) de peso molecular 697 uma y con fórmula (HR-MS) $C_{31}H_{38}F_3NO_{11}Si$.



Esquema 7. Intentos de ciclación y de aromatización del compuesto **11**

El espectro de 1H -NMR ($CDCl_3$) del compuesto **15** (Fig. 16), muestra tres singuletes a δ 0.075 (3H), 0.33 (3H) y 0.99 (9H) que corresponden a los dos metilos unidos al silicio y a los tres metilos del grupo *t*-butilo respectivamente. Además se observan cuatro singuletes que integran para tres protones cada uno a δ 3.24, 3.82, 3.89 y 3.92 y que corresponden a los metoxilos. A δ 3.39 y 5.04 e integrando para un protón en cada caso se observan dos singuletes, siendo probablemente el que resuena a campos más bajos el protón acetálico.

A δ 5.96 se observa un singulete que integra para dos protones y que corresponde al grupo metilendioxi y centrado a δ 6.26 un doblete que integra para un protón. Los dos singuletes a δ 6.54 (1H) y 6.97 (1H) los atribuimos a los dos protones aromáticos del anillo A, lo que indica que el producto no está ciclado. Finalmente se observa una señal compleja que integra para tres protones centrada a δ 6.83 y que se debe al anillo de piperonilo.

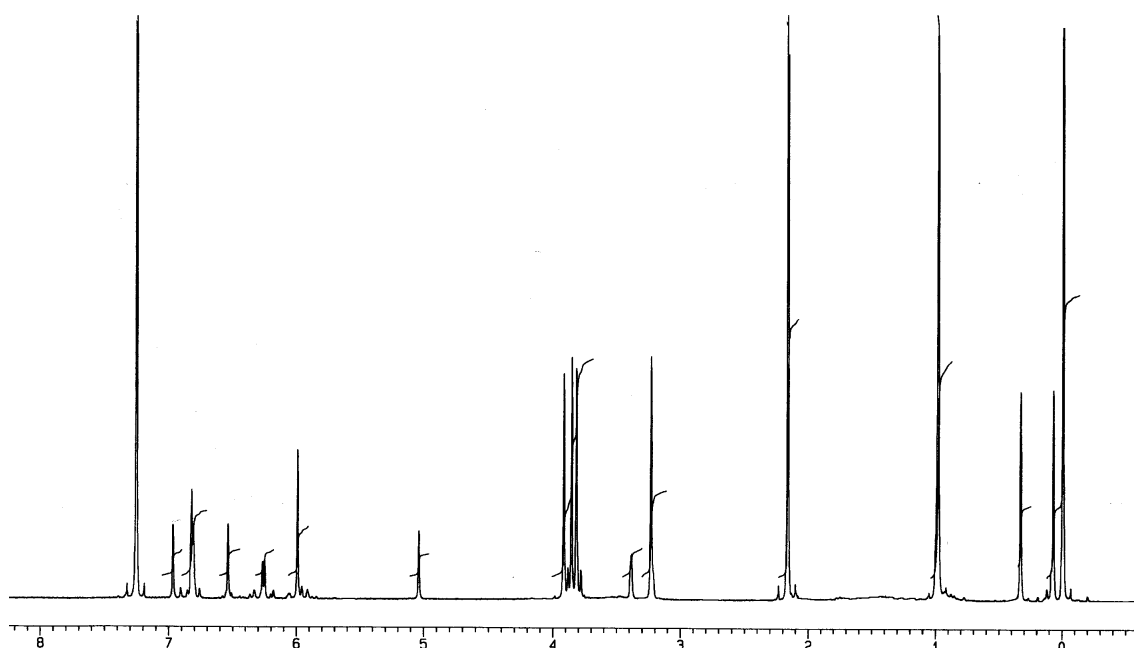
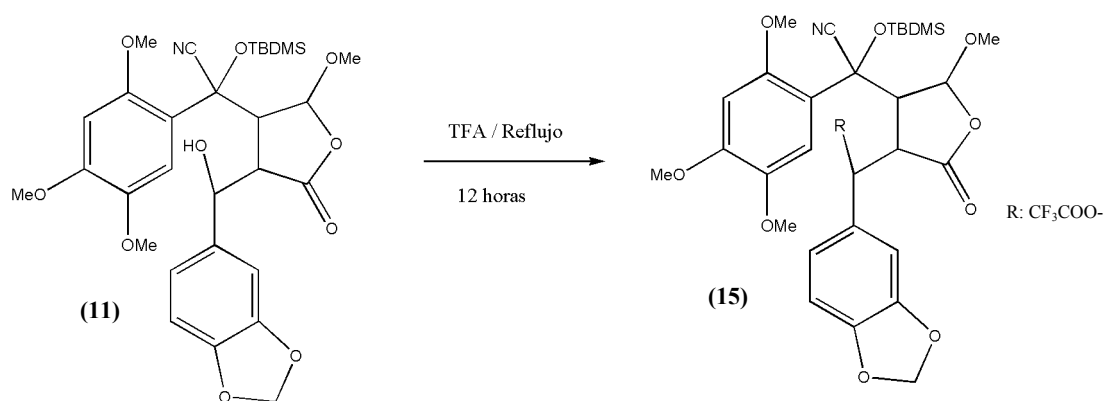


Figura 16. Espectro de $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) del compuesto 15

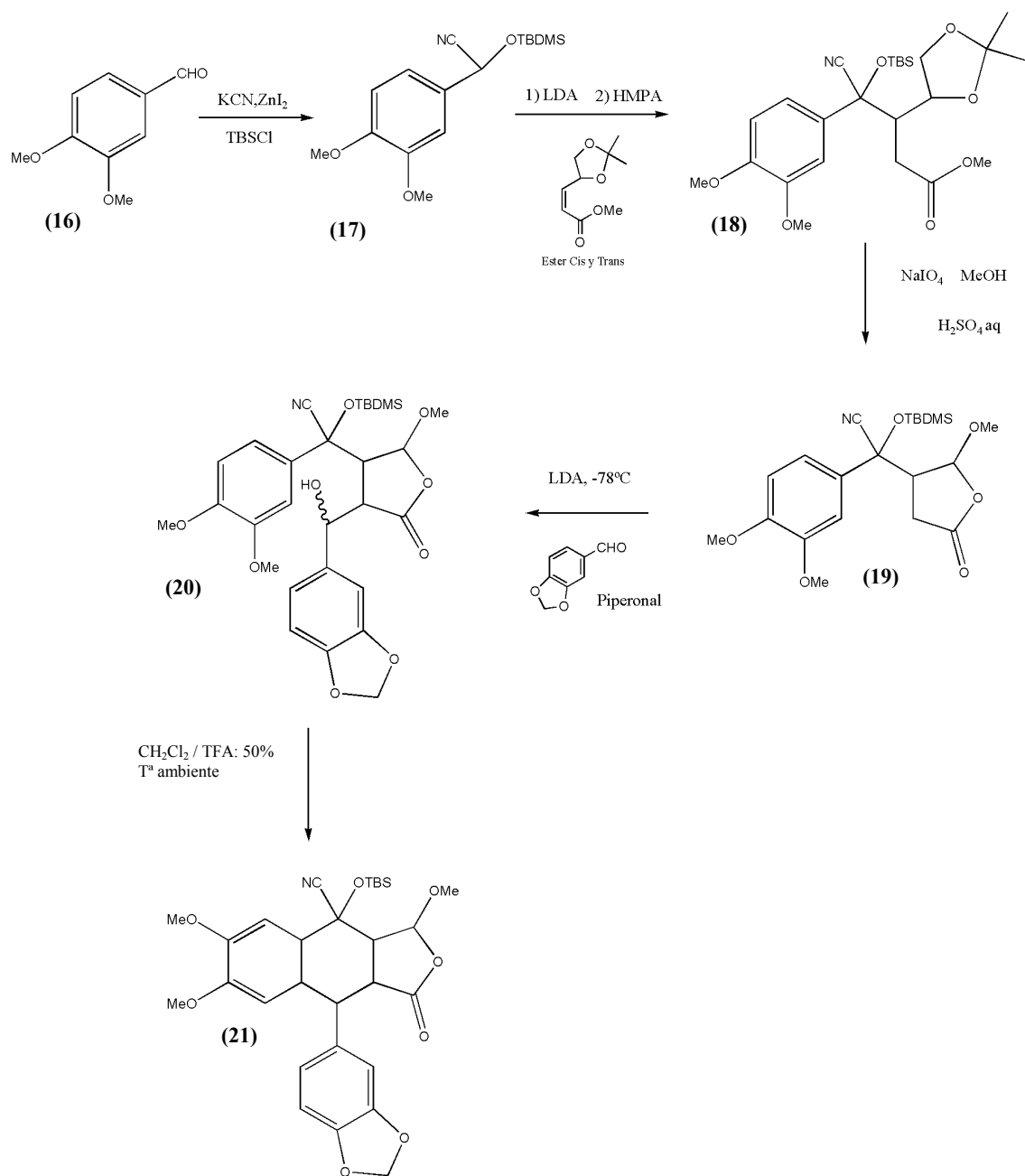
Estos datos espectroscópicos están de acuerdo con los del derivado trifluoroacetilado mostrado en el Esquema 8. Un dato que apoya esta hipótesis es la aparición de un doblete centrado a δ 6.26 (1H), que atribuimos al protón geminal al grupo trifluoroacetato y que resuena a campos anormalmente bajos. De ser correcta nuestra hipótesis, este compuesto debe haberse formado a partir del carbocatión adecuado para la ciclación, no habiéndose producido ésta quizás por imposibilidad del sistema para adquirir la conformación adecuada debido a impedimentos estéricos.



Esquema 8. Formación del compuesto 15

Como se ha visto en la introducción de este capítulo, la ciclación es una reacción habitual en la síntesis de lignanos de este tipo y está descrita con buenos rendimientos para varios de estos compuestos. Por tanto empezamos a sospechar que, de algún modo, la sustitución 2, 4, 5 del anillo A dificultaba la ciclación.

Para comprobar esta hipótesis y para descartar que se tratase de un error en el procedimiento experimental, se decidió sintetizar e intentar ciclar el compuesto **20** (Esq. 9) para dar **21**, empleando un procedimiento análogo al descrito para **11** (Esq. 6).



Esquema 9. Obtención del compuesto **21** a partir del veratraldehído

A partir del veratraldehído (**16**), un aldehído aromático menos sustituido que el empleado anteriormente, se obtuvo el compuesto **20**, de fórmula $C_{29}H_{37}NO_9Si$ determinada por espectrometría de masas de alta resolución y cuyas señales de 1H -NMR (Fig. 17) encajan perfectamente con el producto esperado: a δ 0.02 (s, 3H), 0.30 (s, 3H) y 0.98 (s, 9H) se encuentran las señales correspondientes al grupo *t*-butildimetilsililo, las señales observadas a δ 2.35 (s, 1H), 2.59 (d, 1H), 3.43 (s, 1H) 4.62 (d, 1H) y 5.57 (s, 1H) corresponden a los 5 protones no aromáticos (hidroxilo incluido).

Las señales de los tres grupos metoxilo aparecen como tres singletes que integran para tres protones cada uno a δ 3.64, 3.69 y 3.91. A δ 5.90 y 6.02 se observan dos singletes que integran para un protón en cada caso y que atribuimos al grupo metilendioxi. Finalmente, en la zona de los protones aromáticos se observan 2 singletes a δ 6.15 (1H) y 6.30 (1H) y 4 dobletes a δ 6.42 (1H), 6.53 (1H), 6.77 (1H) y 6.80 (1H), lo cual está de acuerdo con la existencia de dos anillos aromáticos disustituídos en las posiciones *meta* y *para*.

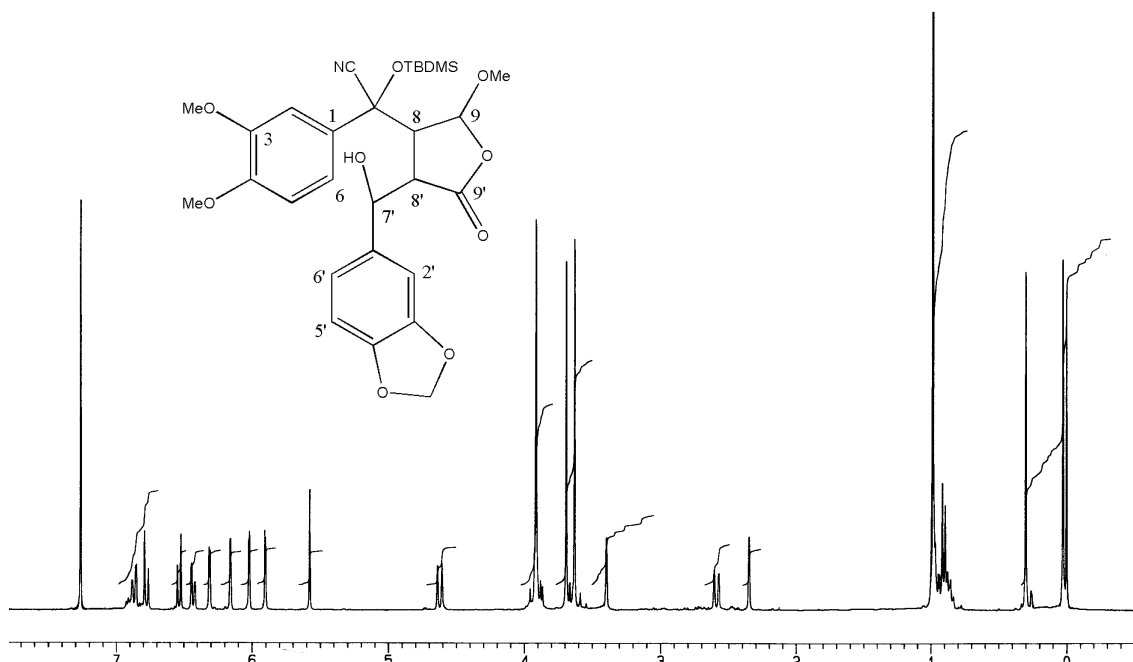
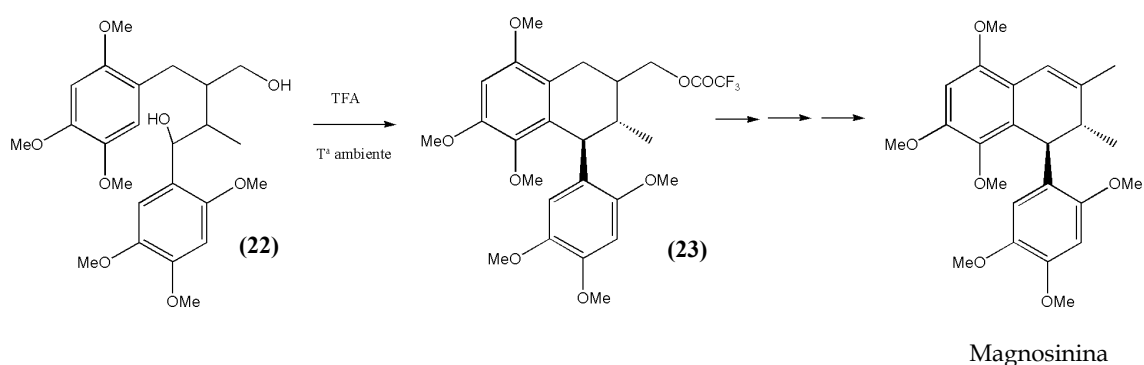


Figura 17. Espectro de 1H -NMR ($CDCl_3$) de **20**

El hecho de que **20** se ciclara fácilmente para dar **21**, sugiere que la combinación de un grupo voluminoso como el *t*-butildimetilsililo y de un anillo A trisustituido en las posiciones 2, 4 y 5 confiere al sistema ciertas dificultades para la ciclación que, al parecer, no se presentan con un anillo A menos sustituido.

No obstante, pese a que dicha ciclación no parecía posible, considerábamos conveniente, si no esencial, obtener un compuesto con la sustitución 2, 4, 5 que por oxidación rindiera justicidona. Se podía entonces optar por usar otros grupos protectores menos voluminosos para la cianhidrina o por abandonar la idea de conseguir la ciclación, eliminación de los grupos protectores y aromatización en un solo paso (Esq. 2 y 3).

Finalmente, nos decidimos por esta última opción y elaboramos una nueva estrategia en la que la eliminación de los grupos protectores precede a la ciclación. Esta idea parecía atractiva a la luz de los resultados obtenidos por Yoshida et al.³³⁴ en la síntesis total de magnosinina. Si bien éste no es un lignano arilnaftalénico, presenta en el anillo A la misma sustitución, muy rara en lignanos, que nuestro objetivo sintético (**6**) (Esq. 1). En una de las etapas de la síntesis de magnosinina, los autores ciclan el intermedio **22**, obteniendo el compuesto **23** (Esq. 10).

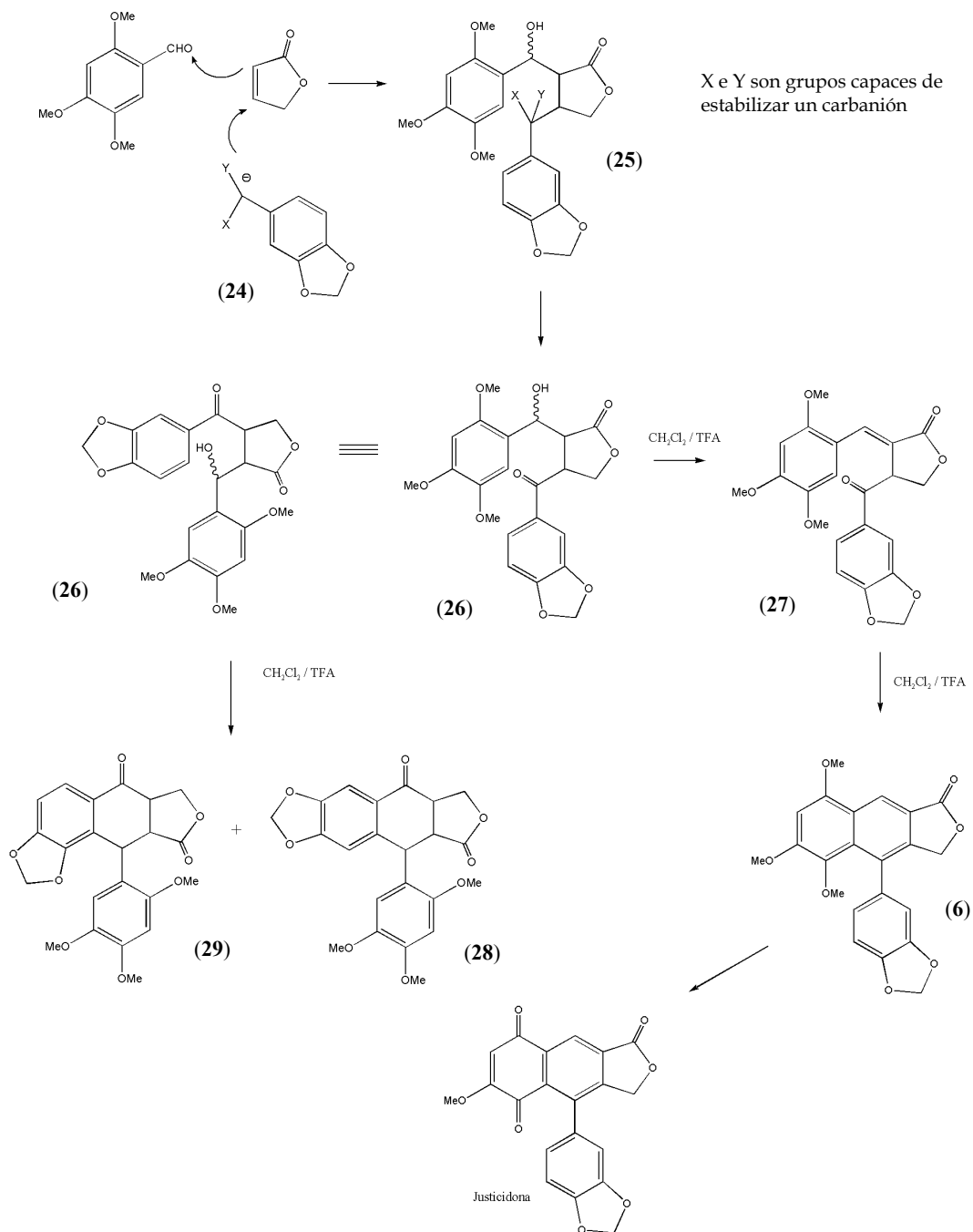


Esquema 10. Ciclación del intermedio **22** en la síntesis de magnosinina de Yoshida et al., 1994

Otra variación importante sobre nuestras estrategias anteriores, sería iniciar la síntesis de la justicidona comenzando por el anillo C, en orden inverso respecto a lo que habíamos hecho hasta ahora.

³³⁴ Yoshida S.-i., Ogiku T., Ohmizu H., Iwasaki T. *Synlett*, Nov, 895-8, (1994)

Tal como se muestra en el Esquema 11, la adición de Michael del carbanión de un derivado del piperonal (**24**) sobre la 2-furanona y posterior captura del enolato resultante por el 2, 4, 5-trimetoxi-benzaldehído, conduciría al compuesto **25**.

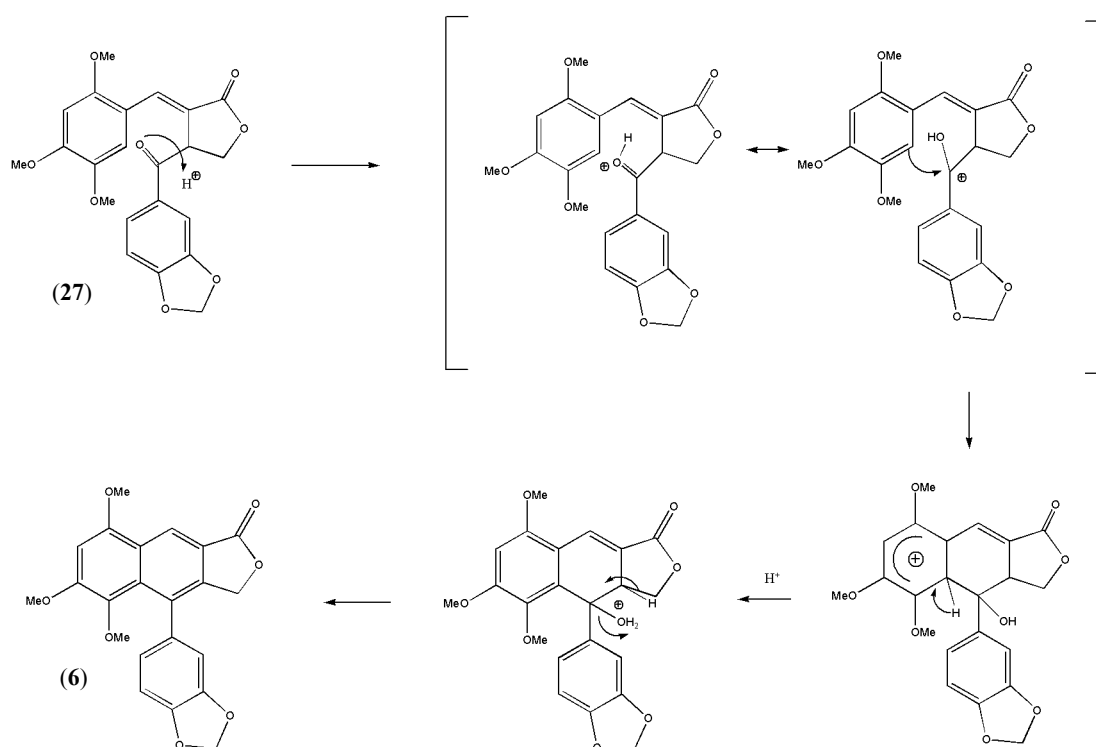


Esquema 11. Estrategia general para la síntesis de la justicidona

Esta nueva estrategia tendría la ventaja de que dejaría la lactona con la orientación apropiada desde el principio, con lo que conseguiríamos llevar a cabo la síntesis en un menor número de pasos. La ciclación se intentaría después de eliminar los grupos protectores. El paso más comprometido sería la deshidratación del intermedio **26** para dar **27**, ya que la ciclación entre C-7 y C-6' (**28**) o entre C-7 y C-2' (**29**) podría competir con la deshidratación, lo cual invalidaría por completo nuestro plan sintético.

No obstante, la extensión de la conjugación en el compuesto deshidratado (**27**), así como la existencia de un carbonilo que desactiva el anillo C para la sustitución electrofílica aromática, nos llevó a la conclusión de que la ciclación no deseada era improbable.

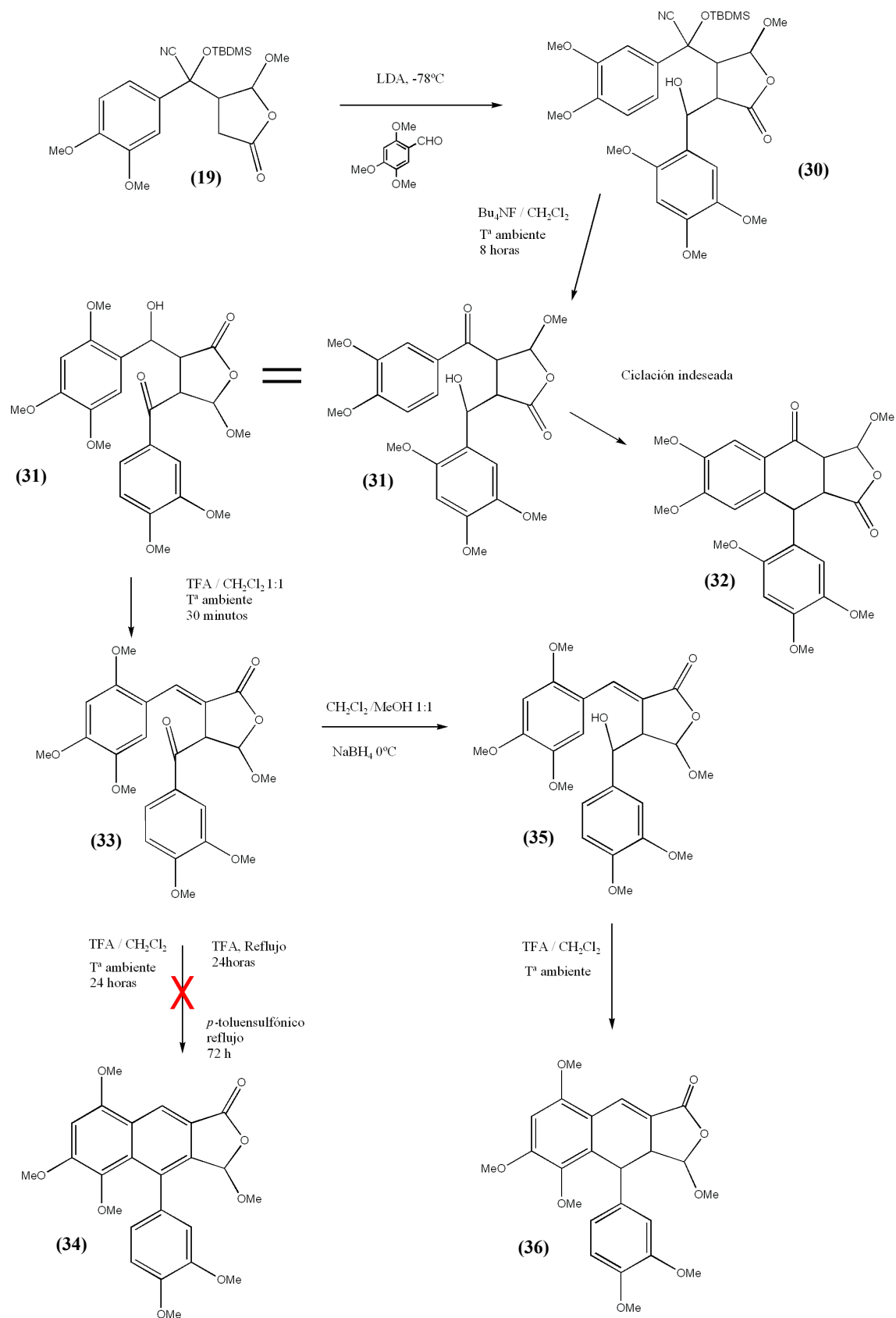
Una vez obtenido el intermedio **27**, éste se trataría con TFA, con el objeto de poderlo ciclar y aromatizar mediante el mecanismo mostrado en el Esquema 12.



Esquema 12. Mecanismo de ciclación de **27** por el que se esperaba la obtención de **6**

Con el objeto de comprobar la viabilidad de nuestra nueva estrategia sintética, se decidió hacer un experimento previo (Esq. 13) empleando el compuesto **19**, que había

sidio sintetizado para un experimento anterior (Esq. 9), esperando que el resultado fuera extrapolable a nuestros fines sintéticos.



Esquema 13. Experimento preliminar de la nueva estrategia

Como se muestra en el Esquema 13, la adición aldólica sobre el 2,4,5-trimetoxibenzaldehído del enolato resultante de tratar con LDA a -78°C el compuesto **19**, condujo a una mezcla compleja de isómeros (**30**) de peso molecular igual al esperado (617 uma). La desprotección de este compuesto con fluoruro de tetrabutilamonio condujo a otra mezcla de isómeros (**31**) con un peso molecular de 476 uma.

Al tratar el compuesto **31** con la mezcla $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{TFA}$ en la proporción 16:1 a temperatura ambiente y durante 30 minutos, se obtuvo un compuesto de peso molecular que coincidió con el esperado (458 uma) y fórmula $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{O}_9$, calculada mediante espectrometría de masas de alta resolución.

Su espectro de $^1\text{H-NMR}$ (Fig. 19) muestra 6 singuletes con integral para tres protones en cada caso a δ 3.28, 3.58, 3.76, 3.87, 3.90 y 3.98 y que corresponden a los 6 metoxilos que tiene el compuesto. También se observan dos dobletes que integran para un protón a δ 5.04 y 5.36 y que deben corresponder a los protones $\text{H-9}'$ y $\text{H-8}'$. Además, de acuerdo con lo esperado para el producto **33**, hay señales para 6 protones aromáticos: 4 singuletes a δ 6.42, 6.56, 7.56 y 8.17 y dos dobletes centrados a δ 6.95 y 7.75, con idéntica constante de acoplamiento ($J=8.5$ Hz) y que corresponden a los protones $\text{H-5}'$ y $\text{H-6}'$.

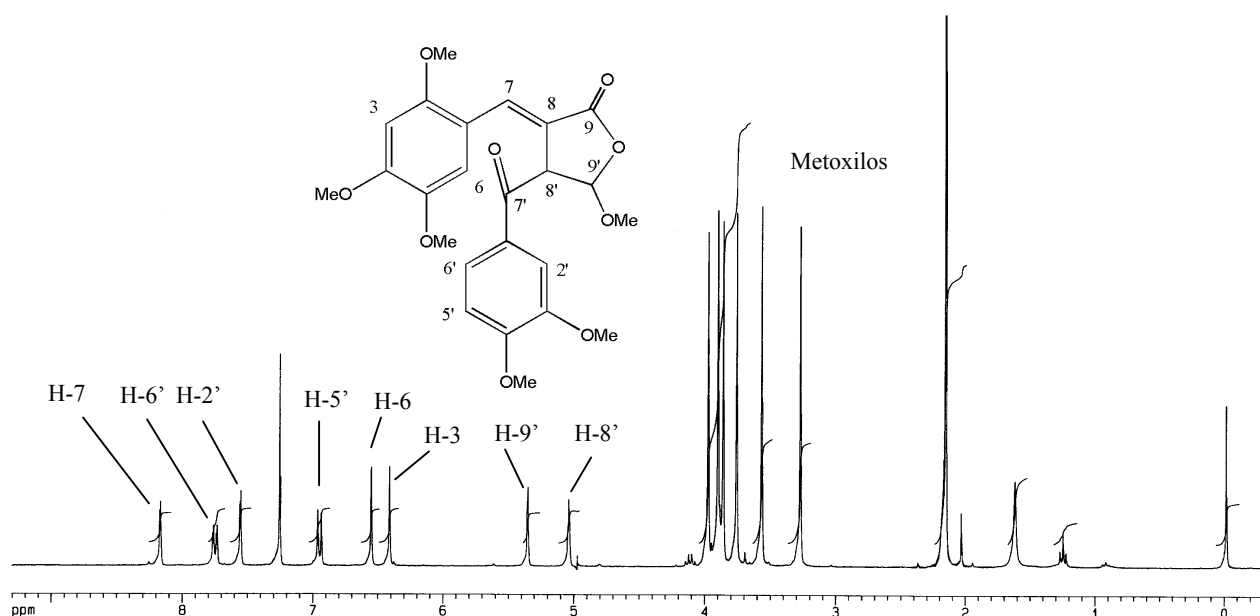


Figura 19. Espectro de $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) y estructura de **33**.

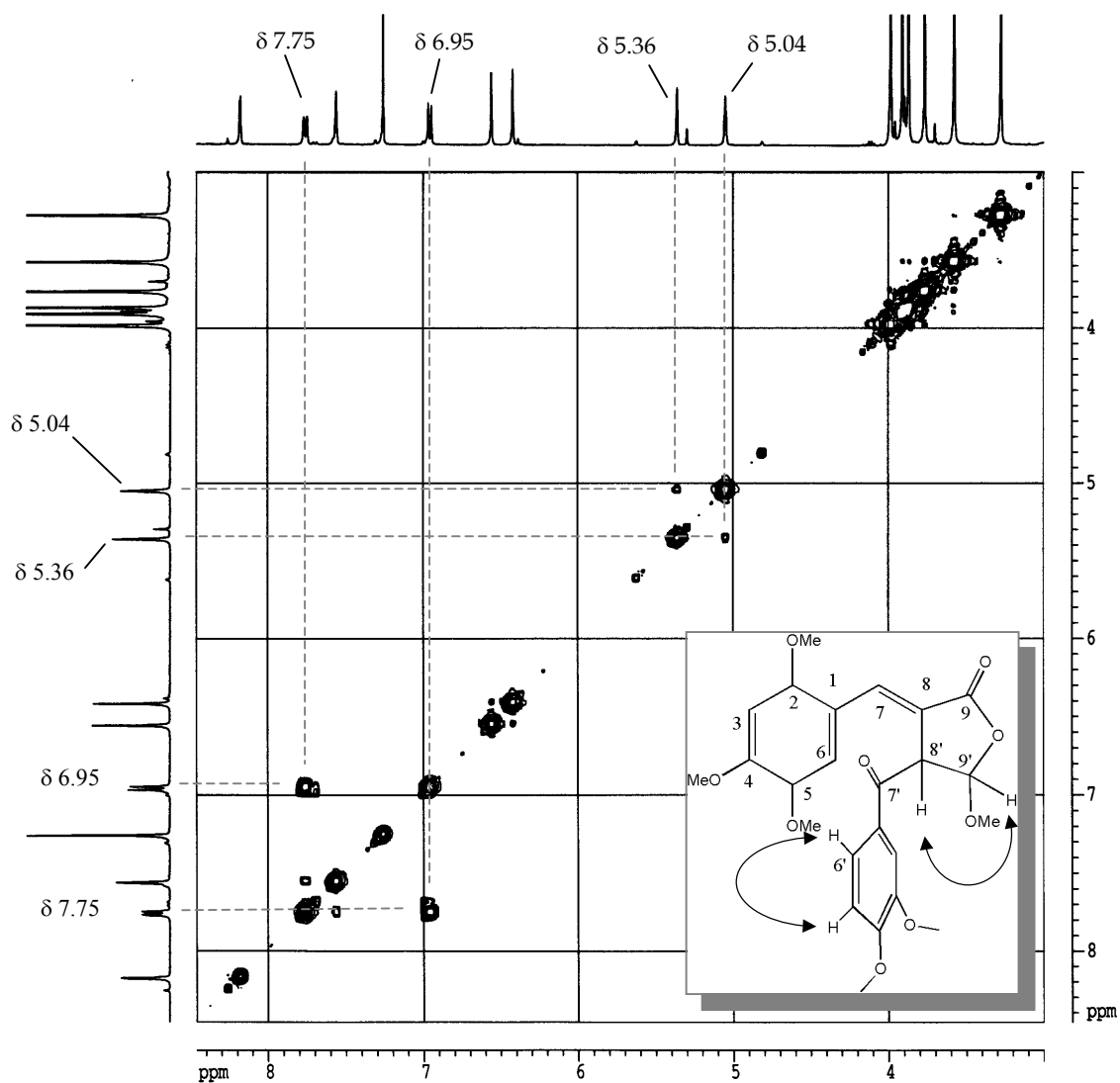


Figura 20. Experimento ^1H - ^1H COSY de 33

Mediante un experimento COSY (Fig. 20) se puede comprobar que los dobletes a δ 5.04 y 5.36 corresponden a los protones contiguos 8' y 9'. También se observa el acoplamiento entre los dos protones H-5' y H-6' del grupo veratrilo (dobletes a δ 6.95 y 7.75).

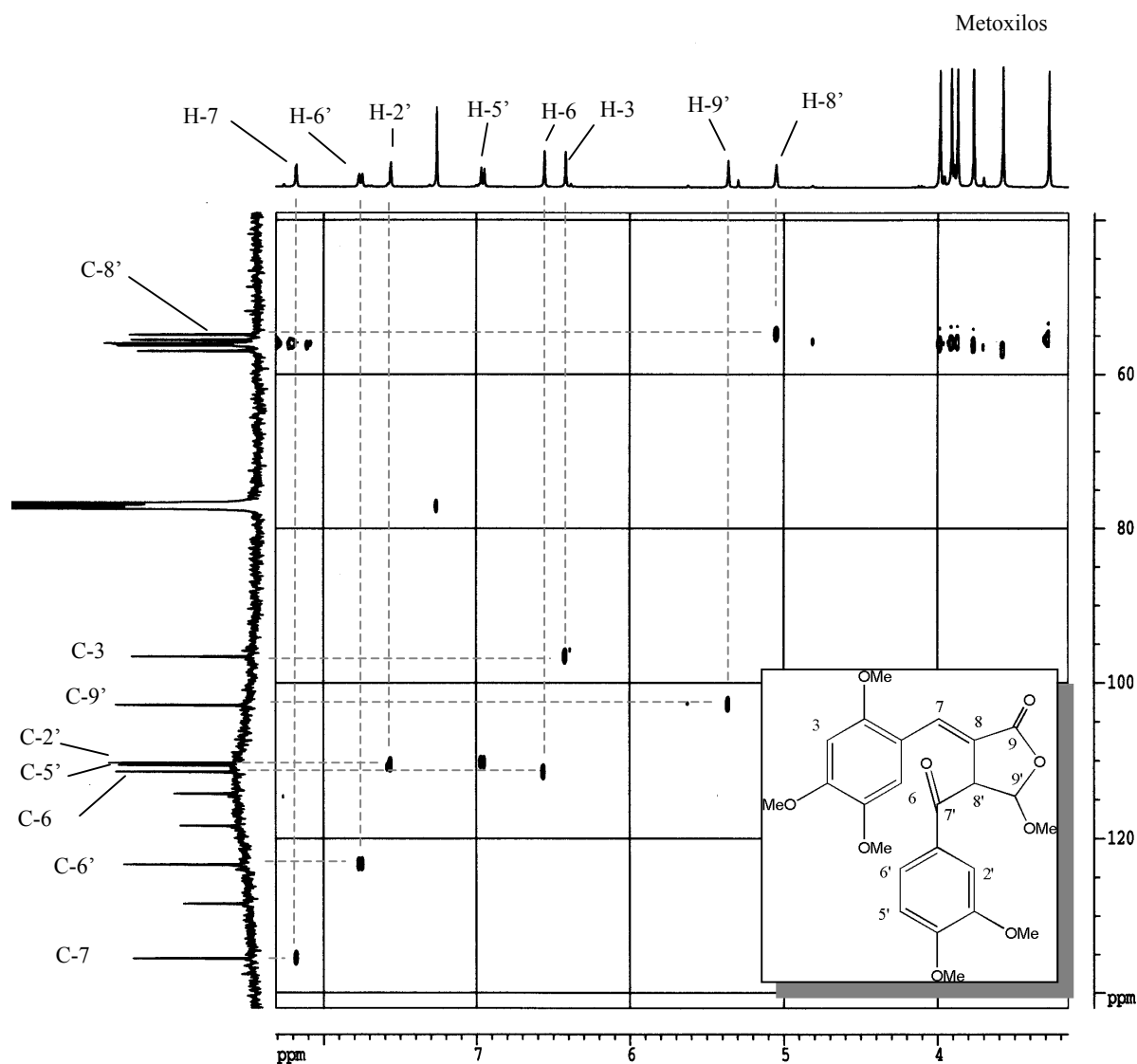


Figura 21. Experimento HSQC de 33

El experimento HSQC (Fig. 21) fue utilizado para asignar las señales de los 8 carbonos secundarios de la molécula: δ 54.90 (C-8'), 96.59 (C-3), 102.85 (C-9'), 110.28 (C-2'), 110.56 (C-5'), 114.45 (C-6), 123.39 (C-6'), 135.57 (C-7).

Las asignaciones restantes se llevaron a cabo mediante un experimento HMBC (Fig. 22), que además permitió establecer de modo inequívoco la correspondencia de los dobletes a δ 5.04 y 5.36 con los protones H-8' y H-9', respectivamente.

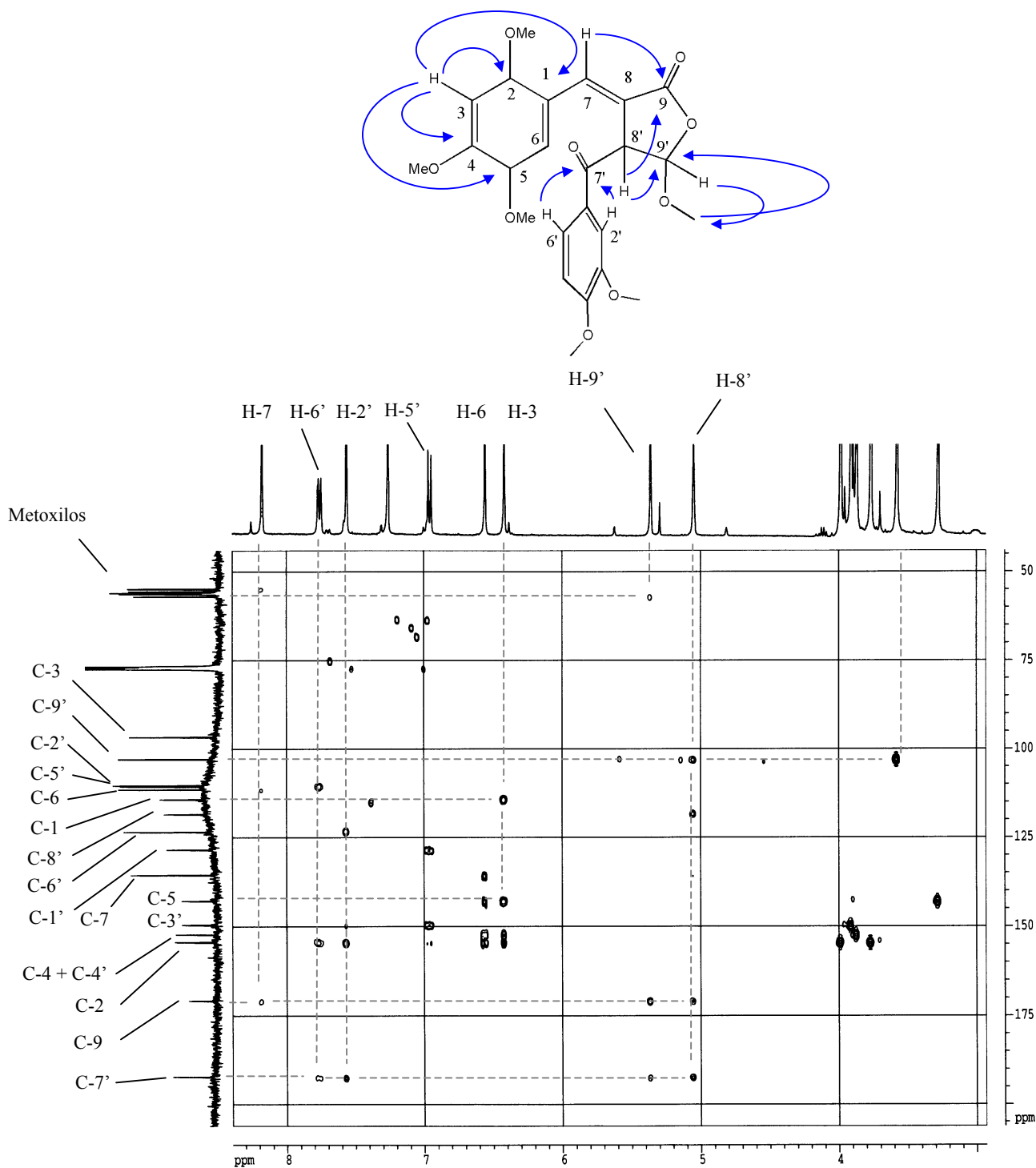


Figura 22. Experimento HMBC de 33

El experimento bidimensional ¹H-¹³C a larga distancia HMBC muestra una correlación a tres enlaces entre el doblete a δ 5.36 y los grupos metoxilo, por lo tanto, esta señal corresponde al protón acetálico (H-9'), mientras que el doblete a δ 5.04

corresponde a H-8'. Este último muestra una correlación a tres enlaces con C-9 y a dos enlaces con C-7' y C-9'.

No se detectó la presencia del producto **32** (Esq. 13) y además el rendimiento de la reacción de obtención de **33** fue del 92%, por lo tanto nuestra estrategia parecía correcta.

El intento de ciclar **33** con CH₂Cl₂/TFA (1:1) a temperatura ambiente durante 24 horas no condujo al producto esperado (**34**) (Esq. 13), recuperándose gran parte del producto de partida. Al forzar la reacción a reflujo en TFA durante 24 horas tampoco se obtuvo el producto ciclado, por tanto se optó por intentar reducir el compuesto **33** con el objeto de obtener el compuesto **35** que, por analogía con lo establecido en la bibliografía, debería ciclarse fácilmente.

De este modo al tratar **33** con borohidruro sódico se obtuvo un sólido de color amarillo (**35**), fluorescente en capa fina al ser irradiado con luz ultravioleta y de peso molecular 460 uma, igual al valor esperado. Su fórmula molecular determinada por HR-MS resultó ser C₂₄H₂₈O₉ y su espectro de ¹H-NMR (CDCl₃) (Fig. 23) muestra las siguientes señales: un singulete a δ 3.46 que integra para tres protones que atribuimos a un grupo metoxilo, estando las señales de los otros cinco metoxilos a δ 3.79 (3H), 3.81 (3H), 3.87 (6H) y 3.94 (3H) y superpuestas a la señal del protón H-8'. El doblete centrado a δ 4.96 que integra para un protón debe corresponder al protón geminal al grupo hidroxilo, mientras que el singulete a δ 5.32 corresponde al protón acetálico. En la zona aromática se observan señales para cinco protones que aparecen como un singulete a δ 6.48 (1H), un multiplete entre δ 6.71 y 6.82 que integra para tres protones y dos singuletes con integral para un protón cada uno a δ 7.29 y 8.06.

El espectro de ¹³C-NMR de **35** (Fig. 24) muestra señales para nueve carbonos cuaternarios (δ 114.3, 120.7, 133.5, 142.8, 148.8, 148.8, 152.1, 154.3 y 171.6), nueve terciarios (δ 52.3, 72.5, 96.4, 103.4, 109.4, 110.8, 111.8, 118.2 y 134.7) y para los grupos metoxilo entre δ 55.7 y 56.6. Estos datos están de acuerdo con la estructura del compuesto **35**.

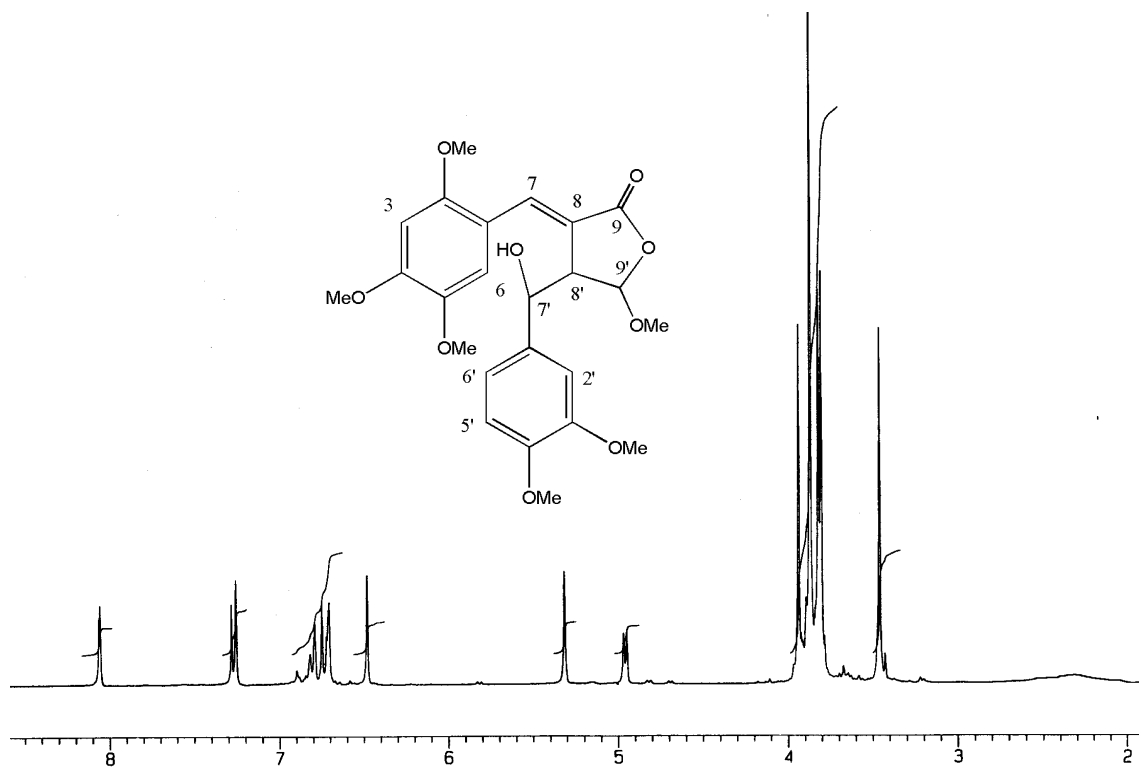


Figura 23. Espectro de ¹H-NMR (CDCl₃) y estructura de 35

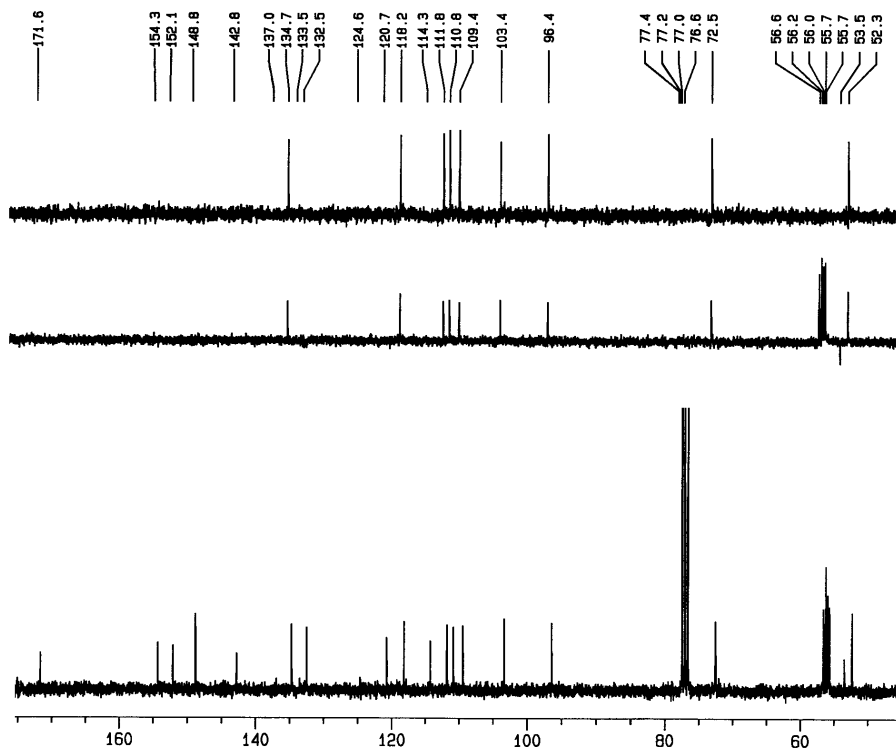


Figura 24. Espectro de ¹³C-NMR (CDCl₃) de 35

Al mantener el compuesto **35** en la mezcla $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{TFA}$ 1:1 a temperatura ambiente con agitación durante 24 horas se obtuvo un producto cuyo peso molecular coincidió con el valor esperado (442 uma). Su fórmula molecular, determinada por espectrometría de masas de alta resolución, resultó ser $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{O}_8$. Por otra parte, el espectro de $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) (Fig. 25) muestra tres singuletes a δ 3.56, 3.77 y 3.79 con integral para tres protones cada uno y otro singulete con integral para nueve protones a δ 3.90. Estas señales las atribuimos a los seis grupos metoxilo. A δ 5.06 aparece un singulete con integral para un protón y que debe corresponder a uno de los dos protones no aromáticos que tiene el compuesto esperado, estando el otro protón a δ 3.84 entre las señales de los grupos metoxilo. A δ 6.40 y 8.37 hay dos singuletes que integran para un protón cada uno. El primero de ellos corresponde al único protón aromático del anillo A (H-3), mientras que el que presenta un desplazamiento de δ 8.37 corresponde al protón en posición bencílica (H-7). Correspondiendo al anillo de veratrilo, se observan dos dobletes centrados a δ 6.46 y 6.66 y un singulete a δ 6.70 integrando cada uno de ellos para un protón. La señal localizada a campos más bajos (δ 9.55) tiene el desplazamiento típico de un grupo carbonilo, por lo tanto pensamos que había ocurrido una reacción de transesterificación. Esta hipótesis está apoyada por el espectro de $^{13}\text{C-NMR}$ (Fig. 26) que muestra una señal con el desplazamiento típico de un aldehído (δ 199.1). Admitiendo esto último, la estructura del compuesto obtenido no sería la esperada (**36**, Esq. 13) sino la de **37** (Fig. 25).

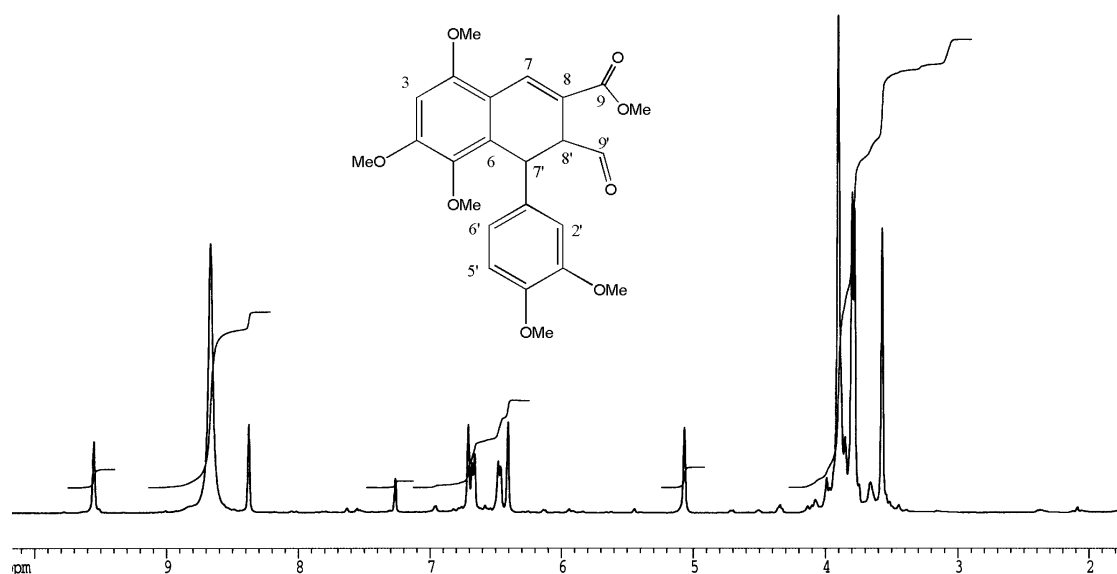


Figura 25. Espectro de $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3), 400 MHz de **37**

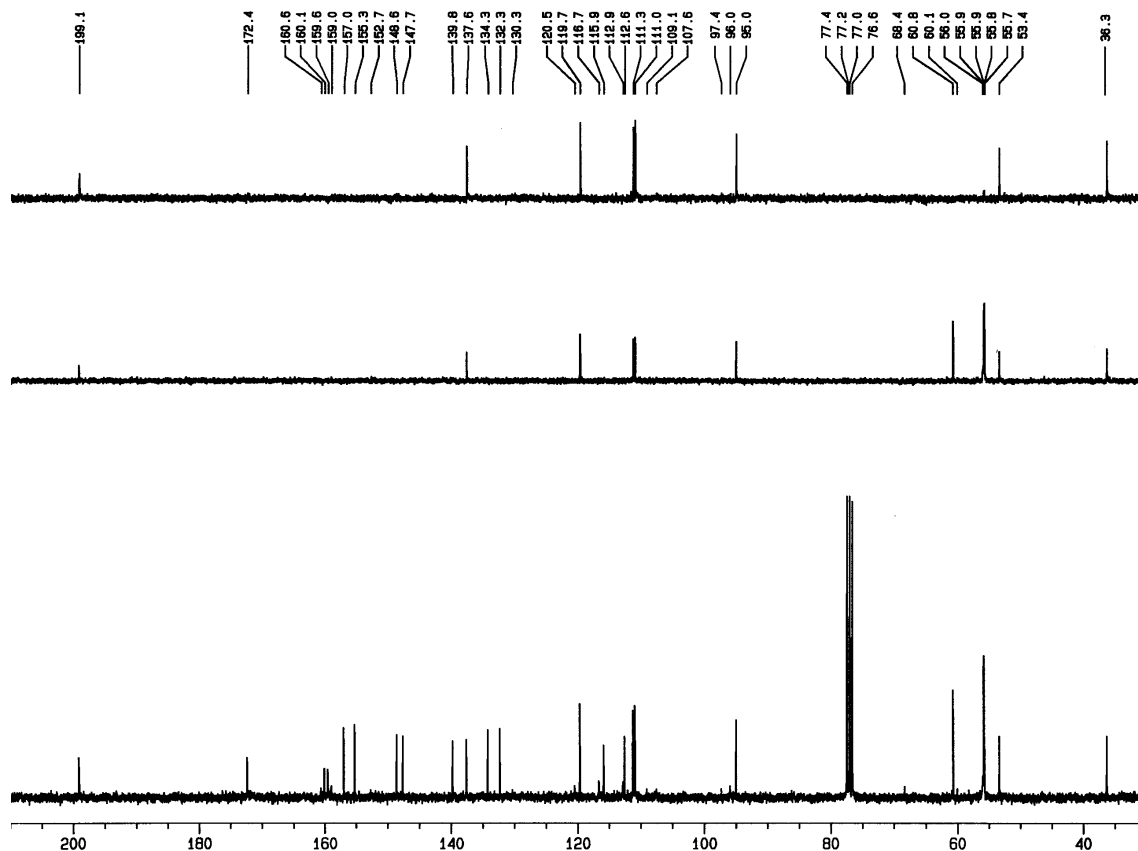


Figura 26. Espectro de ^{13}C -NMR (CDCl_3) de **37**

El espectro de ^{13}C -NMR (Fig. 26) muestra señales para 10 carbonos cuaternarios, 8 terciarios y 6 primarios, lo cual está de acuerdo con la estructura que se ha propuesto para el compuesto **37**.

Por otra parte, los experimentos bidimensionales de correlación heteronuclear ^1H - ^{13}C HSQC (Fig. 27) y HMBC (Fig. 28) permitieron llevar a cabo las asignaciones del espectro de carbono.

Además el experimento HMBC sirvió para comprobar de modo inequívoco que el compuesto **37** está ciclado ya que se pueden observar las correlaciones entre H-7' y C-6, y entre H-8' y C-6, que sólo son posibles si ha ocurrido la ciclación entre C-7' y C-6.

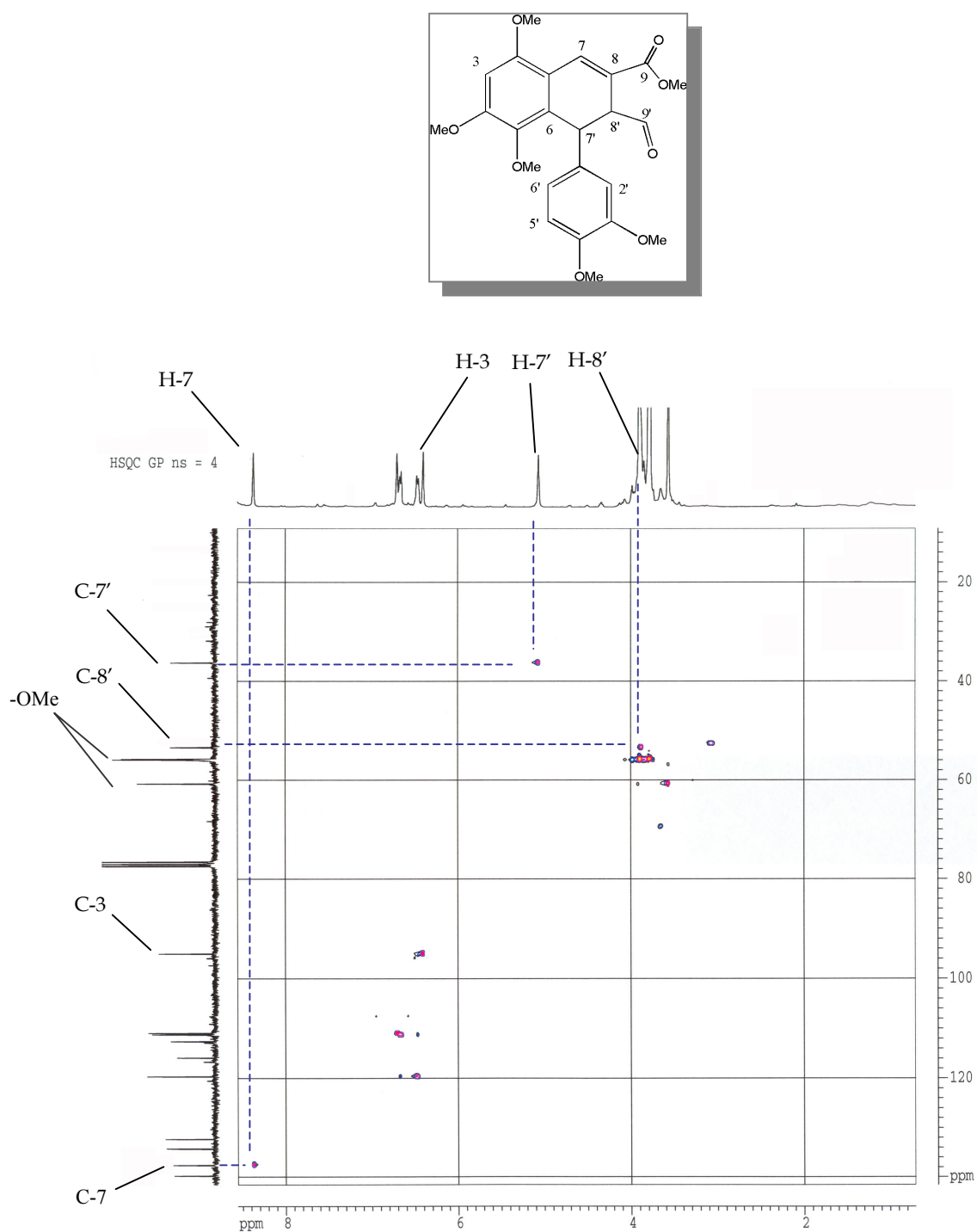


Figura 27. Experimento HSQC de 37

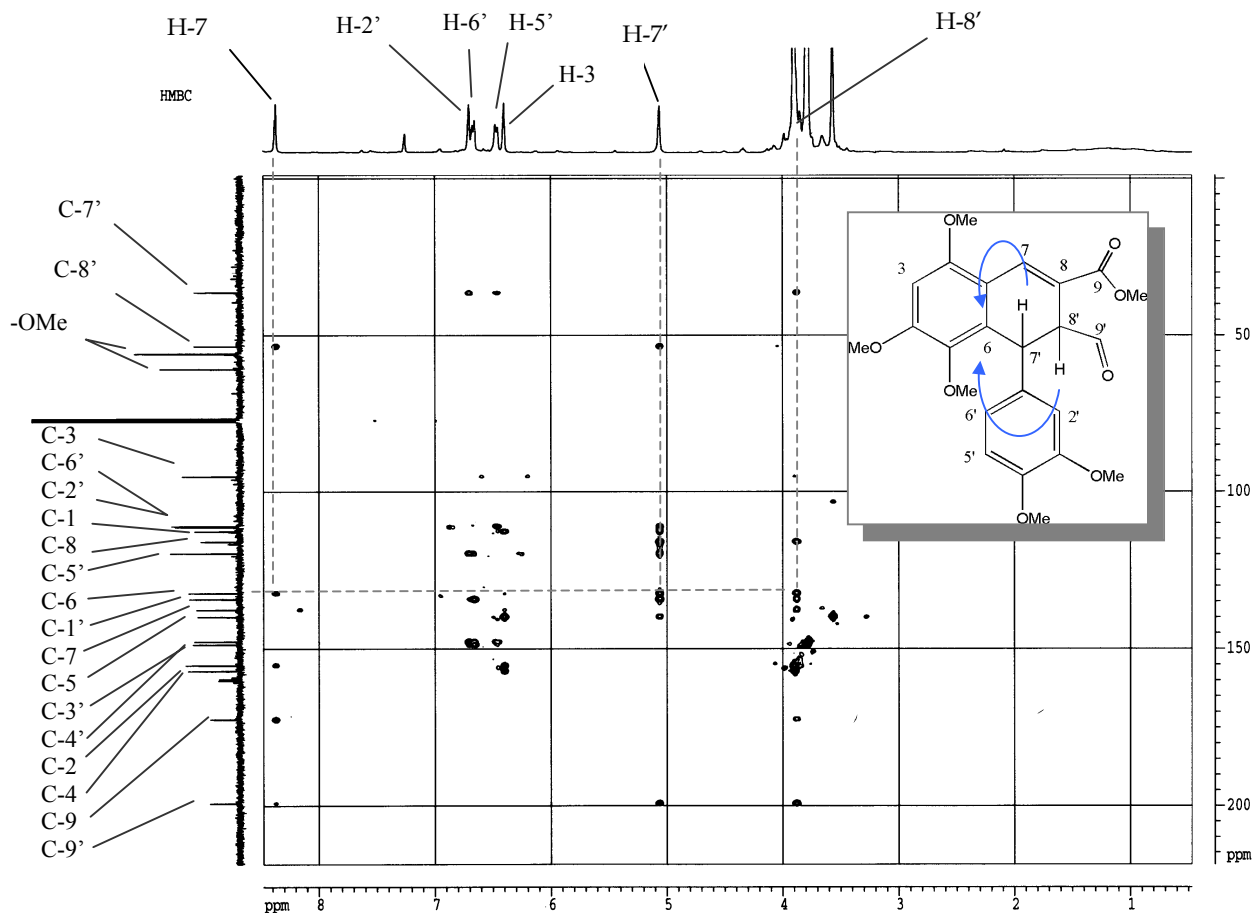
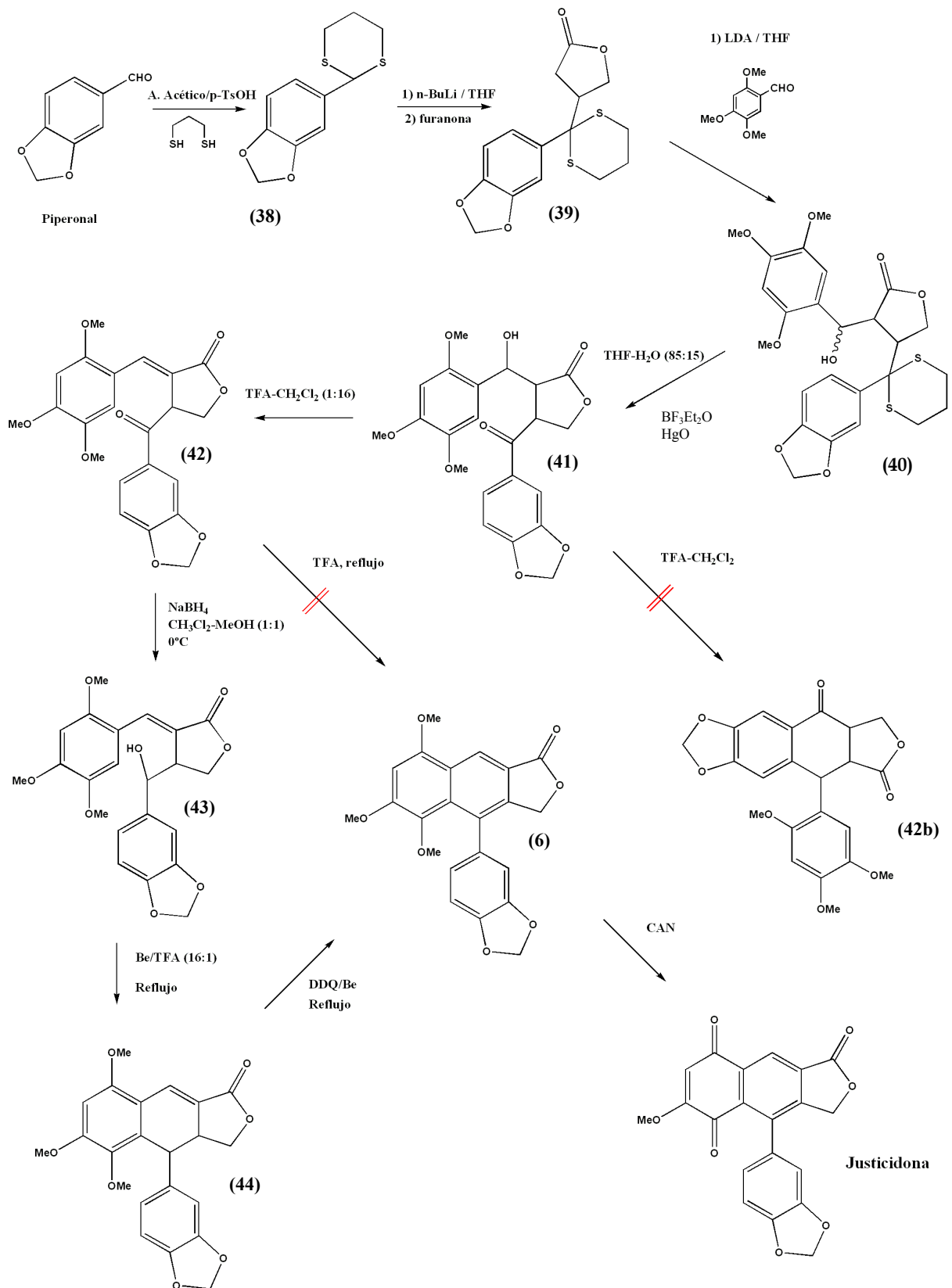


Figura 28. Experimento HMBC de 37

Partiendo de la hipótesis de que los resultados obtenidos en la síntesis de **37** podrían ser reproducidos para la justicidona, planteamos la estrategia sintética mostrada en el Esquema 14. Dado que nuestro plan sintético ya no implicaba la ciclación y aromatización en un solo paso, decidimos cambiar la cianhidrina por un derivado 1,3-ditiano que era más resistente, económico y fácil de preparar.

Como se muestra en el Esquema 14 y al igual que vimos para la síntesis de **37**, existía la posibilidad de una ciclación no deseada que competiría con la deshidratación. Por otra parte se intentaría la ciclación a partir del compuesto **42**, pero si ésta no ocurría como era previsible, el compuesto **42** sería reducido a **43** que luego sería ciclado y aromatizado para dar **6** que por oxidación debería dar justicidona.



Esquema 14. Estrategia sintética para la justicidona

Al tratar el piperonal con 1,3-propanoditiol en presencia de ácido *p*-toluensulfónico monohidratado se obtuvo un sólido cristalino (38) de peso molecular 240 uma, fórmula $C_{11}H_{12}O_2S_2$ (HR-MS) y cuyos espectros de 1H -NMR (Fig. 29) y ^{13}C -NMR (Fig. 30) muestran las señales características del compuesto.

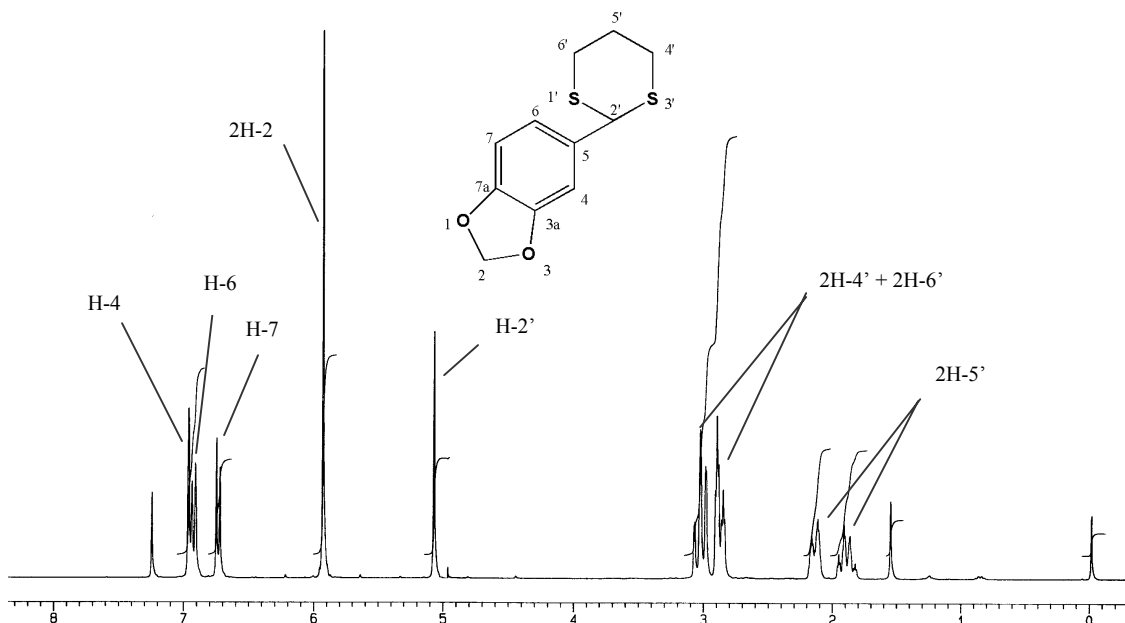


Figura 29. Espectro de 1H -NMR y estructura del compuesto 38

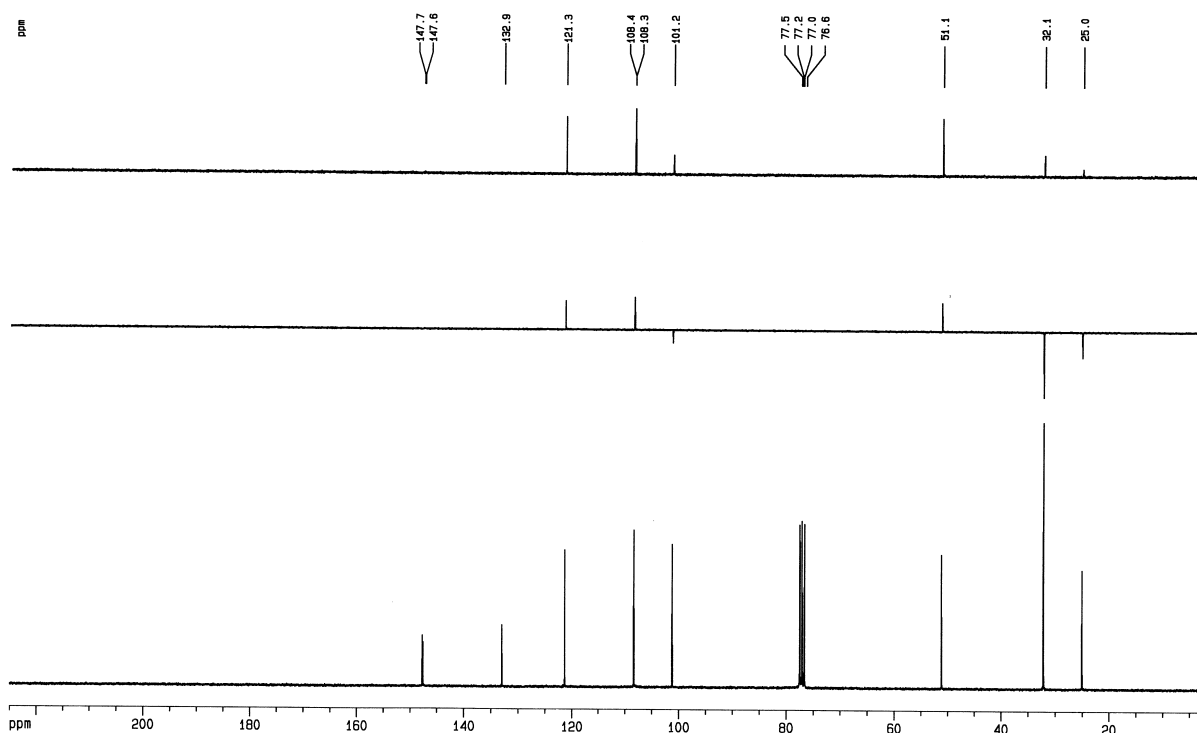


Figura 30. Espectro de ^{13}C -NMR del compuesto 38

La adición de Michael sobre la 2-furanona del carbanión generado al tratar **38** con *n*-BuLi en tetrahidrofurano (THF) a -78°C , dio lugar a un sólido de débil color amarillo, de peso molecular 324 uma y de fórmula $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_4\text{S}_2$. El espectro de $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) (Fig. 31) muestra las señales propias del producto esperado.

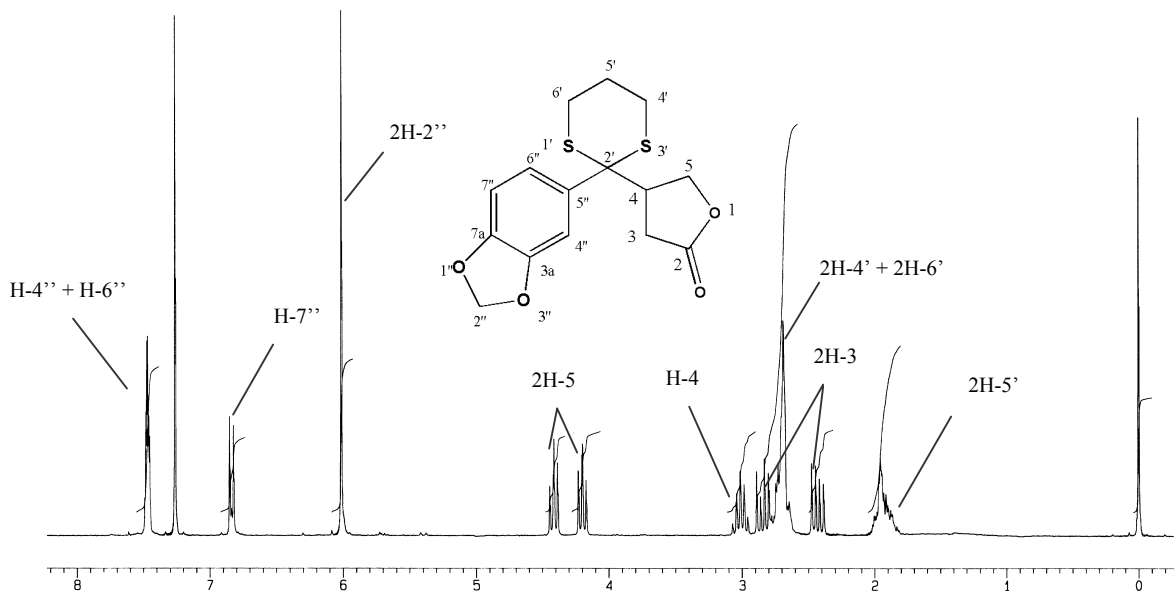


Figura 31. Espectro de $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) del compuesto **39**

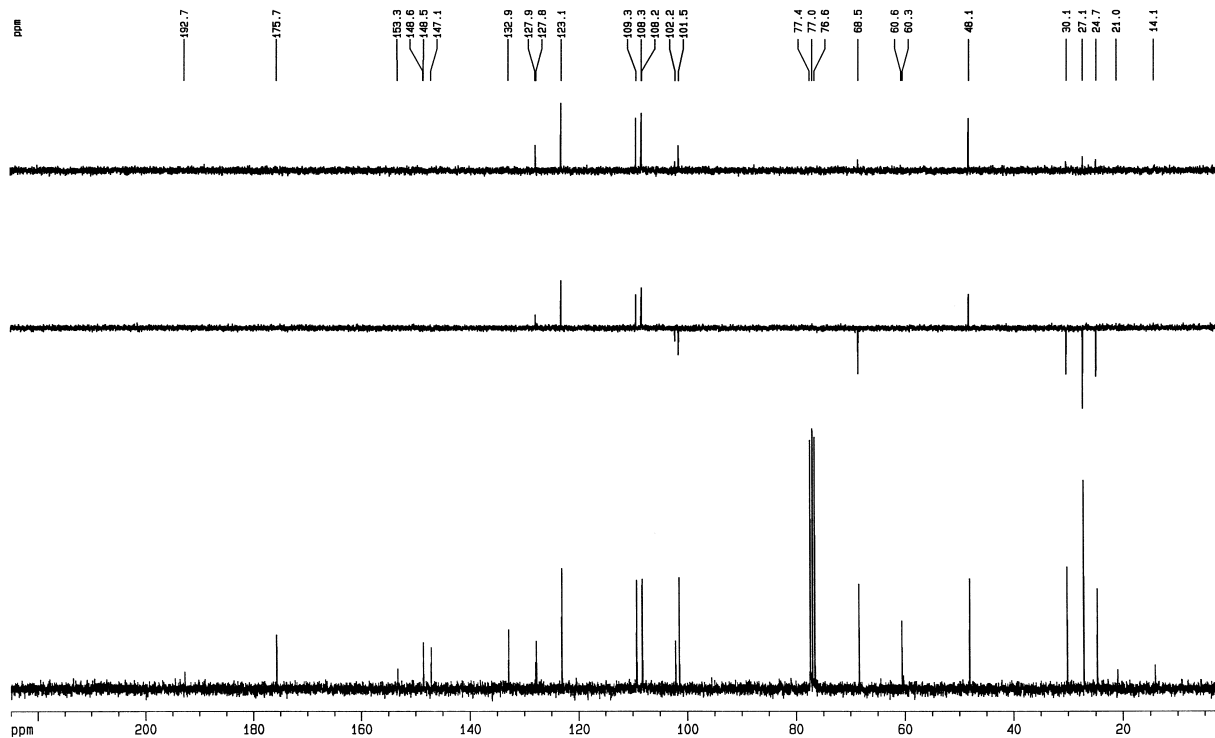


Figura 32. $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) del compuesto **39**

La adición aldólica sobre el 2,4,5-trimetoxibenzaldehído del enolato formado al tratar **39** con diisopropilamido de litio (LDA) en THF a -78°C , rindió una mezcla de diasterómeros del compuesto **40**. Esta mezcla fue separada por HPLC obteniéndose los diasterómeros **40a** y **40b** cuyos espectros de $^1\text{H-NMR}$ se muestran en las Figuras 33 y 34 respectivamente. La espectrometría de masas revela que ambos compuestos tienen un peso molecular de 520 uma y una fórmula de $\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{O}_8\text{S}_2$, datos que concuerdan con los valores esperados.

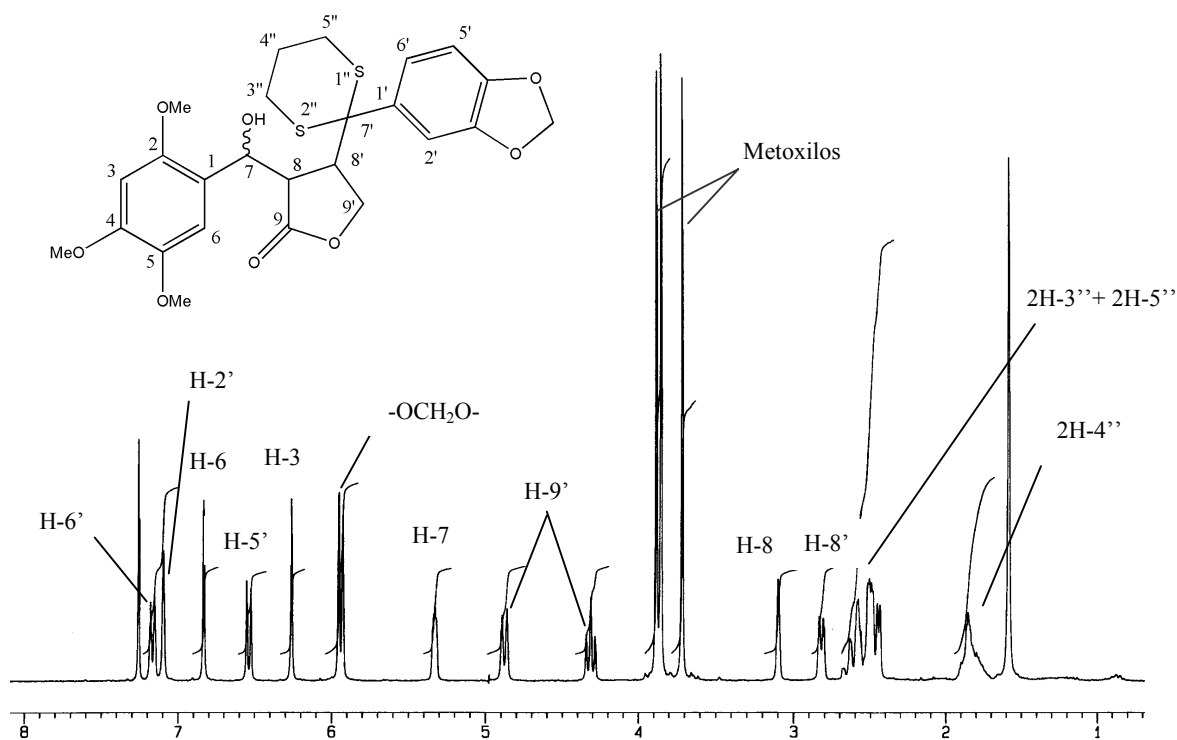


Figura 33. Espectro de $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) y estructura de **40a**

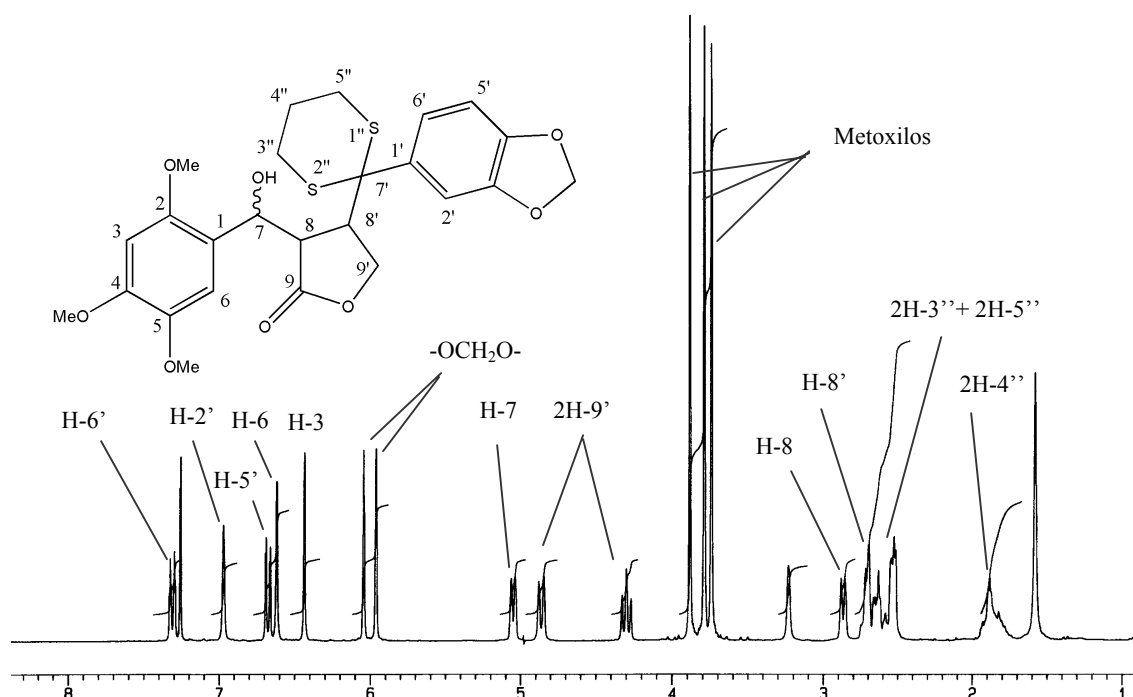


Figura 34. Espectro de $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) y estructura de **40b**

El tratamiento de la mezcla diastereomérica anterior con $\text{HgO}/\text{BF}_3\text{Et}_2\text{O}$ dio lugar a otra mezcla de isómeros del compuesto **41**, que fue separada por HPLC, obteniéndose los compuestos **41a** y **41b**. El espectro de masas de alta resolución de **41a** presenta un ión molecular $[\text{M}]^+$ m/z 430.124199 que corresponde a una fórmula $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_9$, que requiere 430.126383. El espectro de $^1\text{H-NMR}$ (Fig. 35) muestra las siguientes señales: a δ 2.68 como doblete aparece la señal correspondiente al grupo hidroxilo sobre C-7, a δ 3.63, 3.75 y 3.80 se observan tres singuletes que integran cada uno para tres protones y que corresponden a los tres grupos metoxilo, a δ 3.92 hay un doble doblete que integra para un protón y que asignamos a H-8, dos tripletes centrados a δ 4.12 y 4.51 que integran para un protón en cada caso y que corresponden a los dos protones del metileno lactónico (H-9'a y H-9'b), un cuadruplete a δ 4.40 (1H) que atribuimos a H-8', un singulete ancho a δ 5.56 que corresponde al protón geminal al grupo hidroxilo (H-7), un singulete a δ 6.03 que integra para dos protones y que se debe al grupo metilendioxi. En la zona aromática se observan, a δ 6.34 y 6.90, los dos singuletes que corresponden a los protones H-3 y H-6, respectivamente.

Las señales del grupo piperonilo aparecen a δ 6.75 como doblete (H-5'), a δ 7.04 como singlete (H-2') y a δ 7.20 como doblete (H-6').

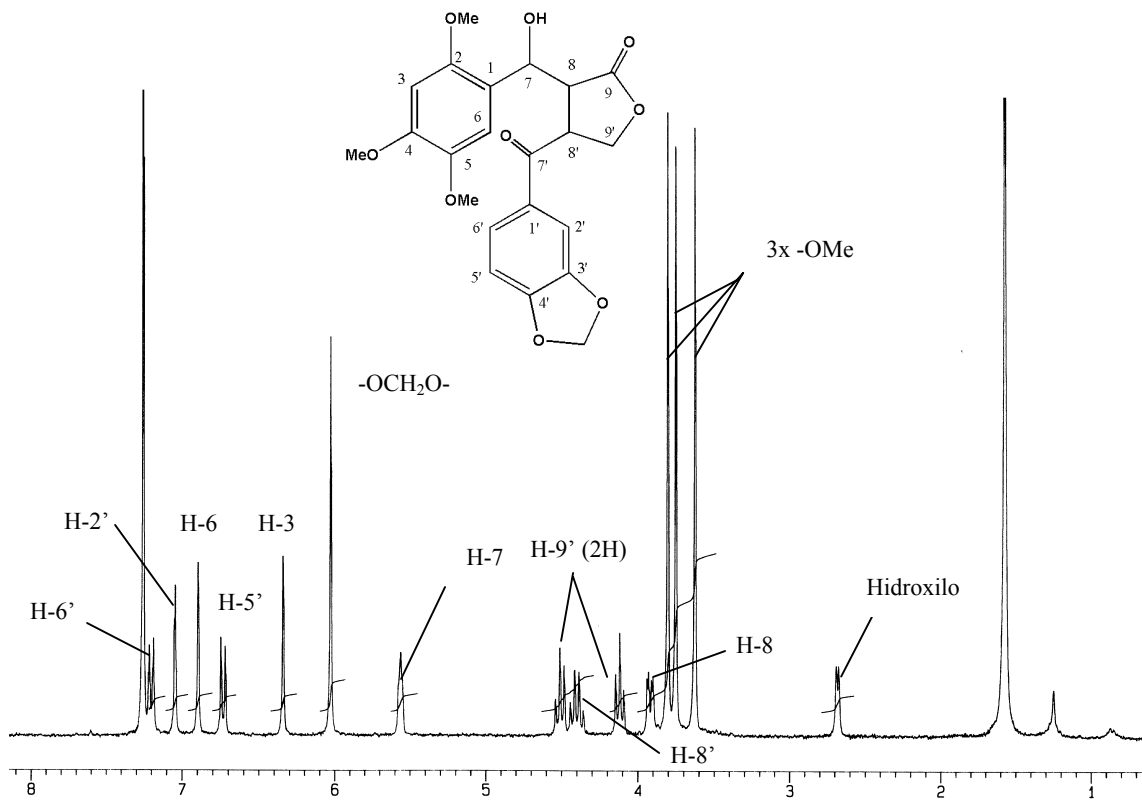


Figura 35. Espectro de ¹H-NMR (CDCl₃) y estructura de 41a

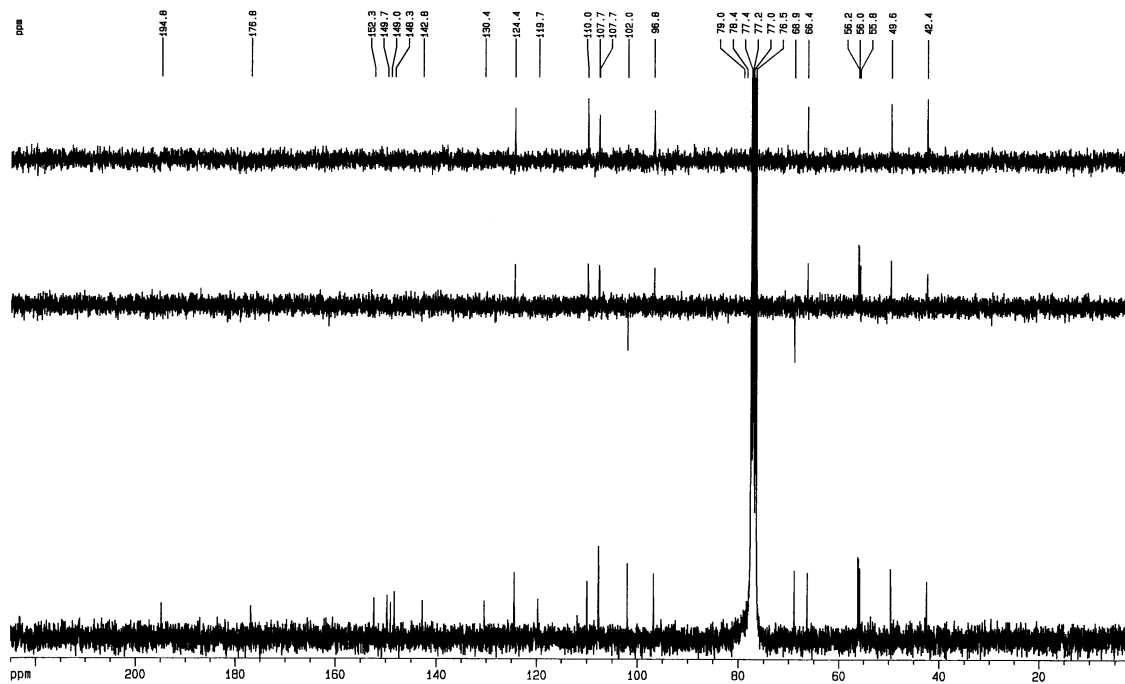


Figura 36. Espectro de ¹³C-NMR (CDCl₃) de 41a

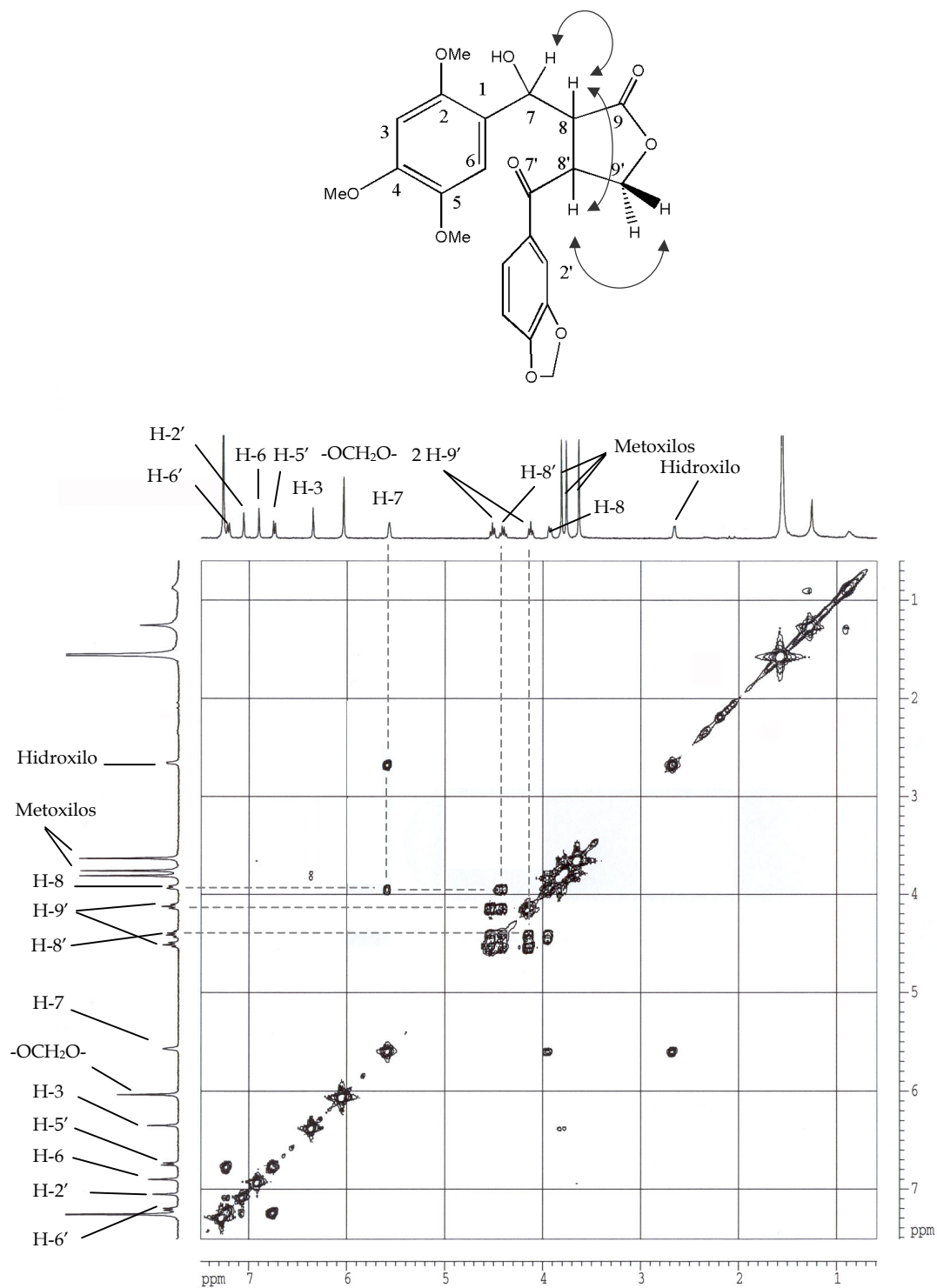


Figura 37. Experimento COSY de 41a

El experimento COSY (Fig. 37) permitió asignar las señales correspondientes a los protones H-7, H-8, H-8' y H-9'. Así pues, se observan acoplamientos entre H-8 y H-7, entre H-8 y H-8' y entre este último y uno de los protones del metileno lactónico (C-9').

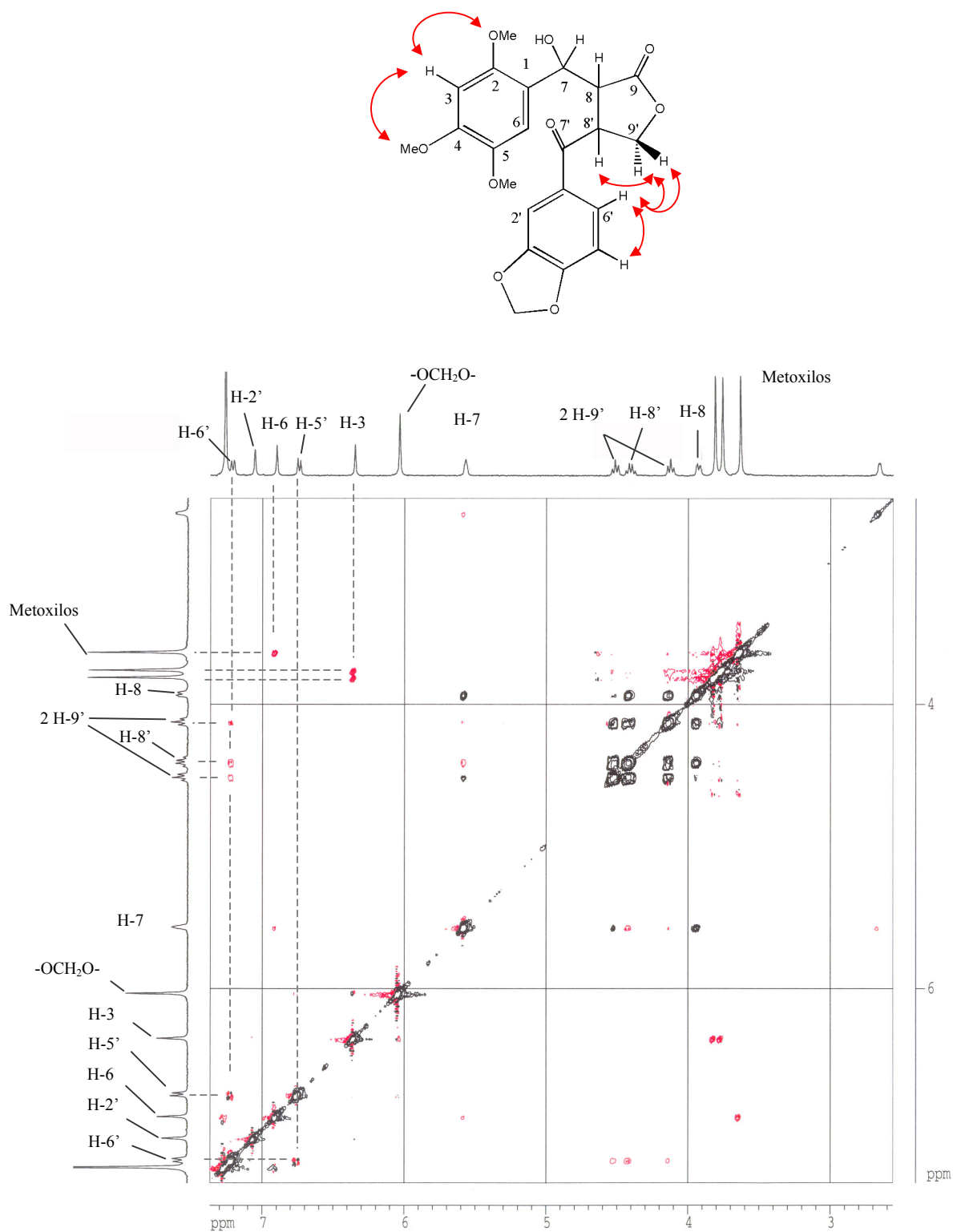


Figura 38. Experimento ROESY de 41a

En el experimento ROESY se puede observar efecto NOE entre H-3 y los grupos metoxilo sobre C-2 y C-4 y entre H-6 y el metoxilo sobre C-5, así como entre los dos protones del metileno lactónico (H-9'a y H-9'b) y los protones 6' y 8'.

El espectro de masas de alta resolución de **41b** presenta un ión molecular $[M]^+$ m/z 430.123238 que corresponde a una fórmula $C_{22}H_{22}O_9$, cuya masa calculada es 430.126383. Las señales del espectro de 1H -NMR (Fig. 39) se asignaron mediante espectroscopía bidimensional, observándose a δ 3.59 un triplete que integra para un protón y que corresponde a H-8, a δ 3.71, 3.75 y 3.81 tres singuletes integrando cada uno para tres protones y que corresponden a los grupos metoxilo. Entre δ 4.10 y 4.25 hay un multiplete que integra para dos protones, uno de los cuales es H-8', siendo el otro uno de los protones del metileno lactónico (C-9'). La señal del otro protón de C-9' se observa a δ 4.48 como triplete. Centrado a δ 5.32 (1H) hay un doblete que corresponde al protón geminal al hidroxilo (H-7). El singulete a δ 6.03 (2H) corresponde al grupo metilendioxi. Finalmente en la zona aromática se observan tres singuletes con integral para un protón en cada caso a δ 6.07 (H-3), 6.86 (H-6) y 7.05 (H-2') y dos dobletes centrados a δ 6.75 (1H, H-5') y 7.16 (1H, H-6').

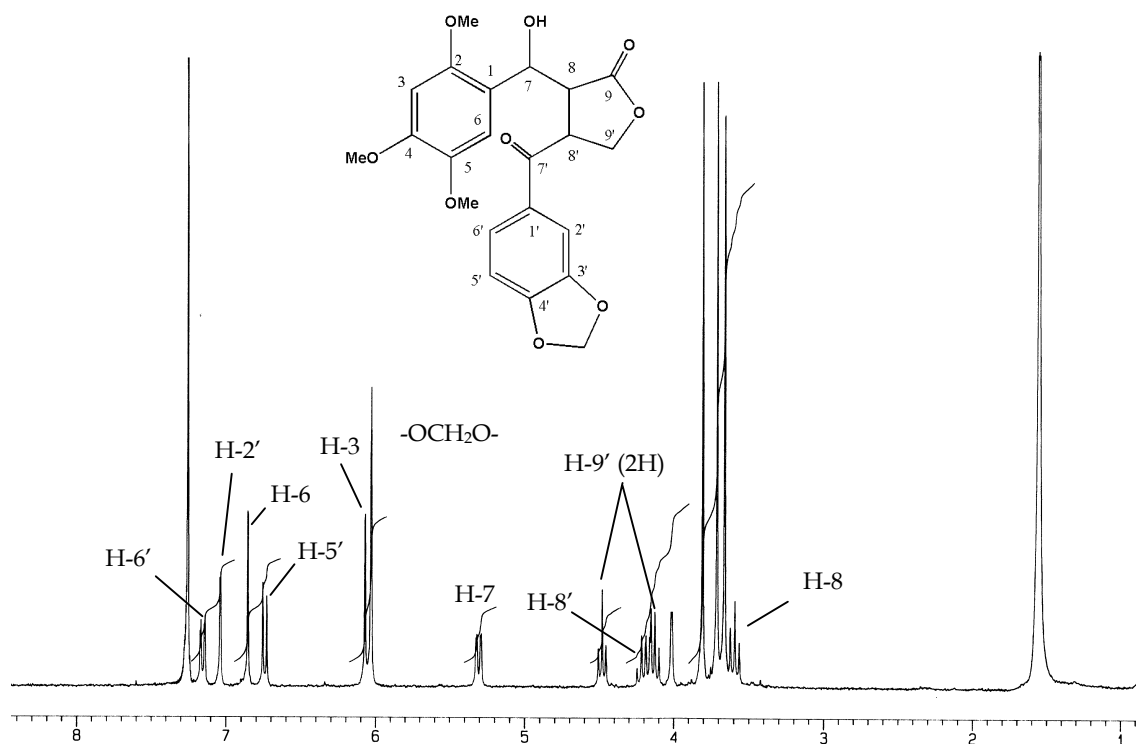


Figura 39. Espectro de 1H -NMR ($CDCl_3$) de **41b**

Mediante tratamiento de la mezcla diastereomérica de **41** con TFA en diclorometano en la proporción 1:16 se obtuvo, con excelente rendimiento, un compuesto fluorescente a la luz ultravioleta de fórmula $C_{22}H_{20}O_8$ (18 una menos que el compuesto anterior) y cuyos datos espectroscópicos coincidieron con los valores esperados para el compuesto **42**. No se detectó la formación del compuesto **42b** (Esq. 14).

El espectro de 1H -NMR de **42** (Fig. 40) muestra las siguientes señales: tres singletes integrando cada uno para tres protones y correspondientes a los tres grupos metoxilo a δ 3.42, 3.80 y 3.88, un doble doblete centrado a δ 4.32 y un triplete centrado a δ 4.68 que corresponden a los dos protones del metileno lactónico, un multiplete entre δ 5.05 y 5.10 que corresponde a H-8', un singlete a δ 6.07 (2H) que corresponde al grupo metilendioxi, dos singletes a δ 6.43 y 6.62 que corresponden a H-3 y H-6 respectivamente, dos dobletes centrados a δ 6.88 (H-5') y 7.38 (H-2'), un doble doblete centrado a δ 7.49 (H-6') y un doblete a δ 8.10 (H-7).

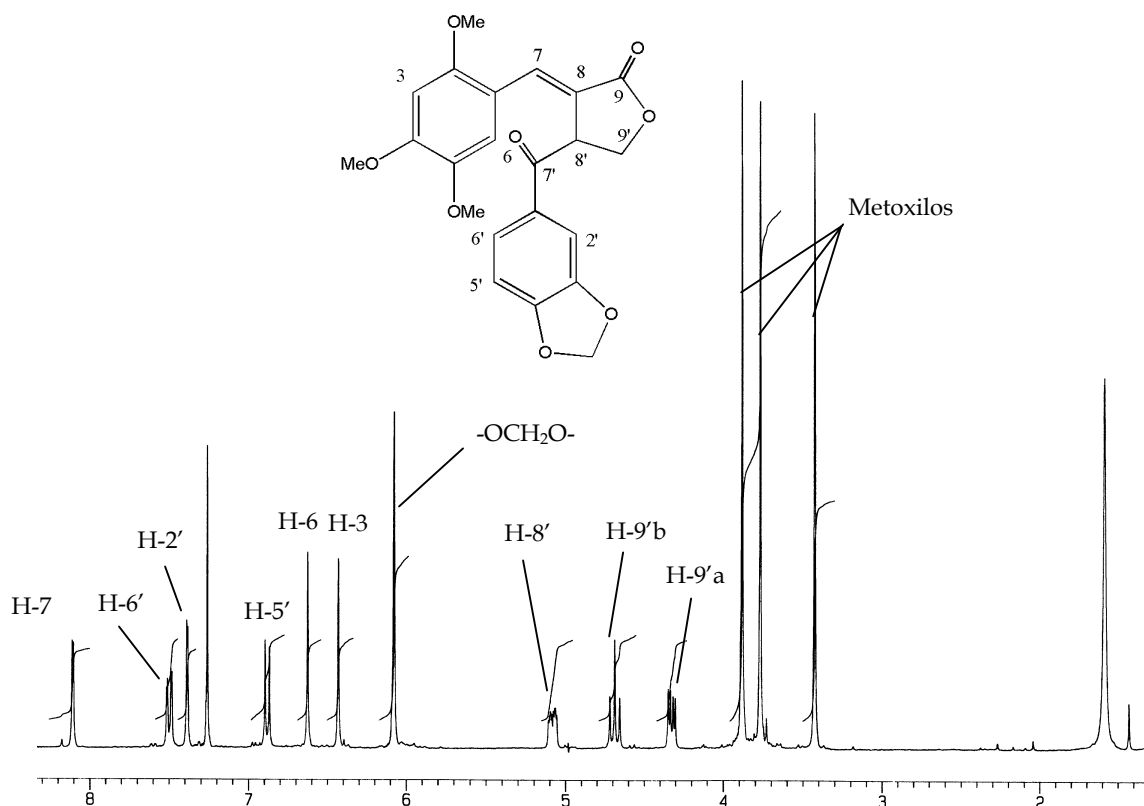


Figura 40. Espectro de 1H -NMR ($CDCl_3$) de **42**

El espectro de ^{13}C -NMR (Fig. 41) y los experimentos DEPT 90 y 135 corroboran la estructura del compuesto **42**, ya que se observan señales para 10 carbonos cuaternarios de los cuales dos son carbonilos, el de la lactona (C-9) a δ 171.9 y el de C-7' a δ 193.7. Los otros singuletes se observan a δ 154.1, 152.6, 152.1, 148.8, 142.9, 135.2, 130.5, 129.8, 124.7, 119.7, 114.4, 111.9, 108.2, 108.2, 102.2 y 96.8. Las señales de los 7 carbonos terciarios se observan a δ 135.2, 124.7, 111.9, 108.2, 108.2, 96.8 y 47.4 y las de los 2 metilenos a δ 102.2 (grupo metilendioxi) y 67.5 (metileno lactónico). Finalmente hay 3 señales para los metoxilos a δ 56.3, 56.0 y 55.8.

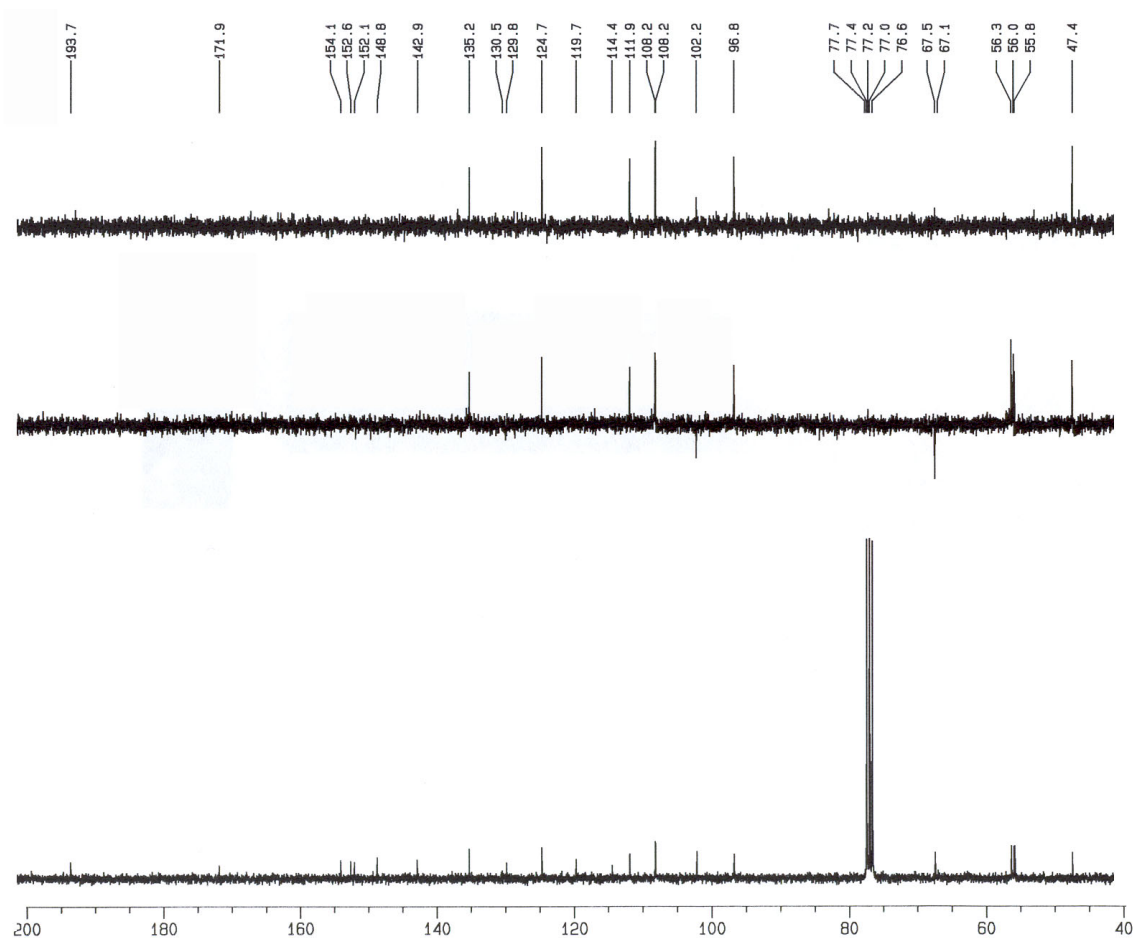


Figura 41. Espectro de ^{13}C -NMR (CDCl_3) de **42**

Como era de esperar, atendiendo a los resultados del intento de ciclación del compuesto **33** (Esq. 13), la ciclación de **42** fracasó, incluso empleando condiciones severas (TFA, reflujo, 24 h), no detectándose la presencia del compuesto **6** (Esq. 14) y recuperándose parte del producto de partida. Por lo tanto, decidimos reducir el

compuesto **42** con NaBH_4 . Se obtuvo de este modo, con un rendimiento cuantitativo, un sólido de color amarillo (**43**) de peso molecular 414 uma y fórmula $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_8$.

El espectro de $^1\text{H-NMR}$ (Fig. 42) muestra un multiplete a δ 3.84 que corresponde a $\text{H-8}'$, tres singuletes a δ 3.91, 3.93 y 3.96 que integran cada uno para tres protones y que corresponden a tres grupos metoxilo, un triplete a δ 4.20 y un doblete a δ 4.36 que corresponden a los protones del metileno lactónico ($\text{H-9}'\text{a}$ y $\text{H-9}'\text{b}$) y un doblete centrado a δ 4.88 que se debe al protón geminal al grupo hidroxilo ($\text{H-7}'$). El singulete con integral para dos protones a δ 5.93 fue asignado al grupo metilendioxi y los singuletes localizados a δ 6.52, 6.76, 7.44 y 8.05 a los protones H-3 , $\text{H-5}'$, H-6 y H-7 respectivamente. El singulete a δ 6.71 (2H) se debe a los protones aromáticos $\text{H-2}'$ y $\text{H-6}'$.

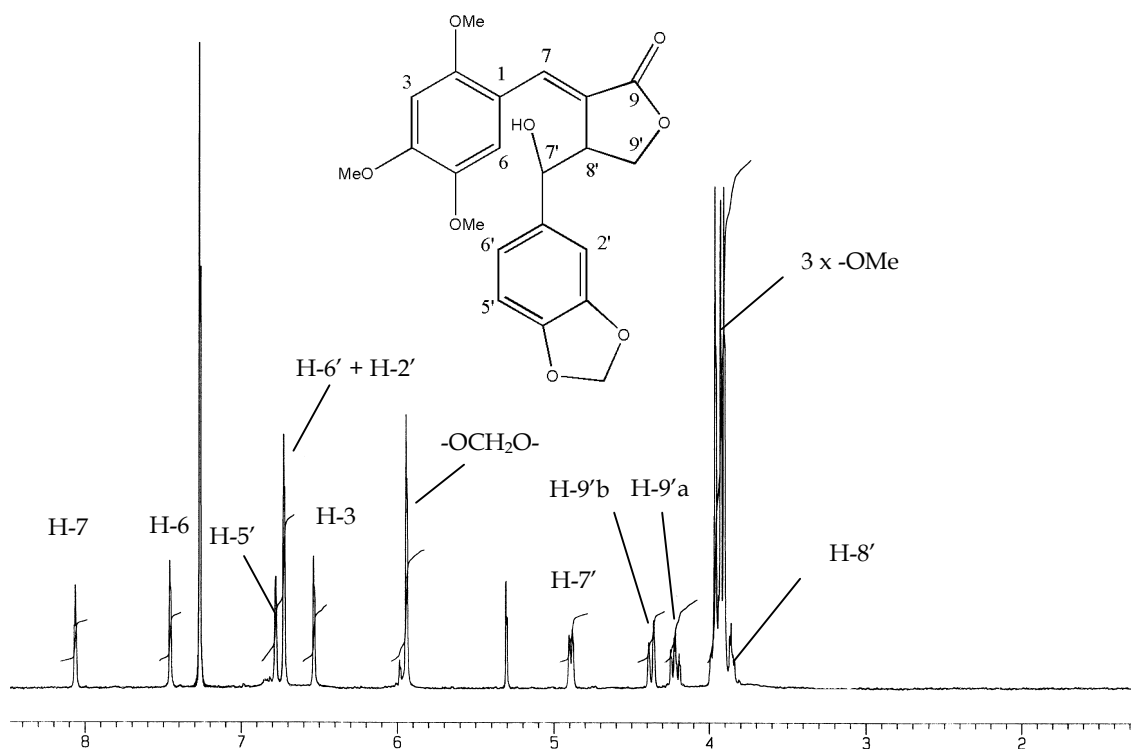


Figura 42. Espectro de $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) de **43**

Los datos obtenidos del espectro de $^{13}\text{C-NMR}$ (Fig. 43) y de los experimentos DEPT 90 y 135 están en concordancia con la estructura del compuesto, ya que se observan señales para 22 carbonos de los cuales 9 son carbonos cuaternarios (δ 172.6, 154.4, 152.2, 147.9, 147.6, 143.0, 122.1, 116.4 y 114.5), 8 son carbonos terciarios (δ 134.0,

120.0, 112.2, 108.1, 106.7, 96.8, 74.0, 45.6), 2 carbonos secundarios (δ 101.1 y 66.8) y 3 carbonos primarios (δ 56.7, 56.4 y 56.0).

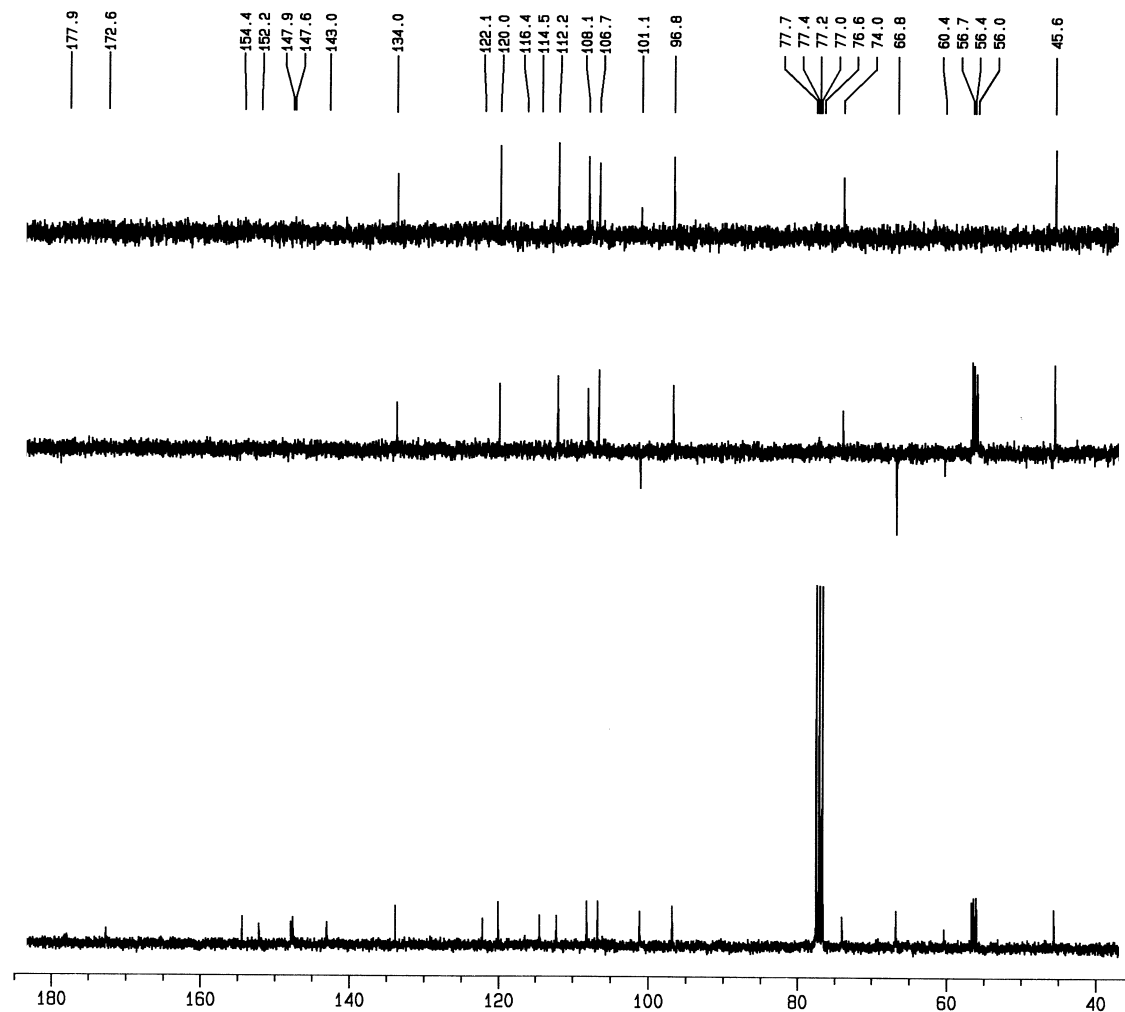


Figura 43. Espectro ^{13}C -NMR (CDCl_3) de **43**

El tratamiento de **43** con TFA en benceno (1:16) a reflujo durante 1 hora condujo a un compuesto de peso molecular 396 uma y fórmula $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{O}_7$, datos coincidentes con los del producto esperado (**44**) y con un rendimiento del 93 %.

El espectro de ^1H -NMR (Fig. 44) muestra señales para tres grupos metoxilo a δ 3.14 (s, 3H), 3.85 (s, 3H) y 3.88 (s, 3H), una señal compleja entre δ 3.63 y 3.96 que integra para tres protones (H-9'a, H-7' y H-8'), un triplete centrado a δ 4.31 con integral para un protón y atribuido al otro protón del metileno lactónico (H-9'b). El singulete a δ 5.92 (2H) se debe al grupo metilendioxi, mientras que en la zona aromática se observan dos singuletes a δ 6.50 (H-3) y 7.81 (H-7) y un singulete ancho a δ 6.71 integrando para tres

protones y que corresponden a H-2', H-5' y H-6' del grupo piperonilo. La desaparición de la señal del protón H-6 está de acuerdo con la estructura de la Figura 44.

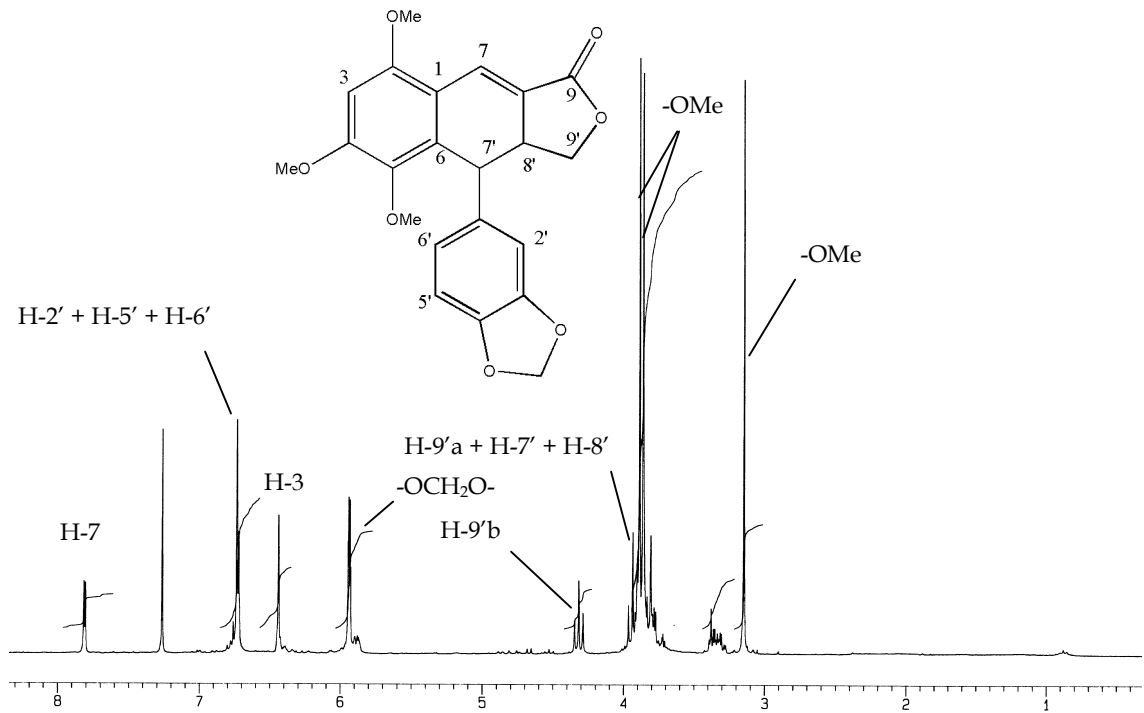


Figura 44. Espectro de ¹H-NMR (CDCl₃) de 44

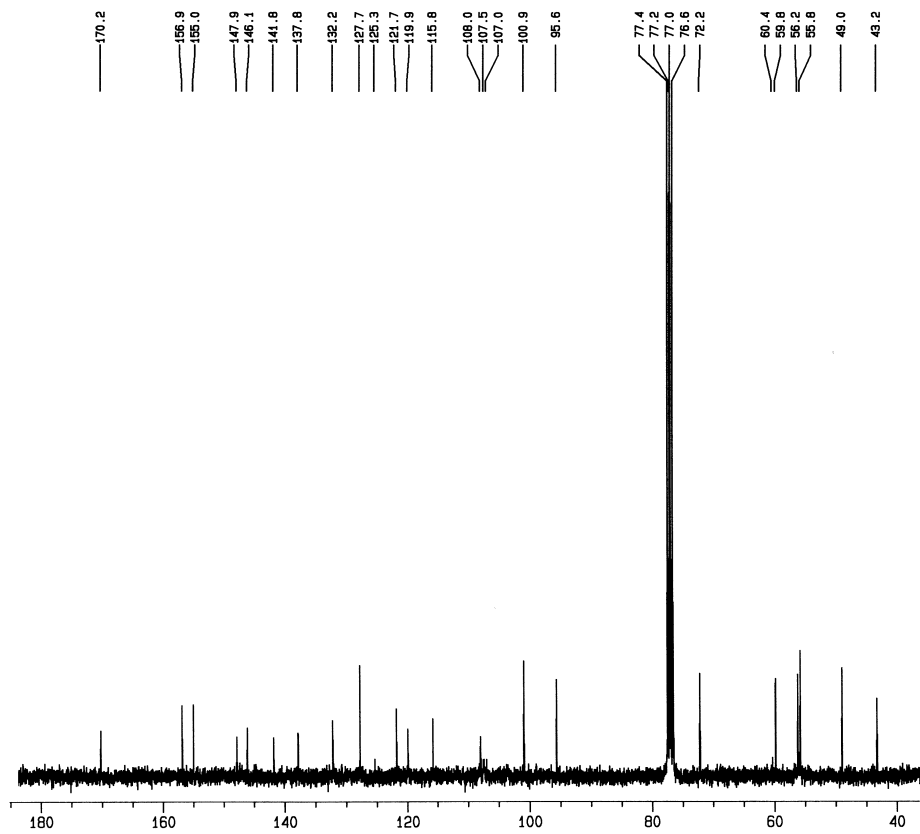


Figura 45. Espectro de ¹³C-NMR (CDCl₃) de 44

El espectro de ^{13}C -NMR (Fig. 45) y los experimentos DEPT 90 y 135 revelan la existencia de 22 carbonos, de los cuales 10 son cuaternarios (δ 170.2, 156.9, 155.0 147.9, 146.1, 141.8, 137.8, 132.2, 121.7 y 115.8), 7 terciarios (δ 127.7, 119.9, 108.0, 107.5, 95.6, 49.0 y 43.2), dos metilenos (δ 100.9 (-OCH₂O-) y 72.2 (metileno lactónico)) y tres metilos (δ 59.8, 56.2 y 55.8). Estos datos apoyan la estructura propuesta para el compuesto **44**.

El tratamiento de este compuesto con DDQ rindió trazas de justicidona y otro compuesto en un 44% que resultó inestable a temperatura ambiente. Este último muestra además una fluorescencia muy intensa a la luz ultravioleta. Su fórmula C₂₂H₁₈O₇, determinada por espectrometría de masas de alta resolución, es igual a la esperada para el compuesto **6** (Esq. 14).

En el espectro de ^1H -NMR (CDCl₃) (Fig. 46) se observan tres singuletes que integran para tres protones cada uno a δ 3.22, 4.00 y 4.06 y que corresponden a los tres grupos metoxilo, un cuadruplete centrado a δ 5.09 que integra para dos protones y que atribuimos al metileno lactónico (H-9'a y H-9'b), un singulete ancho a δ 6.02 (2H) que se debe al grupo metilendioxi, una señal compleja entre δ 6.74 y 6.87 con integral para cuatro protones y que atribuimos al grupo piperonilo (H-2', H-5' y H-6') y a H-3 del anillo A. Finalmente un singulete a δ 8.91 (1H) que se debe al protón bencílico H-7.

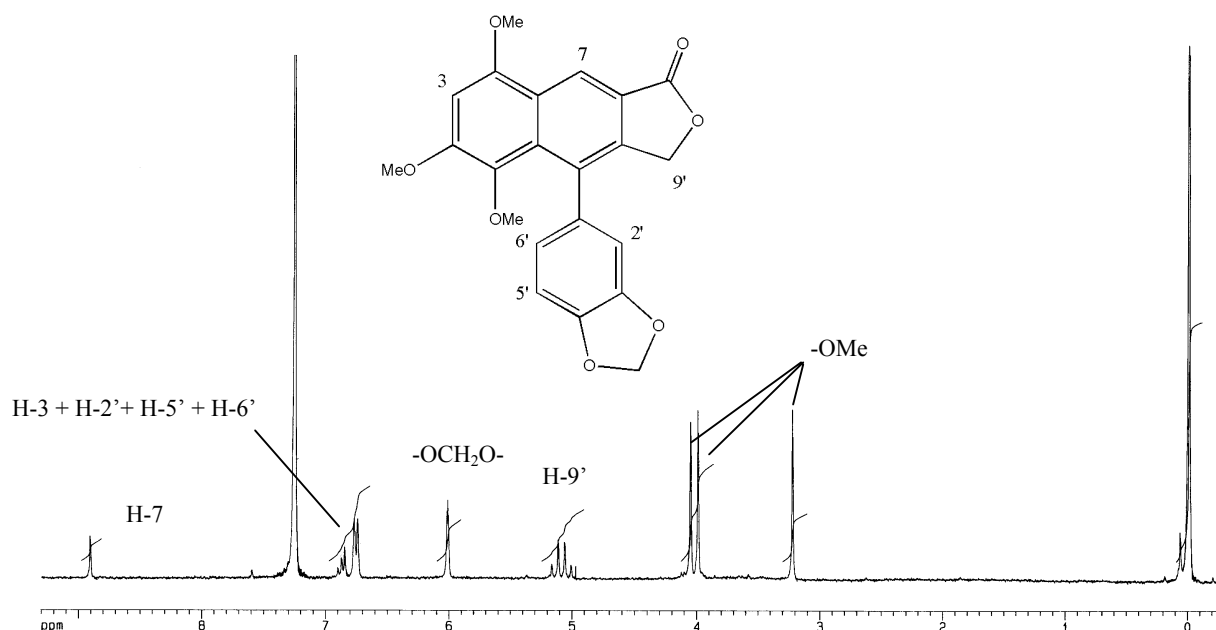
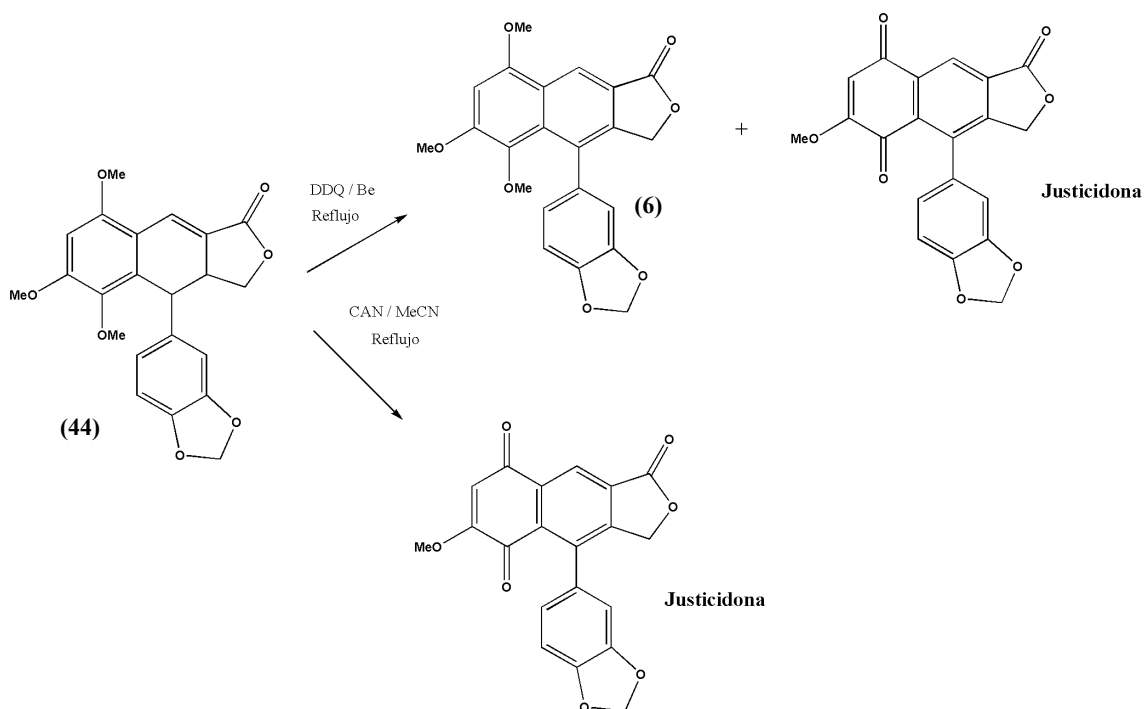


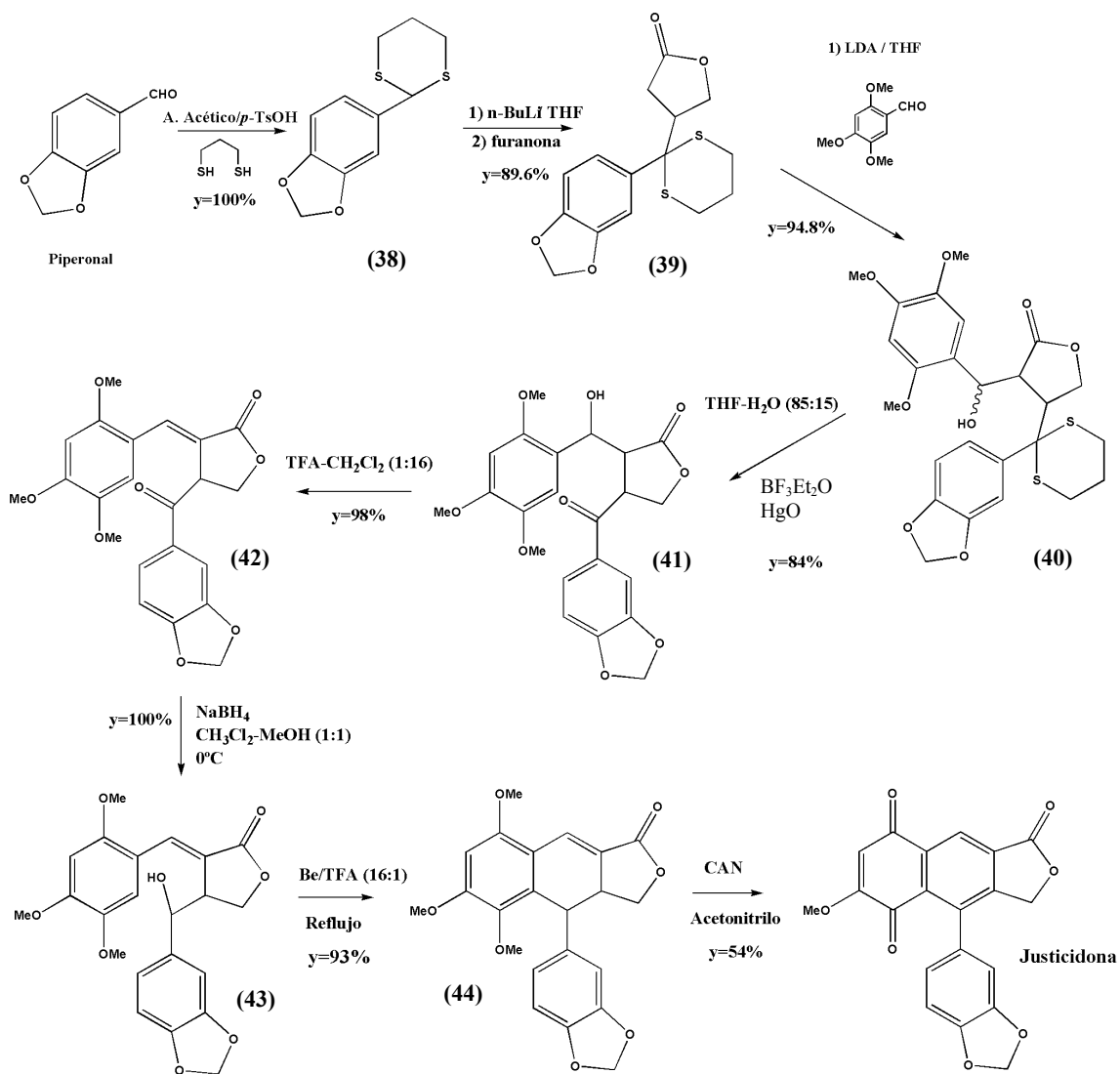
Figura 46. Espectro de ^1H -NMR (CDCl₃) de **6**

Por otra parte, la oxidación del compuesto **44** con nitrato cérico amónico (CAN) dio directamente y con un rendimiento del 54.4 % un producto de intenso color rojo, cuya fórmula (HR-MS) y datos espectroscópicos son idénticos a los de la justicidona (Esq. 15).



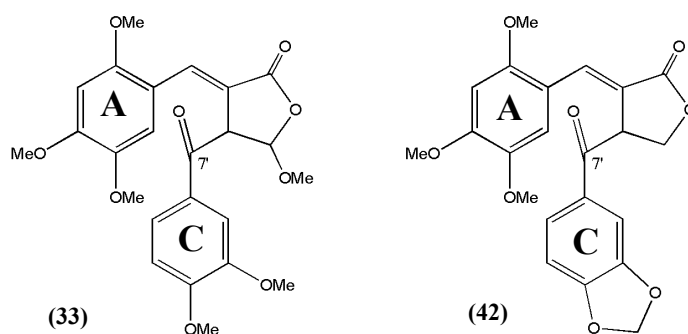
Esquema 15. Obtención de **6** y justicidona a partir de **44**

Por tanto, la síntesis de la justicidona se llevó a cabo finalmente mediante un proceso lineal en 8 pasos, empleando reacciones bien conocidas, tal como se muestra en el Esquema 16.



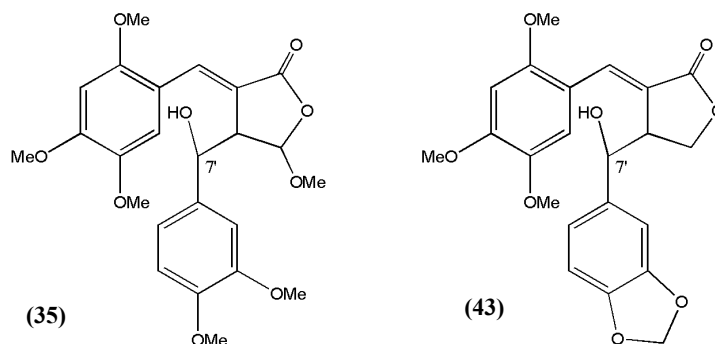
Esquema 16. Síntesis total de la justicidona en 8 pasos

Durante el desarrollo de la síntesis de la justicidona no fue posible lograr la ciclación de los compuestos **33** y **42**. Ambos compuestos (Esq. 17) poseen, entre otras características estructurales comunes, un anillo A trisustituido con metoxilos en las posiciones 2, 4 y 5 y un grupo carbonilo en C-7'.



Esquema 17. Compuestos 33 y 42

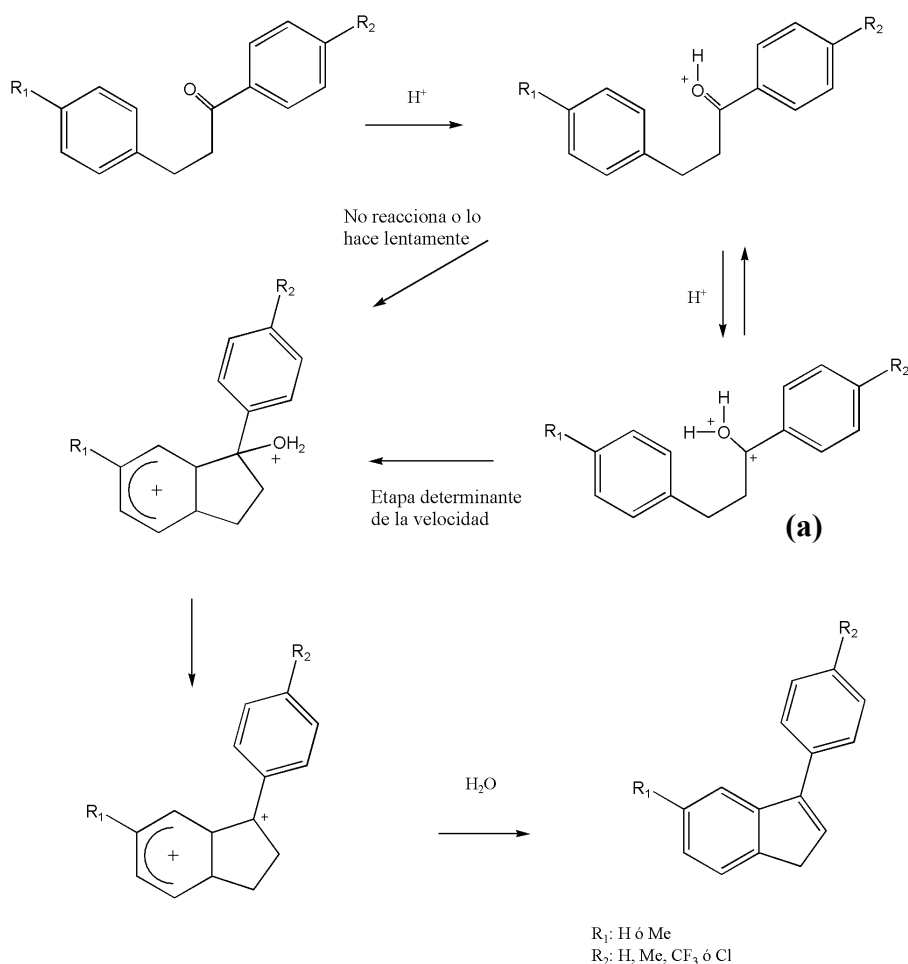
En principio se especuló con la posibilidad de que la dificultad para la ciclación podría deberse a la sustitución del anillo A, inusual en lignanos, que de algún modo forzaría al sistema a adquirir una conformación inadecuada para la ciclación. No obstante, esta hipótesis no puede sostenerse fácilmente a la luz de los resultados obtenidos de la ciclación de los compuestos **35** y **43** (Esq. 18), que se obtienen por reducción con borohidruro sódico a partir de **33** y **42** respectivamente. Tanto **35** como **43** dan lugar a sus derivados ciclados con buen rendimiento en las condiciones descritas en la parte experimental, pese a que poseen idéntica sustitución que los compuestos **33** y **42**.



Esquema 18. Compuestos 35 y 43

Otra posible explicación a la dificultad encontrada en la ciclación de **33** y **42**, que además es compatible con la facilidad con que se ciclan los compuestos **35** y **43**, sería atribuir el problema en cuestión al grupo carbonilo en la posición C-7'.

La reacción de ciclodeshidratación del tipo Friedel-Craft ha sido bien documentada por Saito et al.³³⁵ para las 1,3-difenil-propanonas (Esq. 19). Según estos autores, el carbocatión formado por la monoprotonación de una cetona de este tipo es lo suficientemente estable como para tener una reactividad baja o nula frente al anillo de benceno. No obstante se puede lograr una segunda protonación empleando ácido trifluorometanosulfónico, un superácido 10^3 veces más fuerte que el ácido sulfúrico, que da lugar a la formación de una cetona O,O-diprotonada (**a**) que es el verdadero intermedio de reacción.



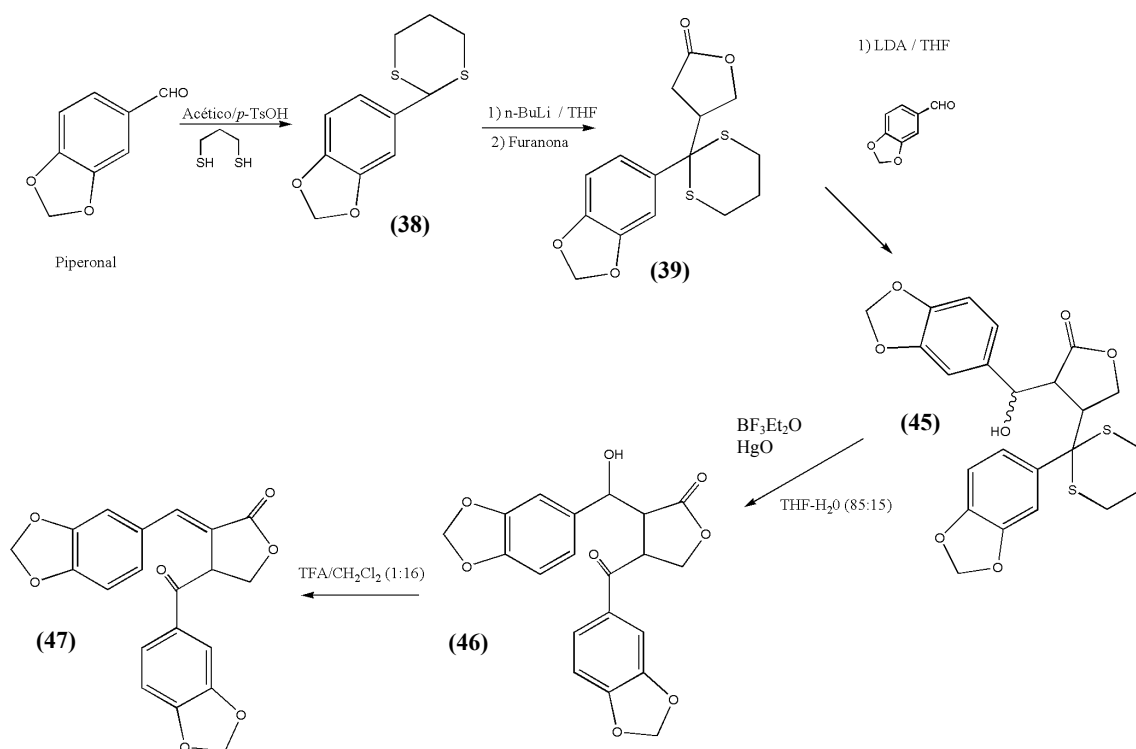
Esquema 19. Ciclodeshidratación tipo Friedel-Craft de 1,3-difenil-1-propanonas

³³⁵ Saito S., Sato Y., Ohwada T., Shudo K. *J. Am. Chem. Soc.*, **116** (6), 2312-7, (1994)

Por lo tanto, si estos resultados fuesen extrapolables a nuestro caso particular, el carbonilo dificultaría la ciclación ya que para poder llevar a cabo la ciclodeshidratación de **33** y **42** deberíamos ser capaces de generar un dicatión que se comportase como un superelectrófilo. Ello requeriría un medio de reacción cuya acidez no puede lograrse empleando ácido trifluoroacético³³⁵, sino que requeriría ácido trifluorometanosulfónico (TFSA). Estas condiciones de reacción no son apropiadas para ciclar los compuestos **33** y **42** debido a la presencia de grupos metoxilo y metilendioxi que sin duda se verían afectados.

Además, existe una tercera posibilidad que explicaría la dificultad para lograr la ciclación de **33** y **42**. Es posible que se trate de una contribución, en proporciones indeterminadas, de las dos razones expuestas, es decir, la combinación de un anillo A trisustituido en las posiciones 2, 4, 5 con un grupo carbonilo en C-7'.

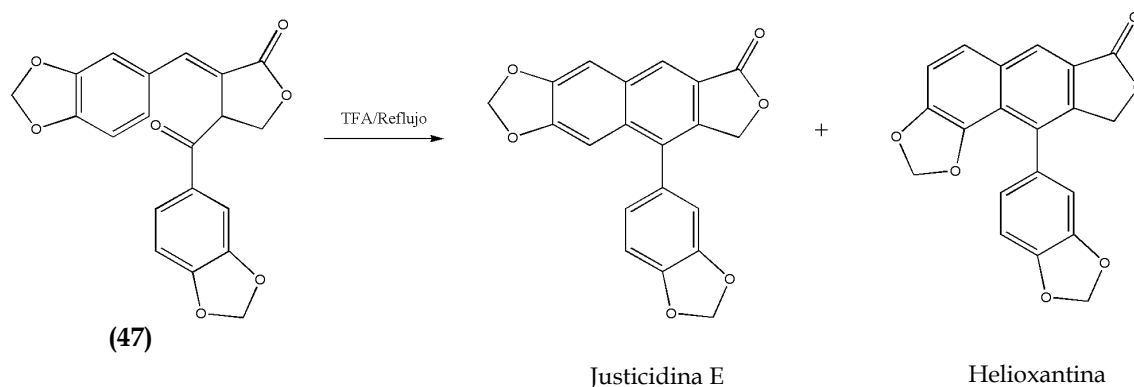
Decidimos abordar el problema desde un punto de vista experimental y para ello sintetizamos, mediante la misma estrategia que empleamos para la justicidona (Esq. 20), el compuesto **47**, al que consideramos un modelo apropiado para estudiar el problema. Al igual que los compuestos **33** y **42**, **47** posee un anillo de piperonilo en la posición correspondiente al anillo C, pero a diferencia de **33** y **42**, el anillo A es un segundo piperonilo. Con este compuesto podemos evaluar la importancia que para la ciclación posee la existencia de un anillo A trisustituido en las posiciones 2,4,5.



Esquema 20. Obtención del compuesto **47**

Si como ocurre para los compuestos **33** y **42**, la ciclación de **47** no tuviera lugar en las condiciones dadas, podríamos en principio descartar la idea de que es el anillo A trisustituido en 2,4,5 quien impide la ciclación. Este resultado sugeriría que la dificultad radicaría en el grupo carbonilo.

Si por el contrario la ciclación de este compuesto tuviera lugar en las mismas condiciones en que falló la ciclación de **33** y **42**, obtendríamos la justicidina E y quizás también la helioxantina (Esq. 21). En este caso, las conclusiones no serían del todo evidentes pues no podríamos concluir que la sustitución 2,4,5 del anillo A es la única responsable de la falta de ciclación porque, como ya se ha visto, los compuestos **35** y **43** (Esq. 18) pueden ciclarse por los métodos habituales.



Esquema 21. Lignanos arilnaftalénicos esperados de ocurrir la ciclodeshidratación de **47**

Mediante el procedimiento descrito en el Esquema 20 se obtuvo un producto de peso molecular 366 uma y de fórmula $C_{20}H_{14}O_7$. Las señales del espectro de 1H -NMR (Fig. 47) fueron asignadas empleando técnicas de espectroscopía bidimensional (COSY, HSQC, HMBC y ROESY). En dicho espectro se observa un doblete a δ 4.37 y un triplete centrado a δ 4.70 que corresponden a los protones del metileno lactónico, una señal compleja centrada a δ 5.08 que integra para un protón y que corresponde a H-8'. Las señales de los dos grupos metilendioxi se observan a δ 5.94 como doblete y a δ 6.09 como singlete, integrando en ambos casos para dos protones.

A δ 6.74 se observa una señal compleja que integra para dos protones (H-2 y H-5), centrados a δ 6.88 y 6.91 se observan dos dobletes que integran para un protón en cada caso y que corresponden a H-5' y H-6 respectivamente, a δ 7.39, como singulete que integra para un protón, se encuentra la señal correspondiente a H-2', mientras que la de H-6' aparece como doblete centrado a δ 7.51. Finalmente, el protón bencílico H-7 aparece como singulete a δ 7.72.

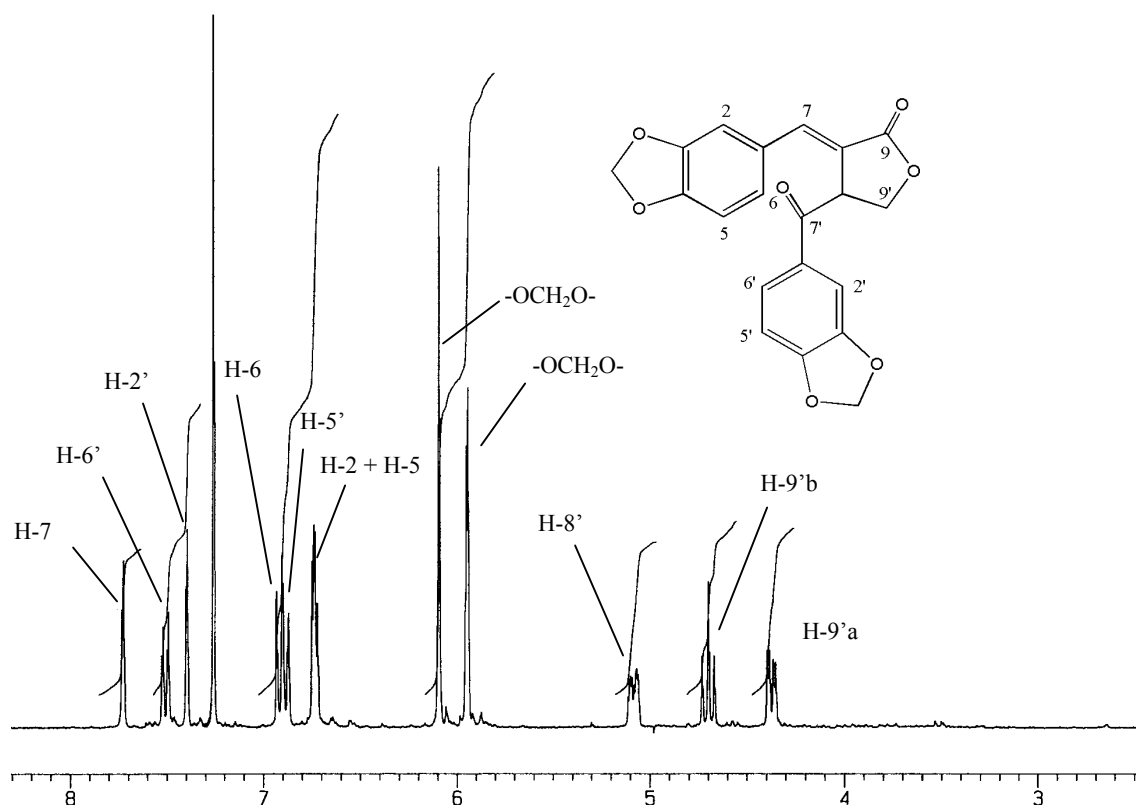


Figura 47. Espectro de $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) de **47**

Las señales del espectro de $^{13}\text{C-NMR}$ (Fig. 48) también concuerdan con la estructura del compuesto **47**, ya que de las veinte señales observadas, nueve corresponden a carbonos cuaternarios (δ 193.4, 171.5, 152.8, 149.5, 148.9, 148.2, 129.7, 128.0 y 120.4), ocho a carbonos terciarios (δ 140.0, 126.0, 124.8, 108.9, 108.7, 108.3, 108.3 y 46.6) y tres a metilenos (δ 102.3 ($-\text{OCH}_2\text{O}-$), 101.6 ($-\text{OCH}_2\text{O}-$) y 67.6 ($\text{C-9}'$)).

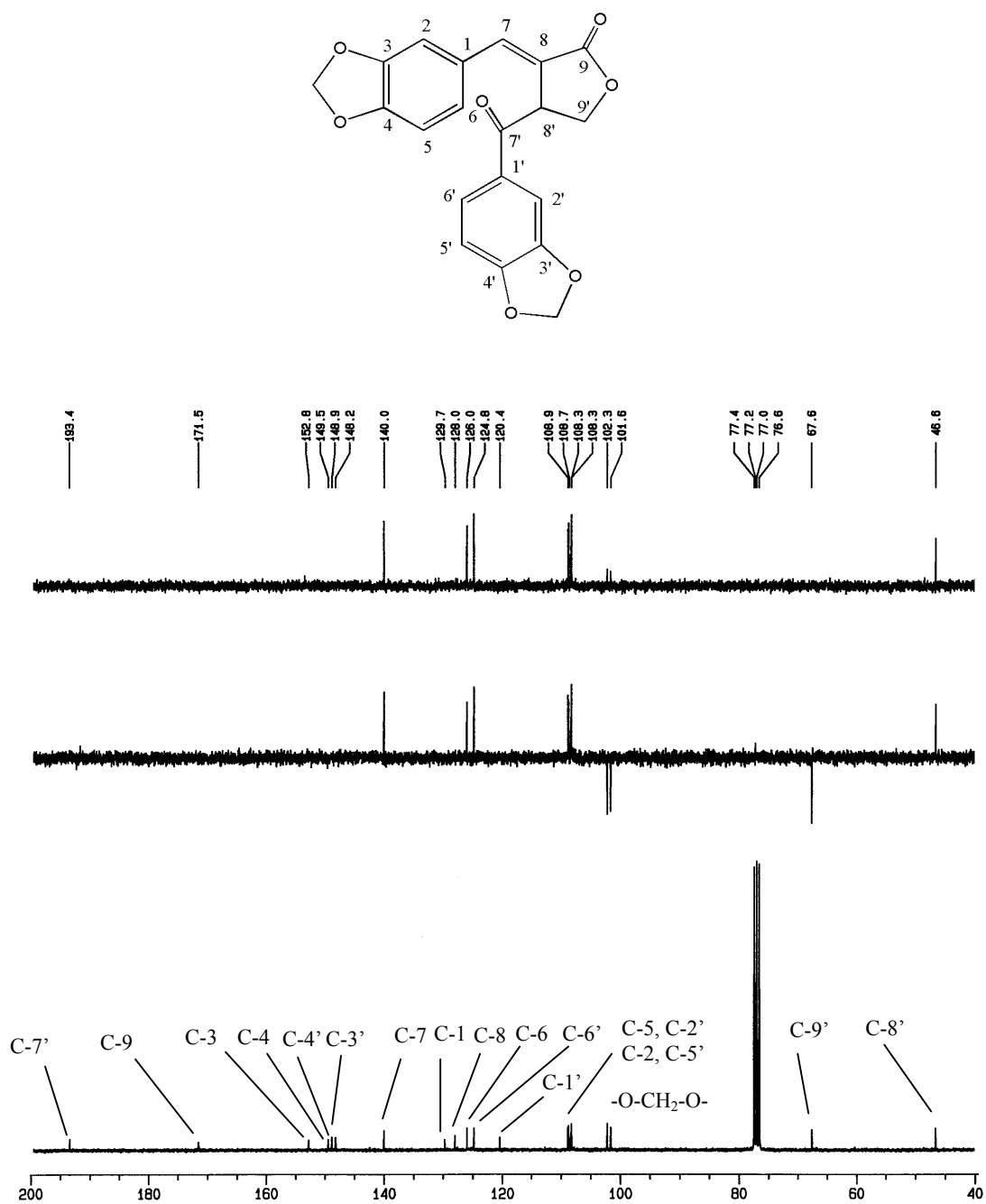


Figura 48. Espectro de ^{13}C -NMR (CDCl_3) de 47

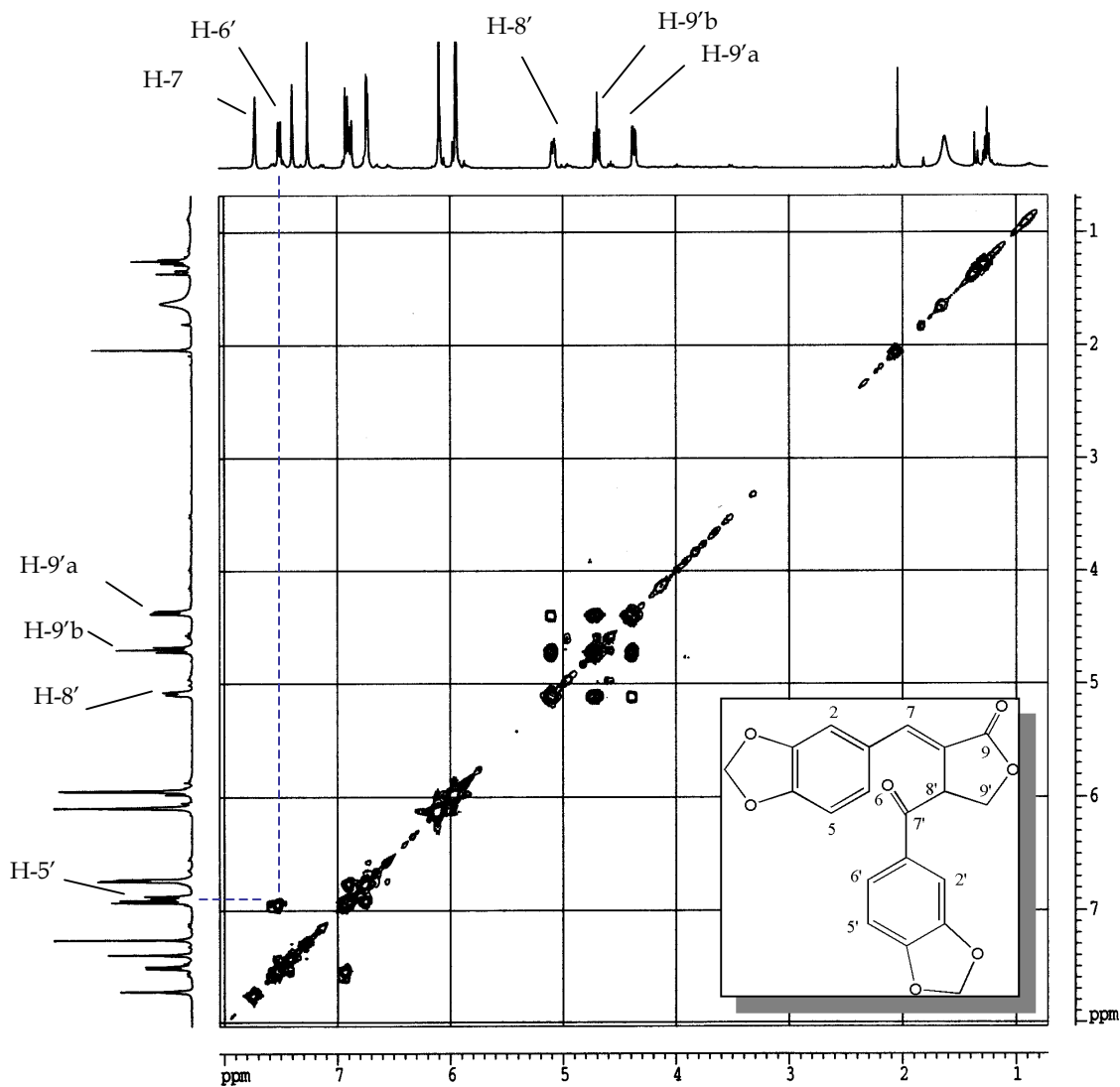


Figura 49. Experimento COSY de 47.

En el experimento ¹H-¹H-COSY (Fig. 49) se puede observar el acoplamiento entre los protones H-8', H-9'a y H-9'b. También entre los protones aromáticos 5' y 6' entre otros.

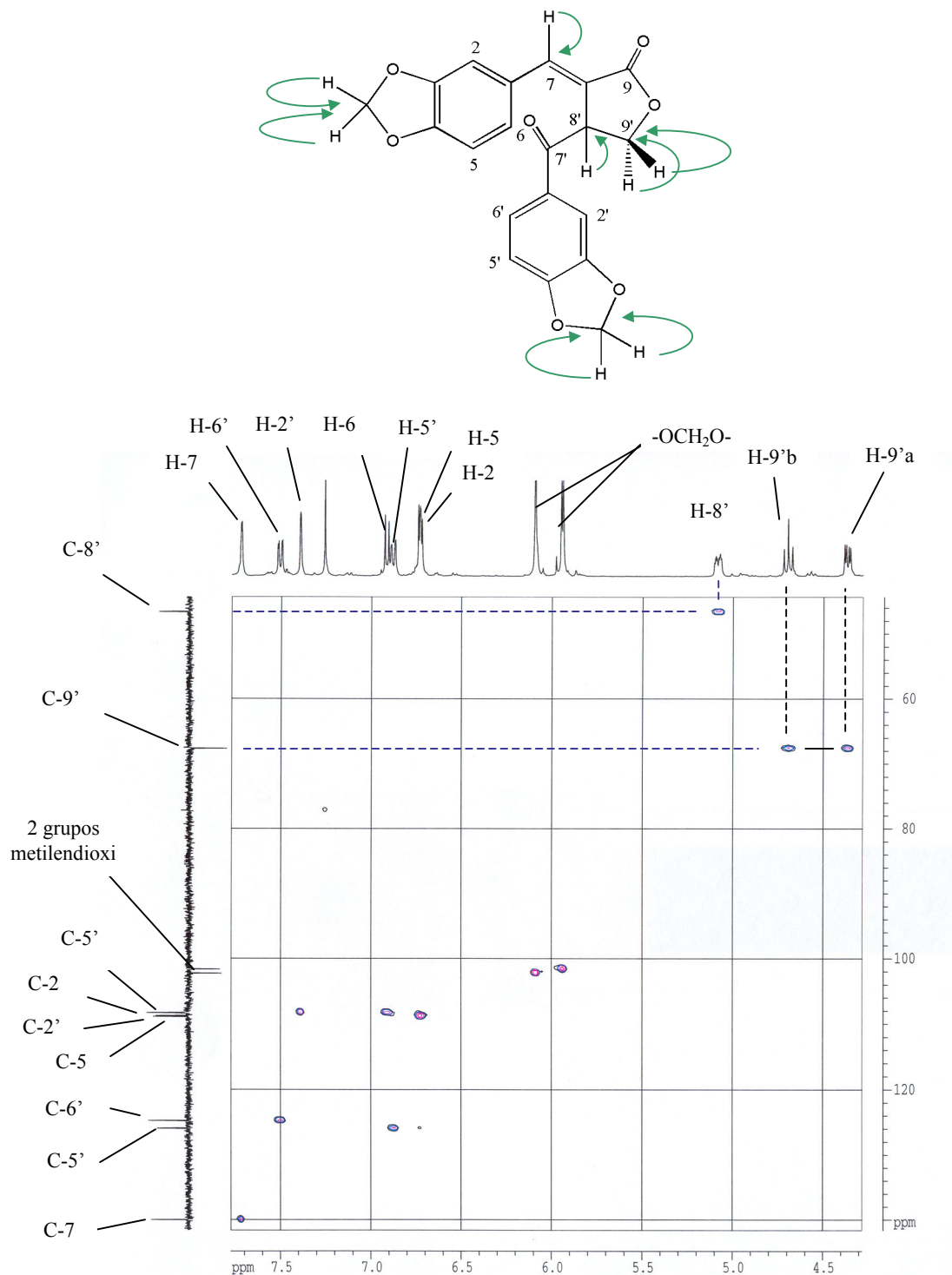


Figura 50. Experimento HSQC de 47

Mediante el experimento HSQC (Fig. 50) se pudieron asignar varias señales, entre ellas las que corresponden a los protones no aromáticos del compuesto (H-9'a, H-9'b y H-8'). Las señales de ^1H -NMR a δ 4.37 y 4.70 muestran una clara correlación con el metileno a δ 67.6, lo que indica que se trata de los protones del metileno lactónico. Por tanto la señal a δ 5.08 en el espectro de ^1H -NMR corresponde a H-8'.

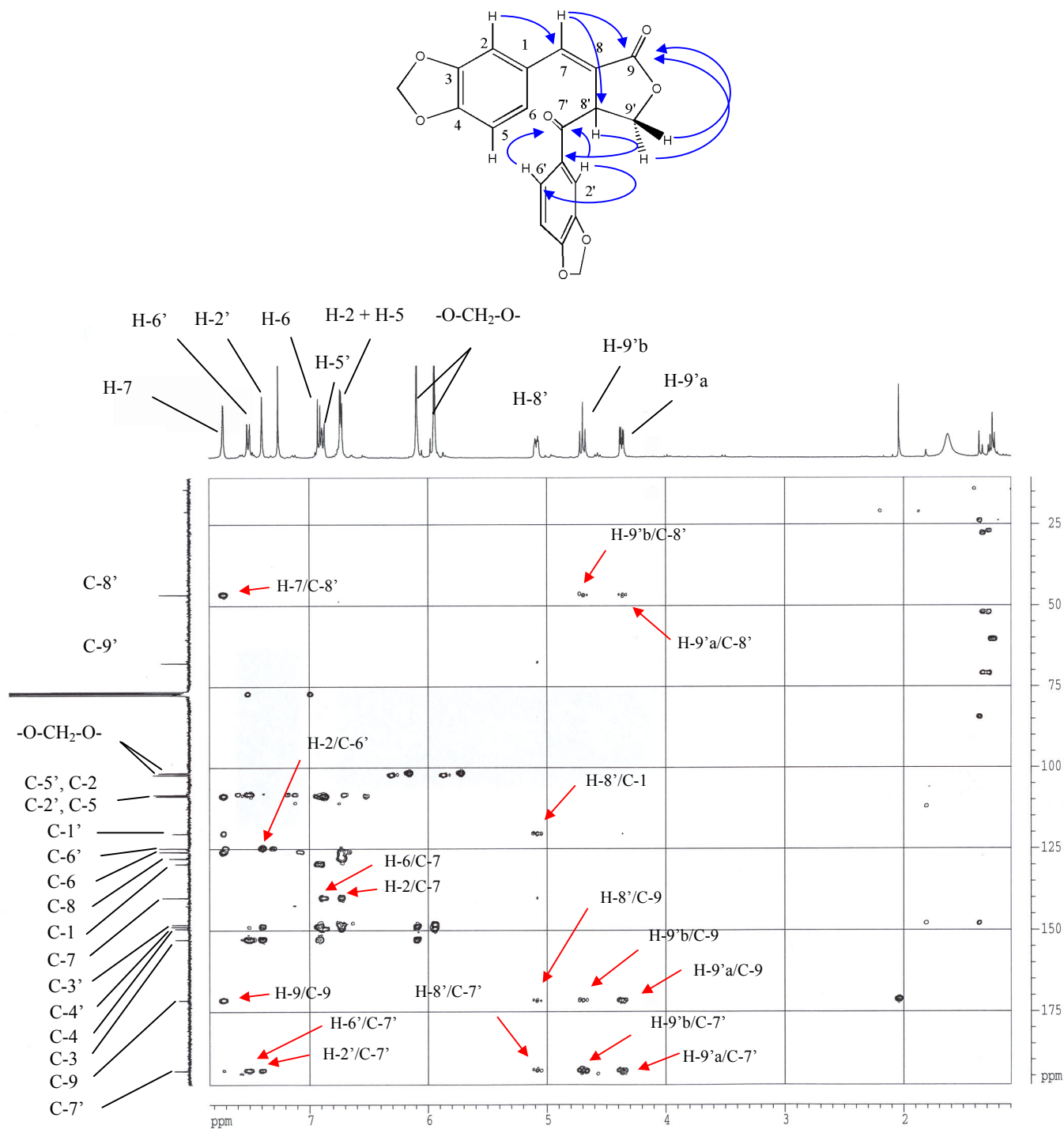


Figura 51. Experimento HMBC de 47

El experimento HMBC permitió comprobar y llevar a cabo las asignaciones restantes, algunas de las cuales se muestran en la Figura 51.

Al someter a reflujo el compuesto **47** durante 24 horas en TFA se obtuvo, con rendimiento del 75%, un compuesto de peso molecular 348 uma y datos espectroscópicos idénticos a los de la justicidina E^{304,305} (Fig. 52). No se detectó la presencia de la helioxantina.

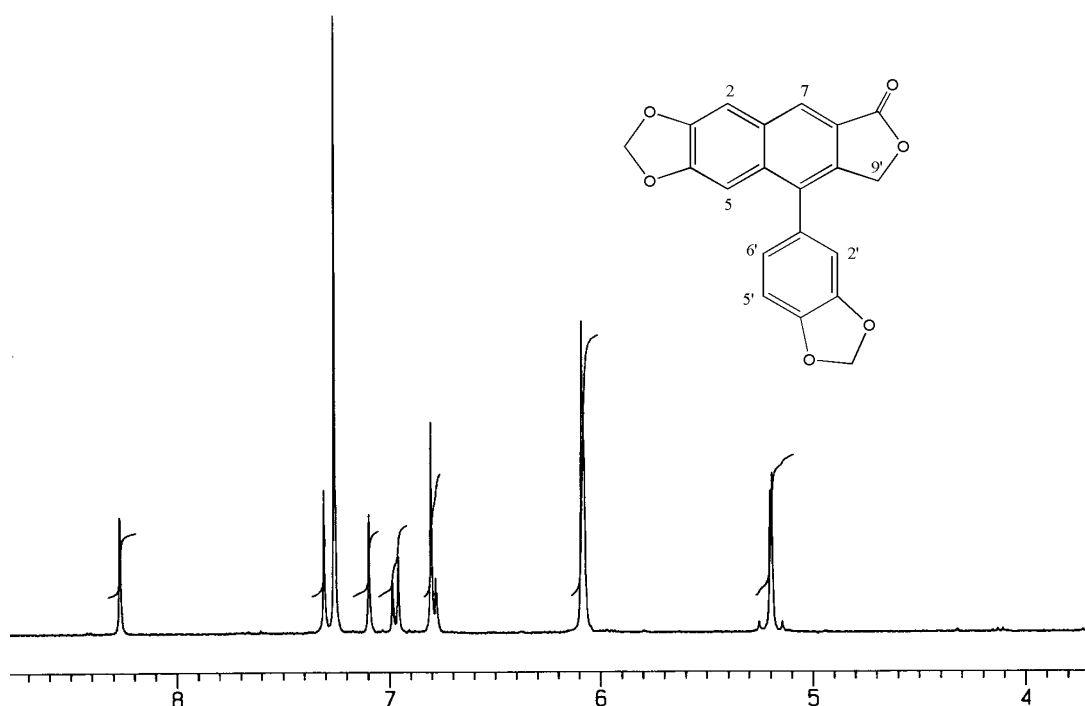


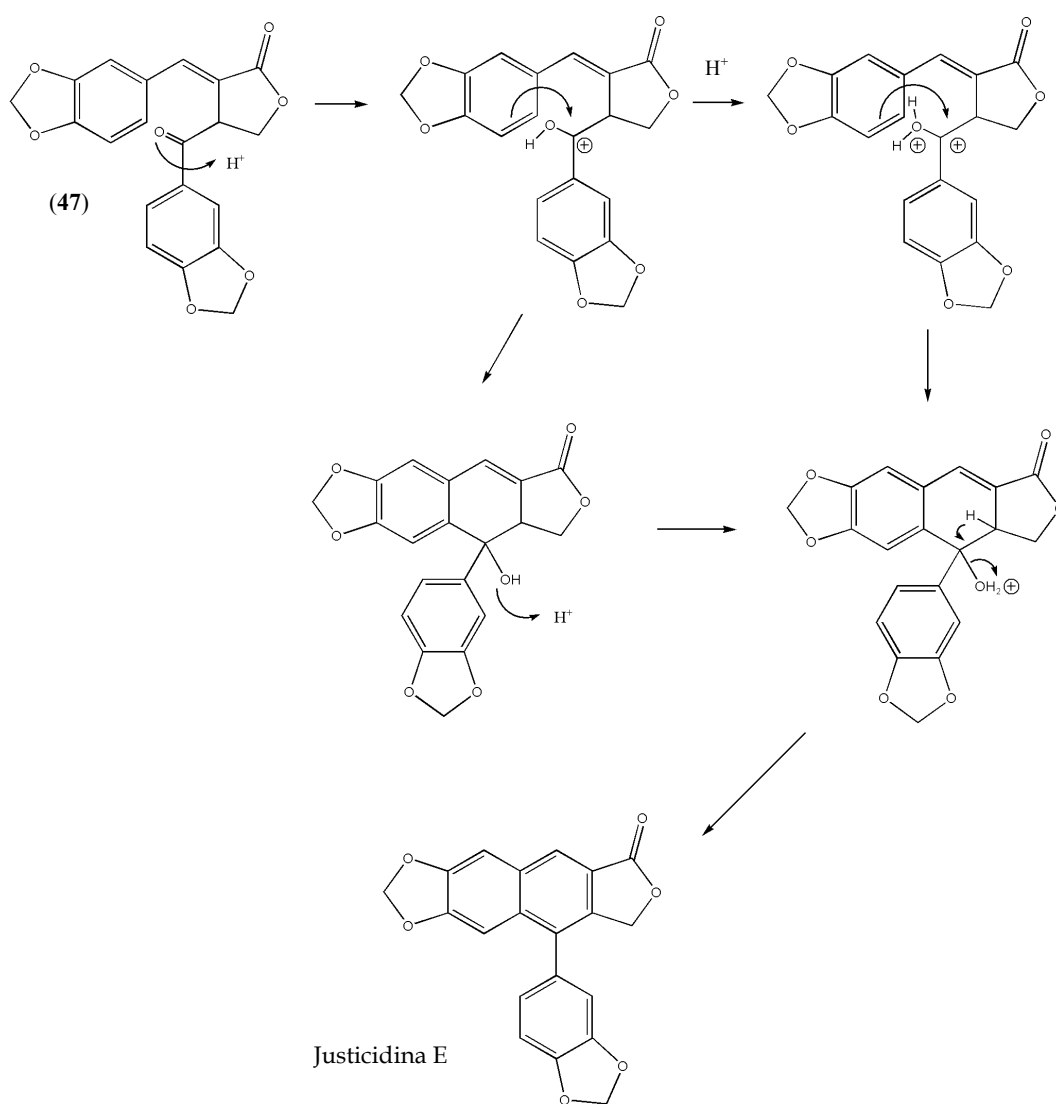
Figura 52. Espectro de ¹H-NMR (CDCl₃) de la justicidina E

Con este resultado queda claro que el grupo carbonilo no es un impedimento infranqueable para la ciclación, aunque no queda excluida la posibilidad de que la dificulte. Por otra parte, dado que **47** rinde justicidina E pero los compuestos **33** y **42** no se ciclan, la sustitución 2, 4, 5 del anillo A debe ser relevante, pero no constituye un obstáculo insalvable para la ciclación ya que, como se dijo anteriormente, los compuestos **35** y **43** poseen la misma sustitución y sin embargo se ciclan.

Es posible que tanto la sustitución del anillo A como la presencia de un grupo carbonilo sobre C-7' desempeñen un papel relevante para la reacción de ciclodeshidratación.

Por lo tanto, con los datos obtenidos, parece probable que la razón para que los compuestos **33** y **42** no se ciclen, sea la suma en proporciones indeterminadas de ambos factores, a saber, la presencia de un anillo A con la sustitución 2, 4, 5 y de un carbonilo en posición bencílica respecto al anillo C (piperonilo).

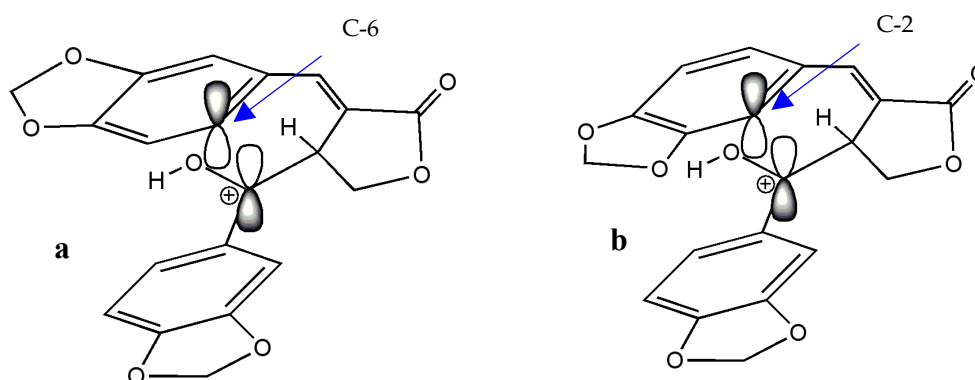
No obstante, si admitimos como válido un mecanismo análogo al propuesto por Saito et al.³³⁵ para la ciclodeshidratación del compuesto **47** en la síntesis de la justicidina E (Esq. 22), podemos explicar de una manera más coherente los hechos observados.



Esquema 22. Ciclodeshidratación del compuesto **47**

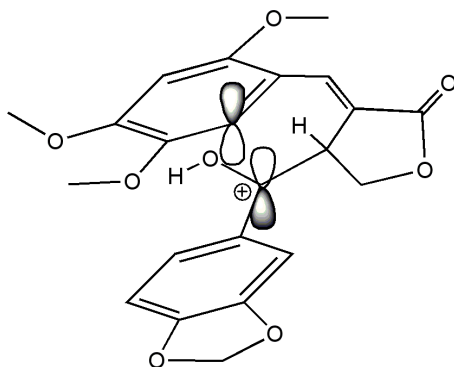
La ciclodeshidratación, que conduciría al núcleo arilnaftalénico, tiene lugar mediante una sustitución electrofílica aromática que precisa de la superposición del orbital p vacío del carbocatión con otro orbital p del anillo aromático (Esq. 23, Fig. a).

En el caso de que se trate de un anillo A sustituido en las posiciones 3 y 4, como es el caso del piperonilo, éste puede orientarse de forma que los efectos estéricos que dificultan la reacción, queden minimizados. La ciclación ocurriría en la posición 6 del anillo A, pero no en la posición 2, ya que la conformación necesaria para que se produzca en dicha posición, produciría repulsiones estéricas y electrónicas entre el grupo metilendioxi y el anillo C (piperonilo) (Esq. 23, Fig. b). Creemos que ésta es la razón por la que hemos obtenido regioselectivamente justicidina E y, en cambio, no hemos podido detectar helioxantina.



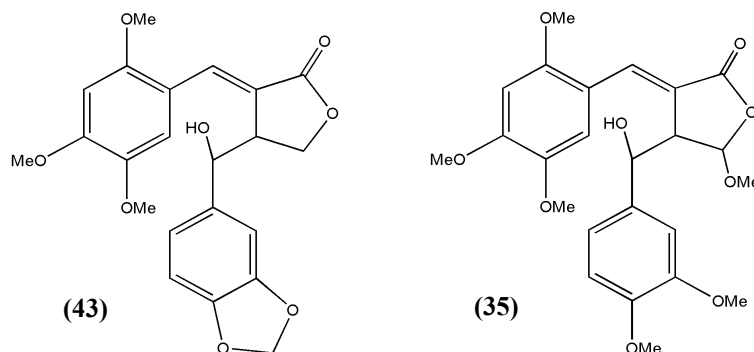
Esquema 23. Superposición de orbitales p en la ciclodeshidratación del compuesto **47** que conduciría a justicidina E (**a**) y helioxantina (**b**)

Es posible que ésta también sea la explicación a la dificultad encontrada en la ciclación de los compuestos **33** y **42**, con sustituciones en las posiciones 2, 4, 5. Estos dos lignanos sólo poseen un posible punto de ciclación (posición 6), y a la vista de los resultados, creemos que ésta no ocurre debido a la interacción entre el anillo C y el metoxilo en la posición 5, que evitaría que la molécula adoptase la conformación necesaria para la superposición de orbitales p (Esq. 24).



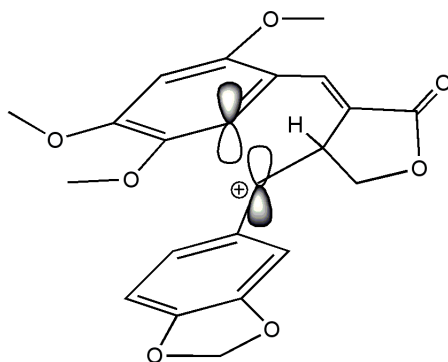
Esquema 24. Superposición de orbitales p en el compuesto 42

Mediante esta hipótesis también se puede explicar que los compuestos 35 y 43 se ciclen con facilidad (Esq. 25), vía un carbocatión bencílico, al ser tratados con benceno/TFA (16/1) a reflujo.



Esquema 25. Compuestos 43 y 35

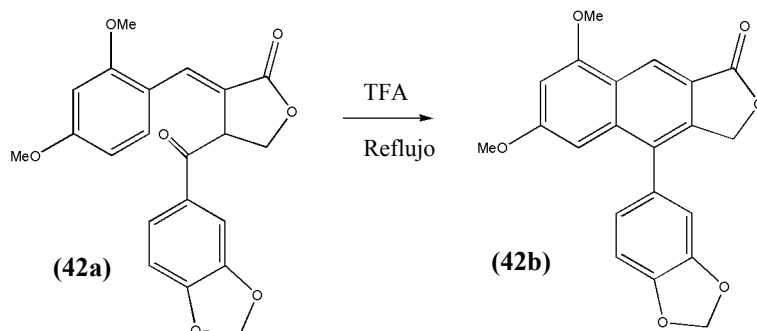
En este caso, tal como se muestra en el Esquema 26, pese a que las repulsiones estéricas entre el metoxilo sobre C-5 y el anillo C siguen existiendo, la presencia de un carbocatión bien definido aumenta la reactividad de la molécula lo suficiente como para superar la energía de activación que la reacción de ciclación requiere.



Esquema 26. Superposición de orbitales en el compuesto 43 que conduce a la formación de 44

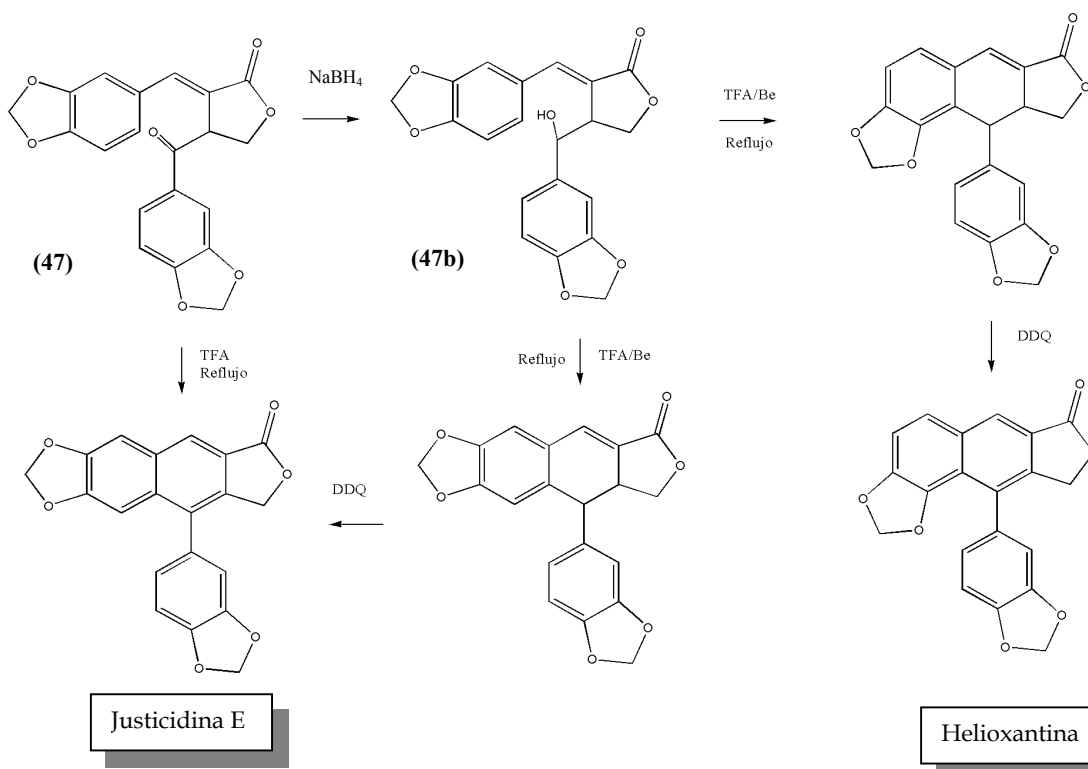
Es posible que esta hipótesis explique además la formación de los compuestos **3b**, **3c** y **3d** (Esq. 4, pág. 209).

Finalmente, se proponen dos experimentos que, junto a estudios de modelización molecular, permitirían apoyar o reconsiderar esta hipótesis. En primer lugar, si ésta fuese correcta, se debería poder obtener el compuesto **42b** a partir del compuesto **42a**, análogo de **42** sin metoxilo en la posición 5 (Esq. 27).



Esquema 27. Experimento 1

En segundo lugar, según esta hipótesis, es posible que pudiéramos detectar la presencia de helioxantina al llevar a cabo la ciclación del compuesto **47b** obtenido por reducción de **47** (Esq. 28).



Esquema 28. Experimento 2

No obstante, la ausencia de helioxantina no invalidaría la hipótesis ya que la ciclación de lignanos con un anillo A 3,4 disustituido, tiene lugar, según la bibliografía consultada^{316,318,332}, en la posición 6 y no en la posición 2.

Además de justicidina E se aisló, con un rendimiento menor de un 5%, un compuesto (**48**) de masa 366 uma y cuyo espectro de protón mostrado en la Figura 53, presenta un doblete centrado a δ 3.27 ($J=3.3$ Hz) que integra para dos protones, un multiplete a δ 4.34 con integral para un protón, un singulete a δ 4.68 (1H) y un doblete centrado a δ 4.76 ($J=9.18$ Hz). Se observan dos singuletes con integral para dos protones cada uno a δ 5.93 y 6.03 y que corresponden a dos grupos metilendioxi. Además se observan señales para cinco protones aromáticos: una señal compleja a δ 6.50 que integra para dos protones y tres señales con integral para un protón en cada caso a δ 6.65 como singulete, a δ 6.72 como doblete ($J=8.49$ Hz) y a δ 7.49 como singulete.

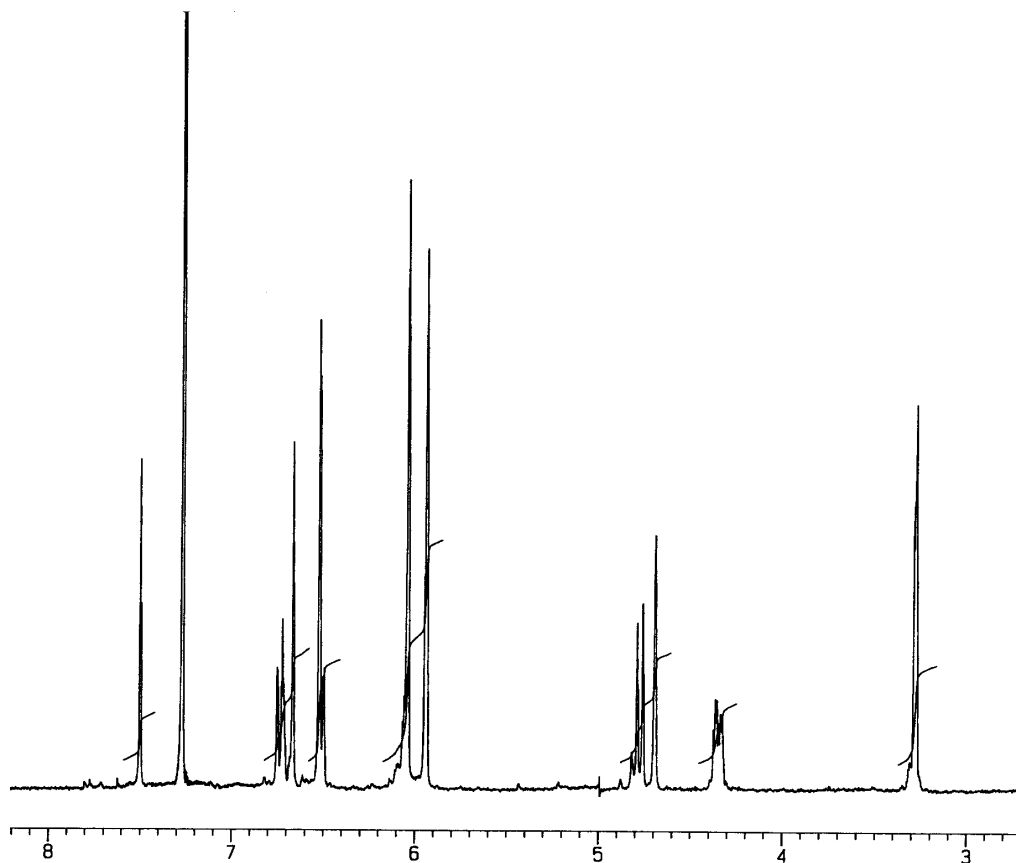


Figura 53. Espectro de $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) del compuesto **48**

Por otra parte el espectro de $^{13}\text{C-NMR}$ (Fig. 54) muestra señales para 9 carbonos cuaternarios, dos de las cuales corresponden a grupos carbonilo (δ 193.4, 175.5, 153.8, 148.4, 148.3, 146.9, 139.9, 136.3 y 127.2), 8 carbonos terciarios (δ 120.8, 109.4, 108.7, 107.9,

106.1, 46.7, 43.3 y 42.7) y 3 grupos metileno a δ 102.2 y 101.3, que corresponden a dos grupos metilendioxi y a δ 70.5, que corresponde al metileno lactónico.

Estos datos espectroscópicos nos llevaron a proponer como estructura probable para el compuesto **48**, la mostrada en el Esquema 29, que fue comprobada mediante espectroscopía bidimensional.

El compuesto **48** debe haberse formado a partir de **47** mediante una isomerización previa a la forma Z, que ya ha sido descrita para lignanos de este tipo³³⁶ y que también hemos observado en la transformación de kaerofilina en isokaerofilina. La protonación del doble enlace del isómero Z daría lugar a un complejo π que evolucionaría hacia un carbocatión bencílico. Este último actuaría como electrófilo para la sustitución electrofílica aromática sobre el anillo A, formándose de este modo **48**.

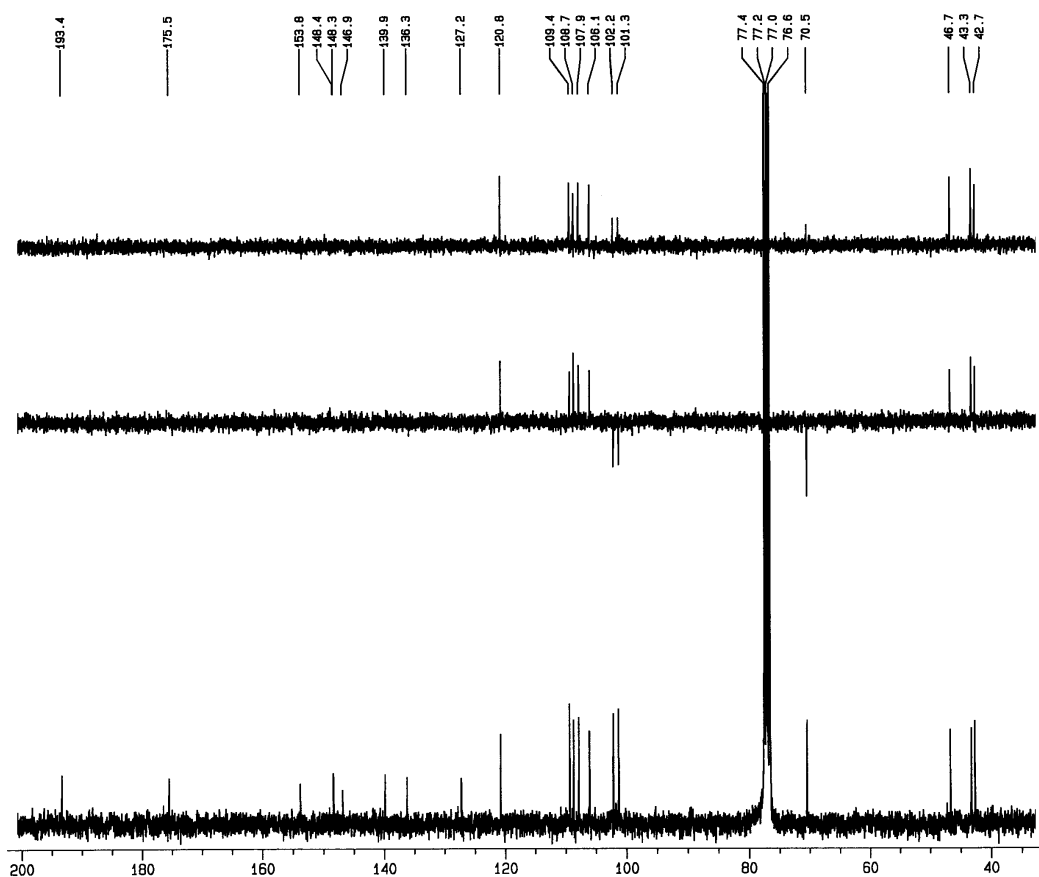
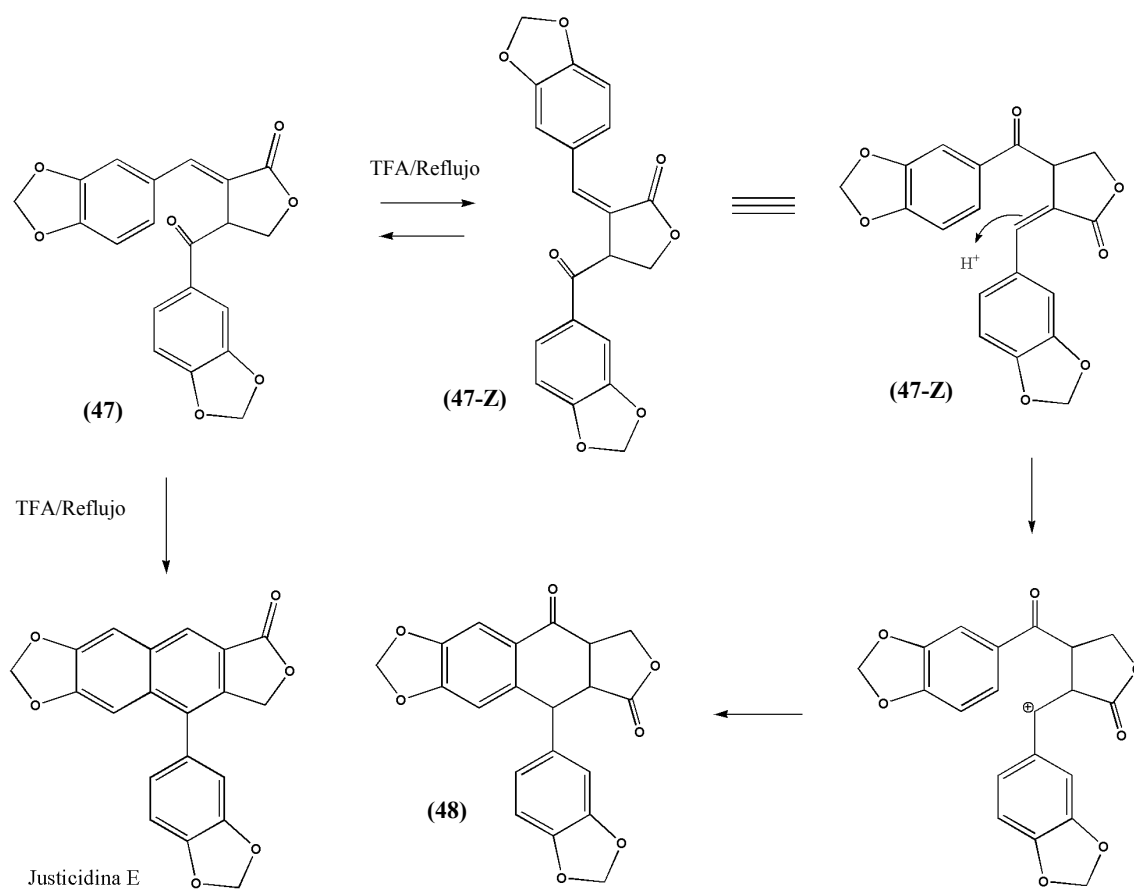


Figura 54. Espectro de ^{13}C -NMR (CDCl_3) del compuesto **48**

³³⁶ Estévez-Braun A., Estévez-Reyes R., González A.G. *Tetrahedron*, **50** (17), 5203-10, (1994)



Esquema 29. Obtención de justicidina E y 48 a partir de 47

El experimento HSQC (Fig. 55) permitió asignar varias señales del espectro de carbono y sirvió para identificar las señales pertenecientes a los protones del metileno lactónico: el multiplete a δ 4.34 (H-9a) y el doblete a δ 4.76 (H-9b).

Para hacer las asignaciones del doblete a δ 3.27 (H-8 + H-8') y del singulete a δ 4.68 (H-7') se recurrió a un experimento HMBC (Fig. 57).

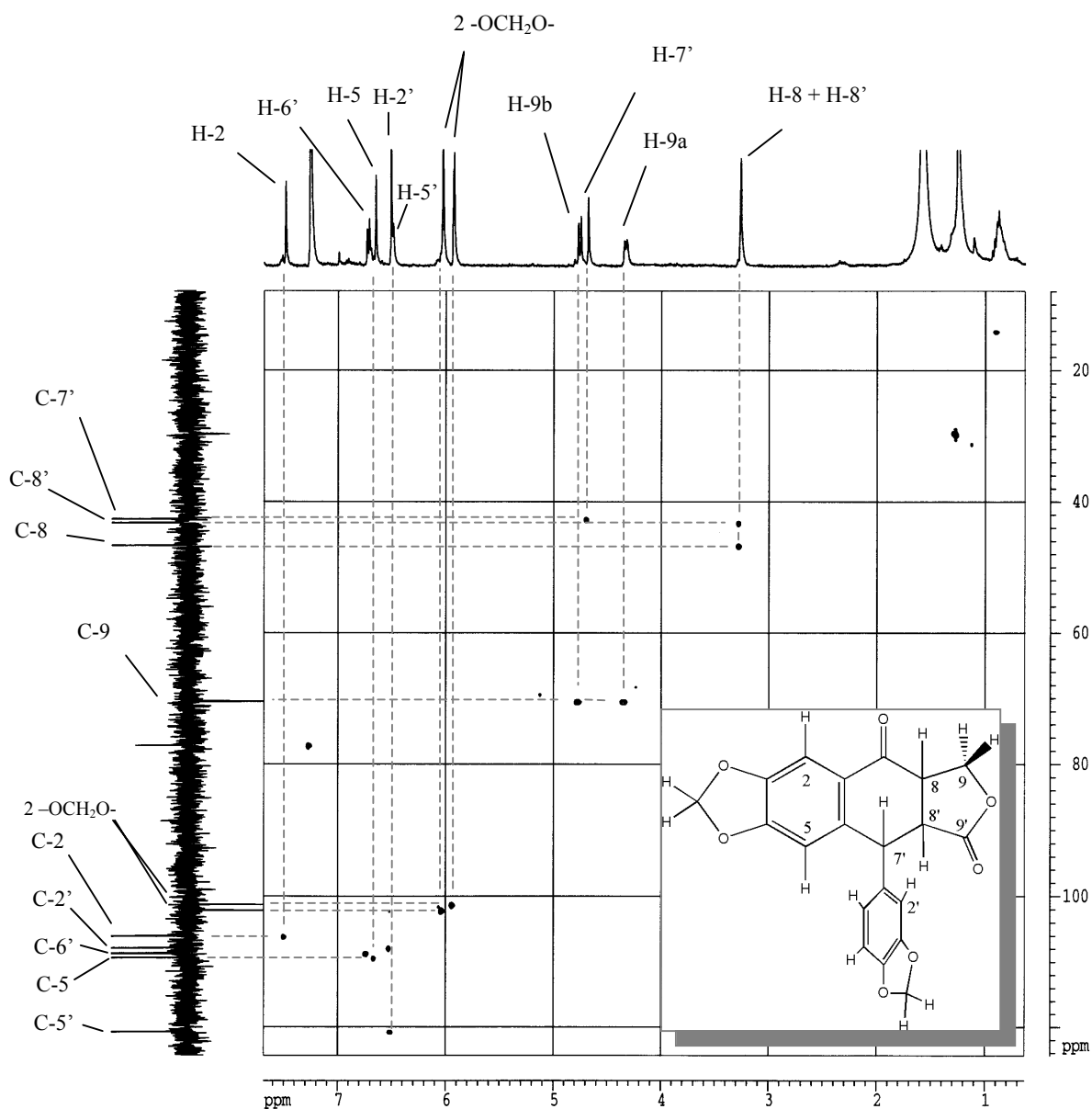


Figura 55. Experimento HSQC del compuesto 48

En el experimento ^1H - ^1H COSY (Fig. 56) se observa cómo uno de los protones del metileno lactónico (H-9a) está acoplado con H-8, cuya señal está incluida en el doblete a δ 3.27. El protón H-8', cuya señal también está incluida en dicho doblete, está acoplado con el singlete a δ 4.68 que corresponde a H-7'.

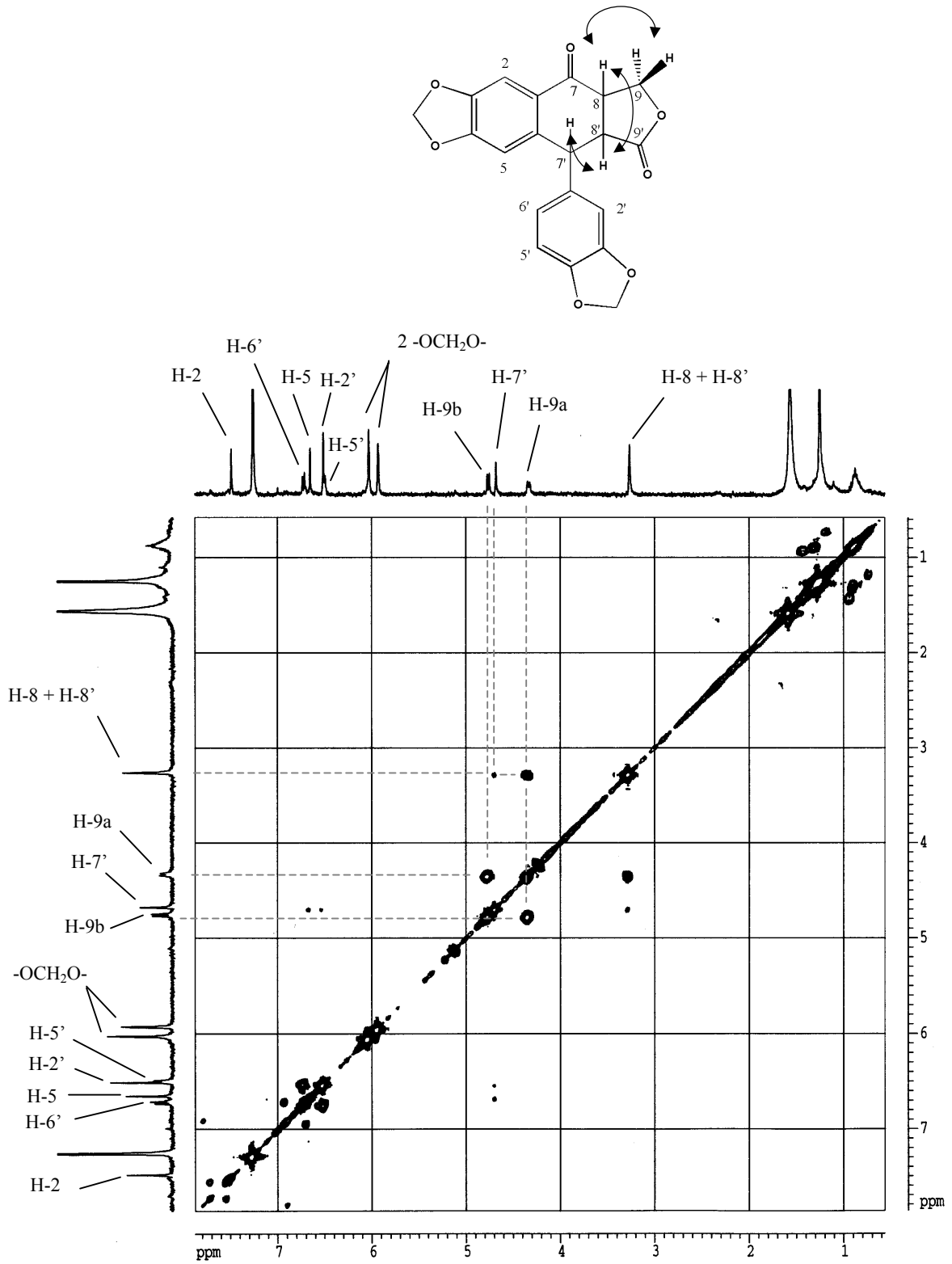


Figura 56. Experimento COSY del compuesto 48

Mediante el experimento HMBC no fue posible asignar de modo preciso las restantes señales de espectro de carbono*, no obstante, la correlación a 3 enlaces entre C-5 y el protón como singlete a δ 4.68 permitió asignar de modo inequívoco este último al protón H-7'.

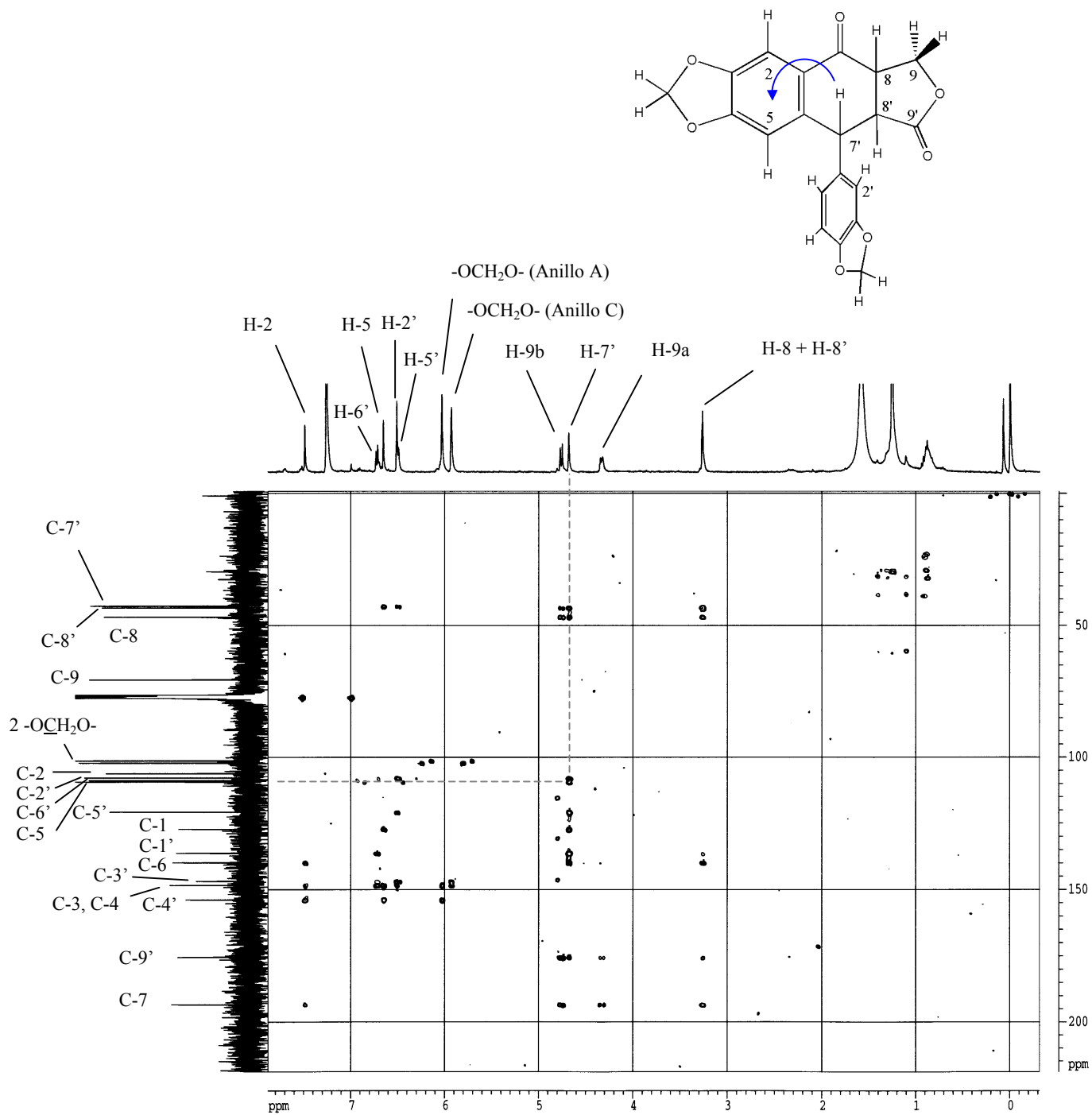


Figura 57. Experimento HMBC del compuesto 48

* Las asignaciones de los carbonos C-3' y C-4' son intercambiables así como las de C-2' y C-5'.

También se aisló, en muy poca cantidad, un compuesto (**49**) de peso molecular 354 uma y con espectro de protón (Fig. 58) muy similar al del compuesto anterior salvo por la presencia de un solo grupo metilendioxi. Este compuesto debe proceder de **48** por pérdida del grupo metilendioxi en el anillo C.

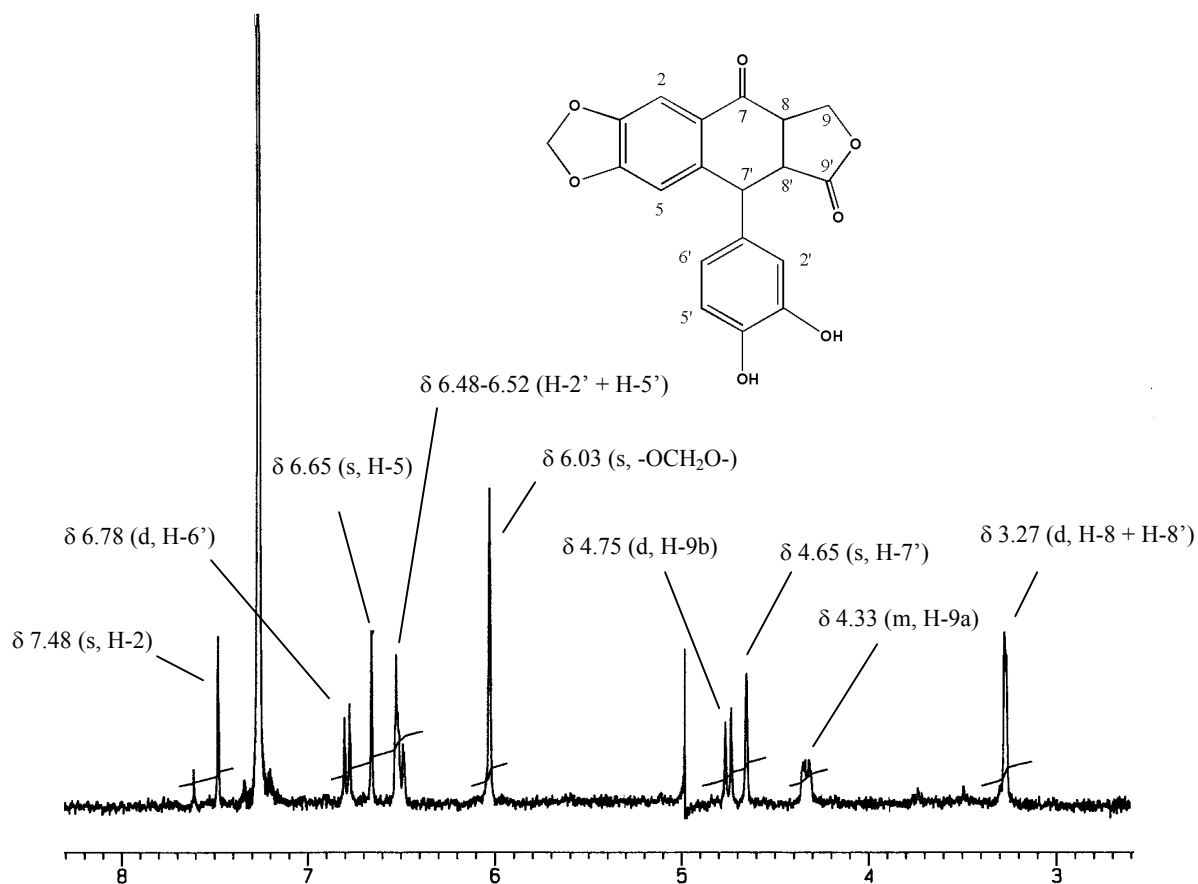
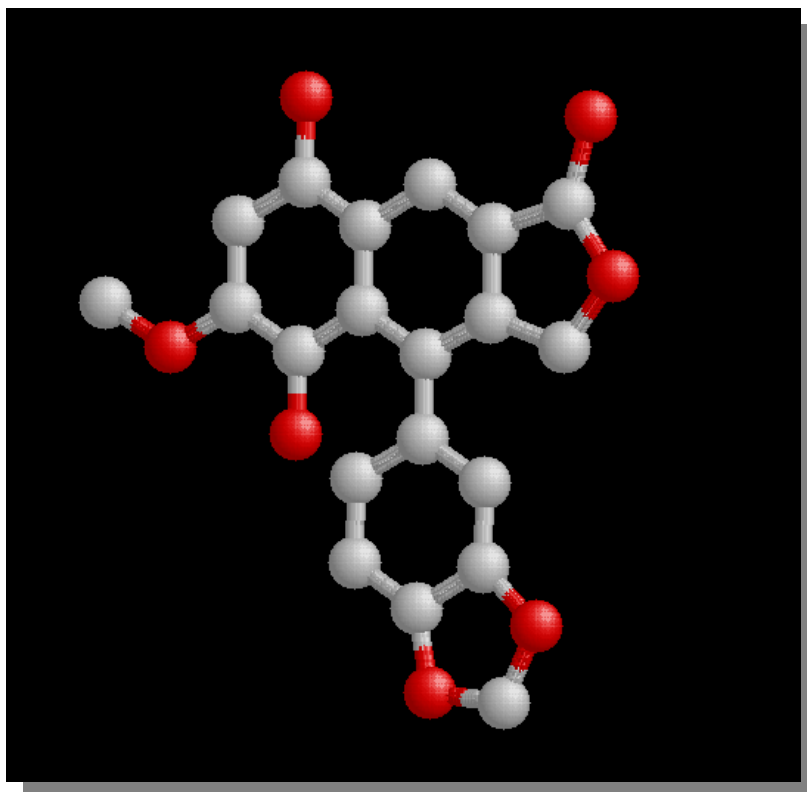


Figura 58. Espectro de ¹H-NMR del compuesto **49**

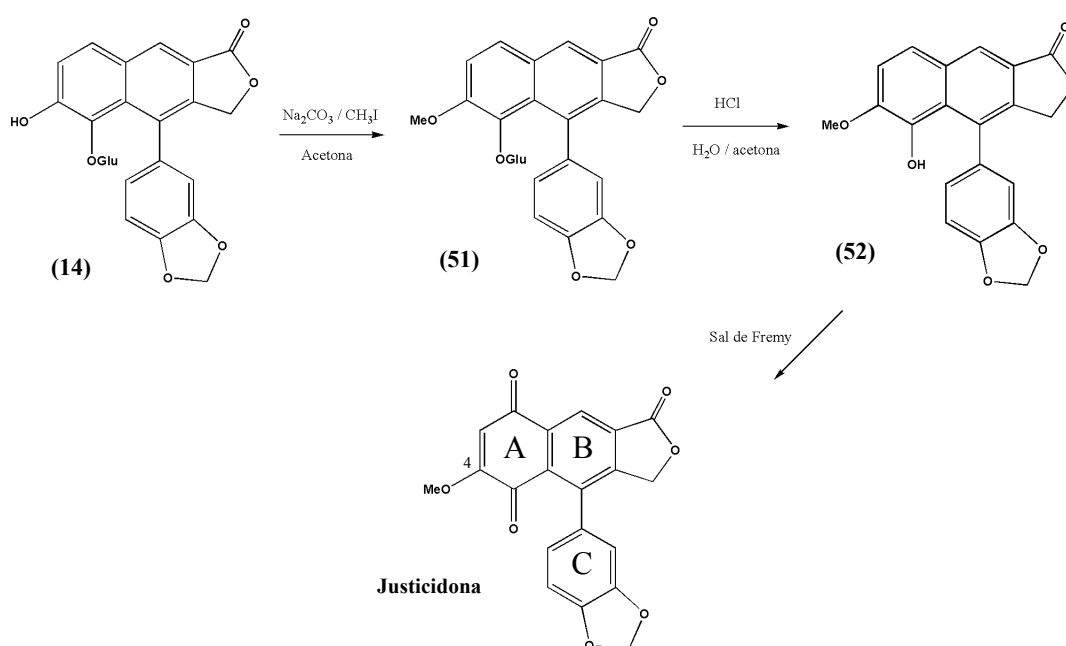
La acetilación de **49** condujo a un producto (**50**) de fórmula C₂₃H₁₈O₉ calculada mediante espectrometría de masas de alta resolución. Su espectro de ¹H-NMR, muy similar al del compuesto **49**, muestra además las señales correspondientes a los dos grupos acetato a δ 2.26 y 2.27.

Capítulo III. Semisíntesis de la justicidona



Parte teórica

Dado que la justicidona podría tener actividades relevantes, se consideró de interés el desarrollo de un método para obtener cantidades relativamente importantes de este compuesto de manera económicamente viable. Por esta razón, se decidió llevar a cabo su semisíntesis a partir de otro lignano, considerándose idóneo como material de partida el glucósido D3 (**14**), (Esq. 30) aislado de *Justicia hyssoipifolia*. Éste es un producto abundante en las fracciones más polares de la planta y debería dar justicidona mediante 3 reacciones bien conocidas y fáciles de llevar a cabo, tal como se muestra en el Esquema 30.



Esquema 30. Semisíntesis de la justicidona

Por otra parte, la obtención de justicidona por oxidación del compuesto **52** con la sal de Fremy³³⁷ proporcionaría una demostración inequívoca de que el grupo metoxilo está sobre C-4 (anillo A) y los dos carbonilos del sistema quinónico sobre C-2 y C-5, lo cual indicaría que la estructura inicialmente propuesta para este lignano es la correcta.

³³⁷ Hadfield J.A., McGown A. T., Butler J. *Molecules*, **5**, 82-8, (2000)

La metilación del compuesto **14** (glucósido D3) se llevó a cabo con yoduro de metilo y carbonato sódico, obteniéndose un producto (**51**) de peso molecular 364 uma. El espectro de $^1\text{H-NMR}$ (Fig. 58), al igual que el del glucósido de partida, resultó complejo, con señales desdobladas. A δ 3.99/4.01 se observan dos singuletes con integral para tres protones y que corresponde al grupo metoxilo. Los protones del metileno lactónico se observan como un triplete centrado a δ 4.93 y dos dobletes a δ 5.24/5.30 con constantes de acoplamiento de 15.0 Hz. La señal compleja observada entre δ 5.98 y 6.10 corresponde al grupo metilendioxi. Las señales de los protones H-2', H-5' y H-6' se observan como cuatro dobletes a δ 6.64/6.66 (1H), 6.84/6.86 (1H) y un multiplete a δ 7.01-7.07 que integra para un protón. Las señales de H-2 y H-3 se observan como dos dobles dobletes con $J=9.0\text{Hz}$ centrados a δ 7.60/7.61 y δ 8.03/8.04, mientras que la de H-7 como singulete a δ 8.40. Las señales restantes pertenecen a la glucosa, observándose dos dobletes a δ 5.08/5.17 con $J=7.6$ Hz que corresponden al protón anomérico.

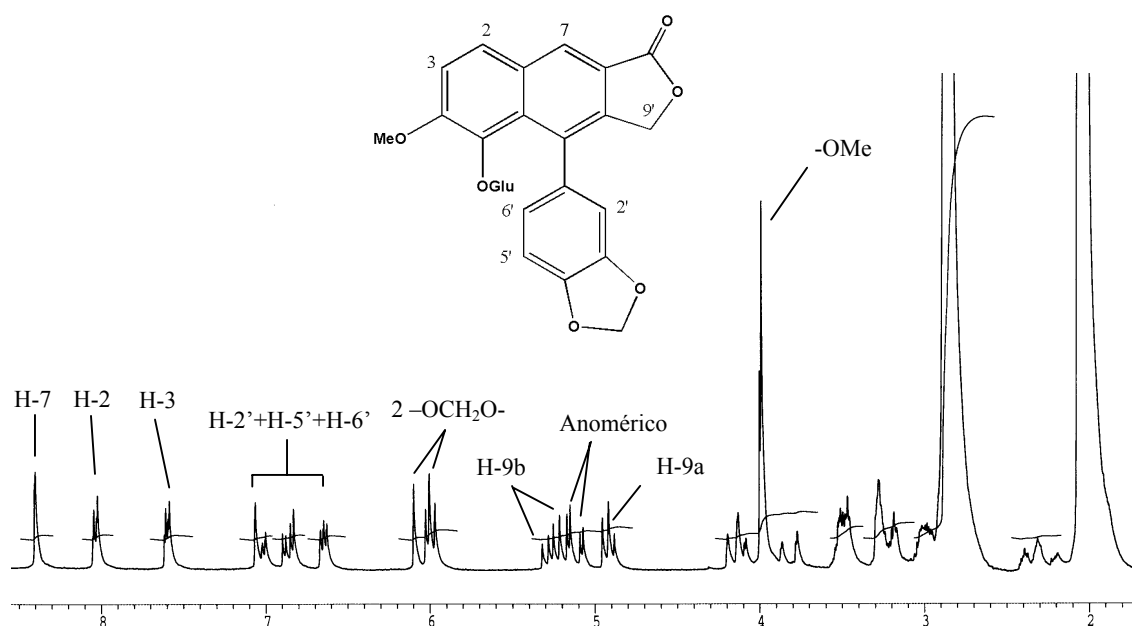


Figura 58. Espectro de $^1\text{H-NMR}$ ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, 400 MHz) de **51**

La hidrólisis ácida de **51** dio lugar a un compuesto (**52**) de peso molecular 350 uma. En el espectro de $^1\text{H-NMR}$ (Fig. 59) se observa un singulete a δ 4.00 que integra para tres protones y que corresponden al metoxilo. Las señales de los dos protones del metileno lactónico se observan como dos dobletes centrados a δ 5.09 y 5.18 con idéntica constante de acoplamiento ($J=15.6$ Hz). Centrado a δ 6.02 como doblete ($J=14.8$ Hz), se encuentra la señal correspondiente a los dos protones del grupo metilendioxi, correspondiendo las señales restantes a los 6 protones aromáticos: entre δ 6.78-6.82 hay una señal compleja que integra para 2 protones, tres dobletes que integran para un protón cada uno centrados a δ 6.89 ($J=7.5$ Hz), 7.38 ($J=8.9$ Hz) y 7.68 ($J=8.9$ Hz) y, finalmente, un singulete que integra para un protón a δ 8.40.

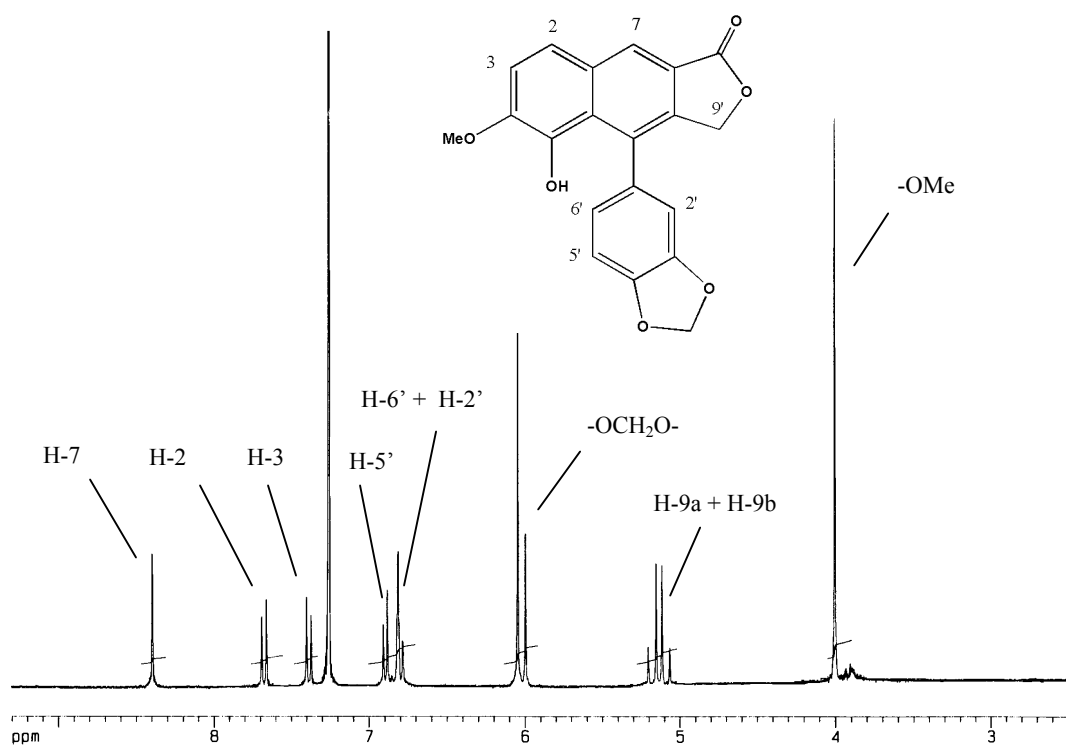
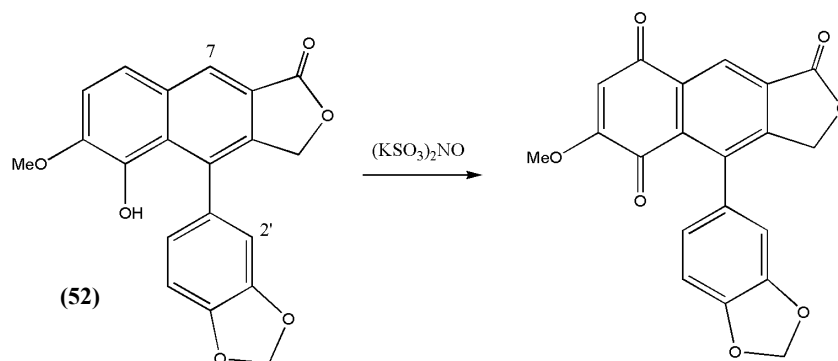


Figura 59. Espectro de $^1\text{H-NMR}$ de **52**

Finalmente, la oxidación de **52** con la sal de Fremy (nitrosodisulfonato potásico) (Esq. 31) condujo a un compuesto con datos espectroscópicos idénticos a los de la justicidona (rendimiento del 76.39 %).



Esquema 31. Oxidación con la sal de Fremy

Las *o*-quinonas pueden exhibir importantes actividades. Tal es el caso de las tanshinonas (Esq. 32) que muestran toda una variedad de actividades biológicas: efectos sobre la función cardiaca^{338,339,340}, actividad antioxidante³⁴¹, citotoxicidad^{342,343,344}, inducción a la apoptosis^{345,346}, actividad leishmanicida y antiplasmodial³⁴⁷ entre otras. La actividad farmacológica del danshen (Tang-Seng), preparado fabricado a partir de las raíces de *Salvia miltiorrhiza* (Lamiaceae) y empleado en la medicina tradicional china, se atribuye principalmente a estas quinonas.

³³⁸ Zhou W., Ruigrok T.J. *Am. J. Chem. Med.*, **18**, 19-24, (1990)

³³⁹ Takeo S., Tanonaka K., Hirai K., Kawaguchi K., Ogawa M., Yagi A., Fujimoto K. *Biochem. Pharmacol.*, **40**, 1137-43, (1990)

³⁴⁰ Zhou G.Y., Zhao B.L., Hou J.W., Ma G.E., Xin W.J. *Pharmacol. Res.*, **40**, 487-91, (1999)

³⁴¹ Weng X.C., Gordon M.H. *J. Agric. Food Chem.*, **40**, 1331-6, (1992)

³⁴² Wu W.L., Chang W.L., Chen C.F. *Am. J. Chin. Med.*, **19**, 207-16, (1991)

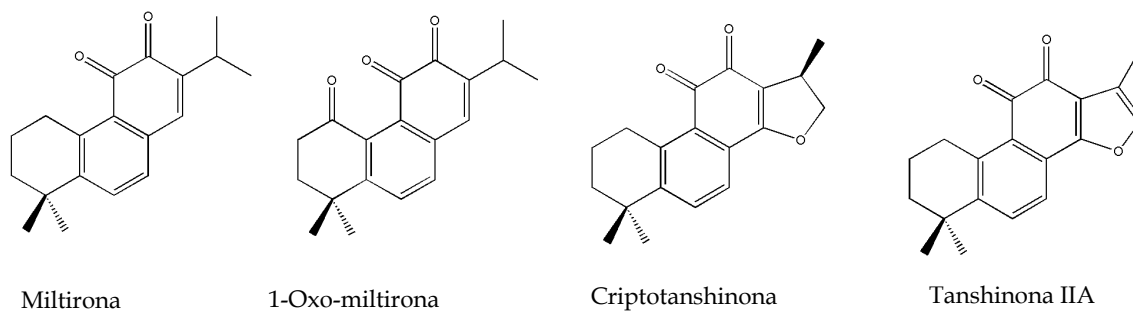
³⁴³ Ryu S.Y., Lee C.O., Choi S.U. *Planta Med.*, **63**, 339-42, (1997)

³⁴⁴ Wang X., Yuan S., Wang C., Huang R., Li Y. *Chin.J. Cancer Res.*, **10**, 100-3, (1998)

³⁴⁵ Yoon Y., Kim Y.-O., Jeon W.-K., Park H.-J., Sung H.J. *J. Ethnopharmacol.*, **68**, 121-7, (1999)

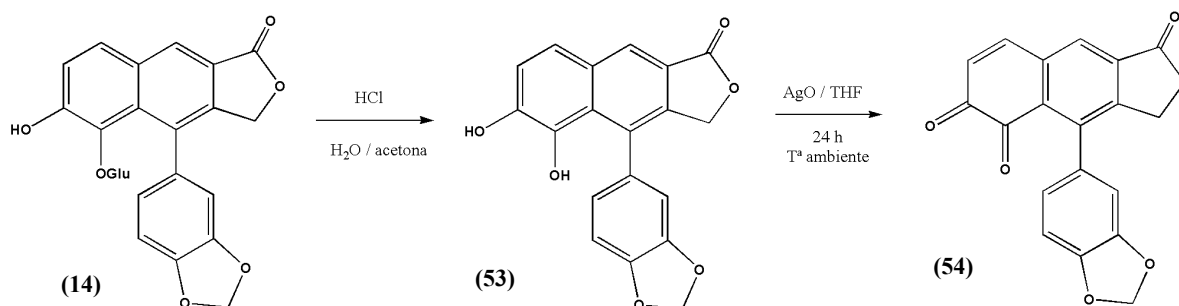
³⁴⁶ Sung H.J., Choi S.M., Yoon Y., An K.S. *Exp. Mol. Med.*, **31**, 174-8, (1999)

³⁴⁷ Sairafiangpour M., Christensen J., Stae D., Budnik B.A., Kharazmi A., Bagherzadeh K., Jaroszewski J.W. *J. Nat Prod.*, **64**, 1398-1403, (2001)



Esquema 32. Tanshinonas

Por lo tanto, se consideró interesante oxidar la genina del glucósido D3 (**53**) (Esq. 33) para obtener la correspondiente *o*-quinona (**54**) y así poder evaluar sus posibles actividades.

Esquema 33. Semisíntesis de la *o*-quinona 54

La hidrólisis ácida del glucósido D3 (**14**) dio lugar a la correspondiente aglicona (**53**) de peso molecular 336 uma y fórmula $\text{C}_{19}\text{H}_{12}\text{O}_6$. El espectro de $^1\text{H-NMR}$ ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) (Fig. 60) muestra dos dobletes centrados a δ 5.09 y 5.16, con idéntica constante de acoplamiento ($J=14.9$ Hz) y que se corresponden con los dos protones del metileno lactónico. La señal del grupo metilendioxi se observa como singulete con integral para dos protones a δ 6.04, correspondiendo las restantes señales a los protones aromáticos. Con un desplazamiento comprendido entre δ 6.84 y 6.91 se observa una señal compleja que integra para tres protones y que corresponde con H-2', H-5' y H-6'. Centrados a δ 7.36 y 7.66 se observan dos dobletes con $J=8.79$ Hz y que corresponden a los protones H-3 y H-2 respectivamente. La señal del protón H-7 se observa como singulete a δ 8.32.

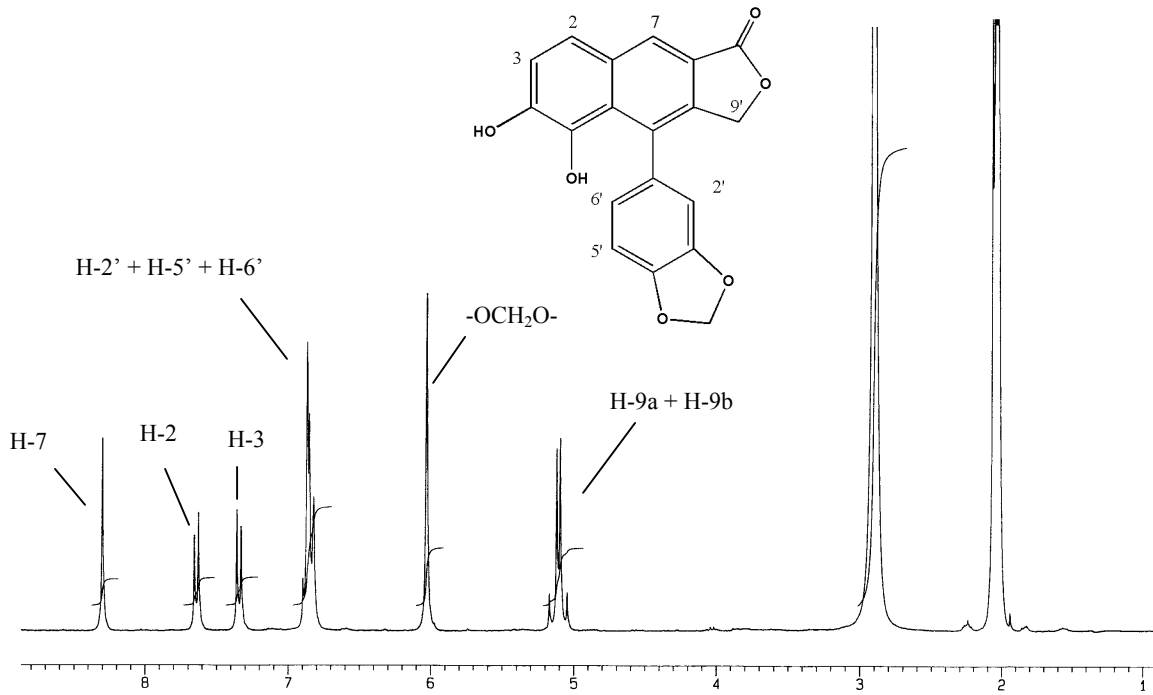


Figura 60. Espectro de ¹H-NMR ((CD₃)₂CO) de 53

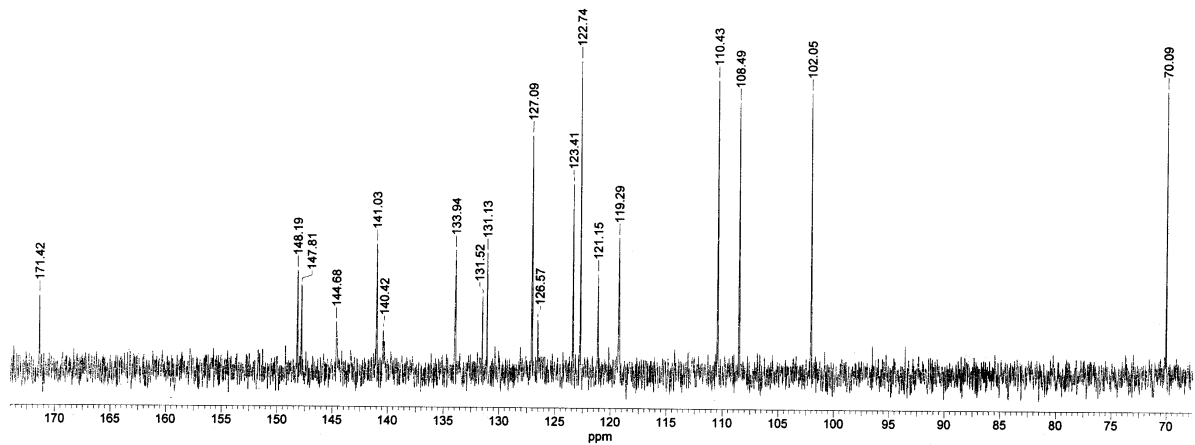


Figura 61. Espectro de ¹³C- NMR ((CD₃)₂CO) de 53

La oxidación con óxido de plata (II) del compuesto **53** condujo a un compuesto (**54**) de color pardo, de peso molecular 334 uma y fórmula $C_{19}H_{10}O_6$, determinada mediante espectrometría de masas de alta resolución. El espectro de 1H -NMR ($CDCl_3$ a 400 MHz) (Fig. 62) muestra un doblete centrado a δ 5.13 (2H) con $J=10.12$ Hz que corresponde a los dos protones del metileno lactónico, un singulete a δ 6.05 (2H) debido al grupo metilendioxi, un doblete a δ 6.59 (1H) con $J=10.16$ Hz, una señal compleja entre δ 6.61 y 6.64 que integra para 2 protones, dos dobletes centrados a δ 6.90 (1H) con $J=8.32$ Hz y 7.62 (1H) con $J=10.18$ Hz y un singulete a δ 7.90 con integral para un protón.

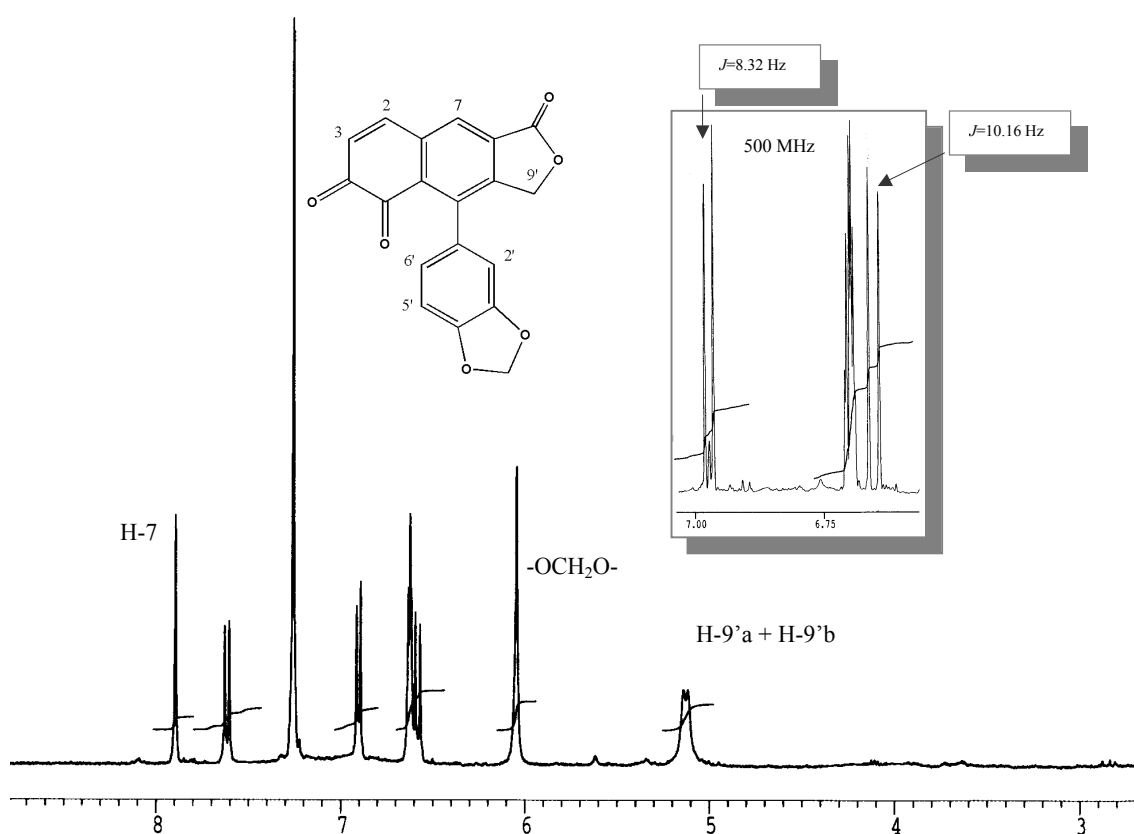
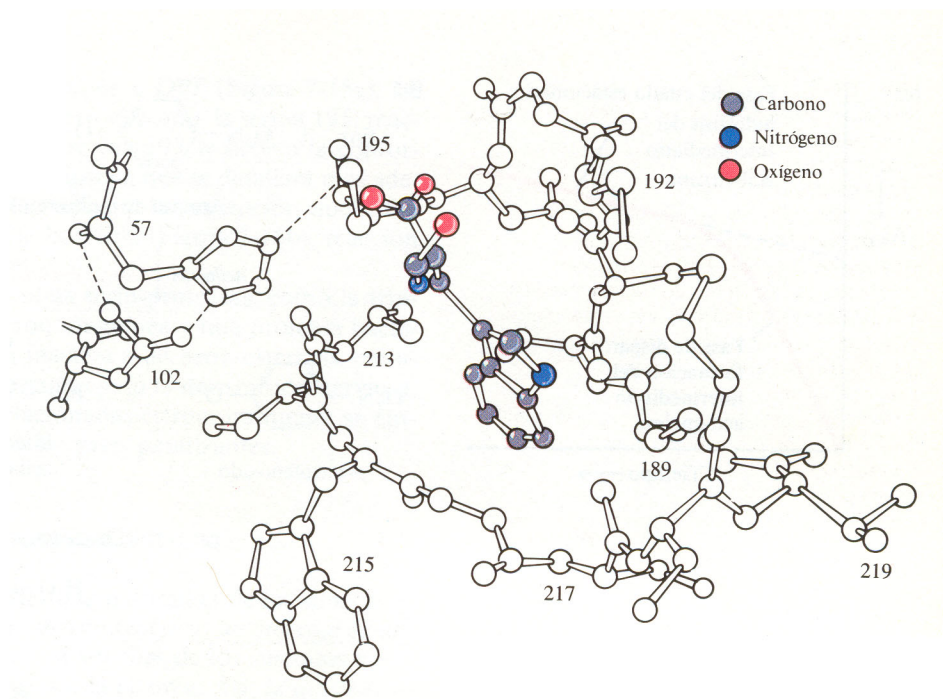


Figura 62. Espectro de 1H -NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) de **54**

Hemos observado que la genina del glucósido D3 (**53**) se oxida lenta y espontáneamente a la *o*-quinona **54**. Es posible que este compuesto se encuentre presente en *Justicia hyssopifolia* y que se biosintetice a partir de la genina de dicho glucósido.

Capítulo IV.

Catálisis enzimática en disolventes orgánicos



Formil L-triptófano (análogo de sustrato) unido al sitio activo de la quimotripsina.
Rawn J.D., Bioquímica, vol. I, p.159, 1989

Introducción

Parte teórica

En los últimos quince años, el empleo de enzimas en síntesis orgánica se ha convertido en una alternativa importante a los métodos químicos convencionales. De hecho, las enzimas exhiben con frecuencia alta quimio, regio y enantioselectividad, lo que las hace especialmente atractivas en farmacología y agroquímica, en donde el interés por los productos enantioméricamente puros y específicamente funcionalizados está continuamente creciendo. Además, las reacciones catalizadas por enzimas se llevan a cabo generalmente en condiciones suaves (temperatura ambiente y pH neutro), lo cual minimiza problemas de racemización, epimerización o isomerización. A su vez, las enzimas son catalizadores eficaces capaces de aumentar la velocidad de una reacción hasta 10^{12} veces. Por último, los procesos biocatalíticos son menos peligrosos, polucionan menos y consumen menos energía que los métodos químicos convencionales, sobre todo cuando éstos implican el uso de metales pesados.

Hasta mediados de la década de los ochenta, se consideraba casi un dogma que las enzimas sólo podían ejercer su poder catalítico en medio acuoso y, de hecho, todo lo que se sabía acerca de catálisis enzimática se había aprendido de estudios llevados a cabo en ese medio. La idea de que puedan ejercer su actividad en otro disolvente parecía ridícula, puesto que esta actividad depende de su estructura terciaria (conformación) que, a su vez, es el resultado de un sutil equilibrio entre interacciones no covalentes en las cuales participa el agua³⁴⁸. La ausencia de agua alteraría radicalmente la conformación de la enzima y ésta perdería su poder catalítico.

No obstante, para A.M. Klibanov³⁴⁹ este razonamiento no es completo, puesto que la cuestión clave no es si el agua es necesaria para la actividad catalítica, sino qué cantidad de agua se precisa. La enzima sólo puede “ver” una monocapa de moléculas de agua que, de alguna manera, está localizada sobre su superficie y que es esencial para la conformación y la actividad. Este razonamiento es consistente con los datos sobre hidratación de proteínas secas³⁵⁰. Por tanto, la sustitución del resto del agua por un disolvente orgánico, ¿alteraría la conformación?, ¿se perdería la actividad?

Para contestar a estas preguntas, Klibanov³⁴⁹ utilizó dos proteasas, α -quimotripsina pancreática y subtilisina Carlsberg. Estas enzimas hidrolíticas deberían catalizar la reacción de transesterificación entre un éster y un alcohol en disolventes

³⁴⁸ Creighton T.E. en “Proteins: Structure and Molecular Properties”, Cap.4, Freeman, (1983)

³⁴⁹ Klibanov A.M. *Trends Biochem. Sci.*, (14), 141-4, (1989)

³⁵⁰ Rupley J.A., Gratton E., Careri G. *Trends Biochem. Sci.*, (8), 18-22, (1983)

orgánicos anhidros, entendiendo por anhidro aquel que contuviera por debajo del 0.01% en agua. La elección de esas dos enzimas se debía a que precisamente utilizaban agua como sustrato y que, por tanto, su funcionamiento en medios no acuosos podría extrapolarse a otras enzimas que no la precisaran.

Los resultados fueron sorprendentes. No sólo los enzimas poseen actividad en disolventes orgánicos anhidros, sino que en este medio no natural adquieren nuevas propiedades: son más estables térmicamente, exhiben diferentes especificidades para sus sustratos y diferente especificidad enantiomérica, adquieren “memoria molecular” y catalizan reacciones poco usuales.

Los estudios de Klibanov et al.³⁵¹ revelaron que, para asegurar la actividad enzimática en disolventes orgánicos, deberían seguirse determinadas reglas. En primer lugar, la naturaleza del disolvente es crítica: los mejores medios de reacción son los hidrofóbicos³⁵². Por ejemplo, para la quimotripsina la k_{cat}/K_m en octano es 10^4 veces mayor que en piridina. Se sugería que este hecho era debido a que los disolventes hidrofílicos despojaban a la enzima de su agua esencial para la actividad. Esta hipótesis fue confirmada midiendo la cantidad de agua que permanece sobre el enzima después de incubarla con un determinado disolvente: a mayor hidrofilia del disolvente, menor cantidad de agua es retenida por la enzima. Además, la adición de agua (1.5%) a acetona, por ejemplo, da como resultado que la enzima retenga más agua y que la actividad aumente más de 1000 veces.

La segunda regla es que las enzimas que van a ser usadas en disolventes orgánicos deben ser liofilizadas o precipitadas de soluciones acuosas al pH óptimo para su actividad. Los grupos ionizables de la enzima adquieren el estado de ionización correspondiente al pH de la solución acuosa y este estado de ionización debe ser mantenido en el disolvente orgánico.

Por último, debido a la insolubilidad de los enzimas en esos medios³⁴⁸, los problemas de difusión y heterogeneidad deben solventarse por medio de ultrasonidos o agitación vigorosa.

La eficacia de la catálisis en estos medios fue determinada³⁵² para la quimotripsina y la subtilisina. Usando la reacción modelo de transesterificación, puede verse cómo la relación entre las constantes bimoleculares de reacción enzimática y la

³⁵¹ Klibanov A. M. *Chemtech.*, **16**, 354-9, (1986)

³⁵² Zaks A. y Klibanov A.M. *J. Biol. Chem.*, **263**, 3194-201, (1988)

espontánea es de 10^{10} - 10^{11} . Además, las enzimas preinactivadas térmicamente o por modificación del centro activo fueron inactivas en medios orgánicos. También fueron comparadas las actividades de la alcoholdehidrogenasa y de la tirosinasa en agua y en disolventes orgánicos. Las dos enzimas apenas fueron activas en estos últimos, pero la adición de un pequeño porcentaje de agua (todavía por debajo de la solubilidad de la enzima) aumentó la actividad hasta hacerla comparable a la observada en agua.

Las transesterificaciones catalizadas por quimotripsina y subtilisina en disolventes orgánicos siguen la cinética de Michaelis-Menten³⁵², indicando la formación del complejo enzima-sustrato.

Nuevas propiedades de las enzimas en medios orgánicos

I.- Especificidad por el sustrato

Está bien establecido que el enlace es la fuerza que dirige la catálisis molecular^{353,354}. La energía de enlace de una enzima con un sustrato está determinada por la diferencia de energía entre el complejo enzima-sustrato y la energía de la enzima y el sustrato interaccionando con el disolvente³⁵³, es decir, el enlace está siempre influenciado por el disolvente. Zaks y Klibanov³⁵⁵ encontraron que la especificidad por el sustrato de quimotripsina, subtilisina y esterasa cambia dramáticamente al sustituir el medio acuoso de la reacción por el medio orgánico. En concreto, la especificidad de la quimotripsina (enlace peptídico con un grupo hidrofóbico por el lado N-terminal) en agua es la contraria en octano (enlace peptídico con un grupo hidrofílico por el lado N-terminal). Para la quimotripsina, las interacciones hidrofóbicas en agua contribuyen significativamente al enlace enzima-sustrato³⁵⁶. Sobre la base de ello se sugirió que el cambio en la especificidad se debía a la falta de interacciones hidrofóbicas en medios no acuosos.

Gaertner y Puigserver³⁵⁷ obtuvieron resultados cualitativamente similares con quimotripsina, tripsina y subtilisina, modificadas con polietilenglicol en benceno. Mientras que k_{cat}/K_M para quimotripsina en agua variaba en más de tres órdenes de magnitud, cuando se pasaba de aminoácidos aromáticos a básicos, en benceno, los

³⁵³ Fersht A. "Enzyme Structure and Mechanism", 2nd ed. W.H Freeman and Co., New York, (1985)

³⁵⁴ Menger F.M. *Acc. Chem. Res.*, **26**, 206-12, (1993)

³⁵⁵ Zaks A. y Klibanov A.M. *J. Amer. Chem. Soc.*, **108**, 2767-8, (1986)

³⁵⁶ Dorovska V.N., Varfolomoyev S.D., Kazanskaya N.F. *FEBS Lett.*, **23**, (1), 122-4, (1972)

³⁵⁷ Gaertner H. and Puigserver A. *Eur. J. Biochem.*, **181**, 207-13, (1989)

valores de $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ eran aproximadamente los mismos. Además, el N-Bz-Lys-OMe, que es hidrolizado en agua a una velocidad 15 veces menor que el N-Bz-Tyr-OEt, llega a ser tres veces más reactivo en benceno. Estos mismos autores demostraron que la especificidad para inhibidores específicos del centro activo es también la contraria para el caso de la quimotripsina. Así, el fluoruro de fenilmetilsulfonilo, que reacciona con la serina del centro activo e inactiva rápidamente la enzima en agua, no tiene efecto en benceno. Por el contrario, el fluoruro de (4-amidinofenil)-metanosulfonilo, más hidrofílico, inactiva completamente la enzima en tres horas en un medio no acuoso.

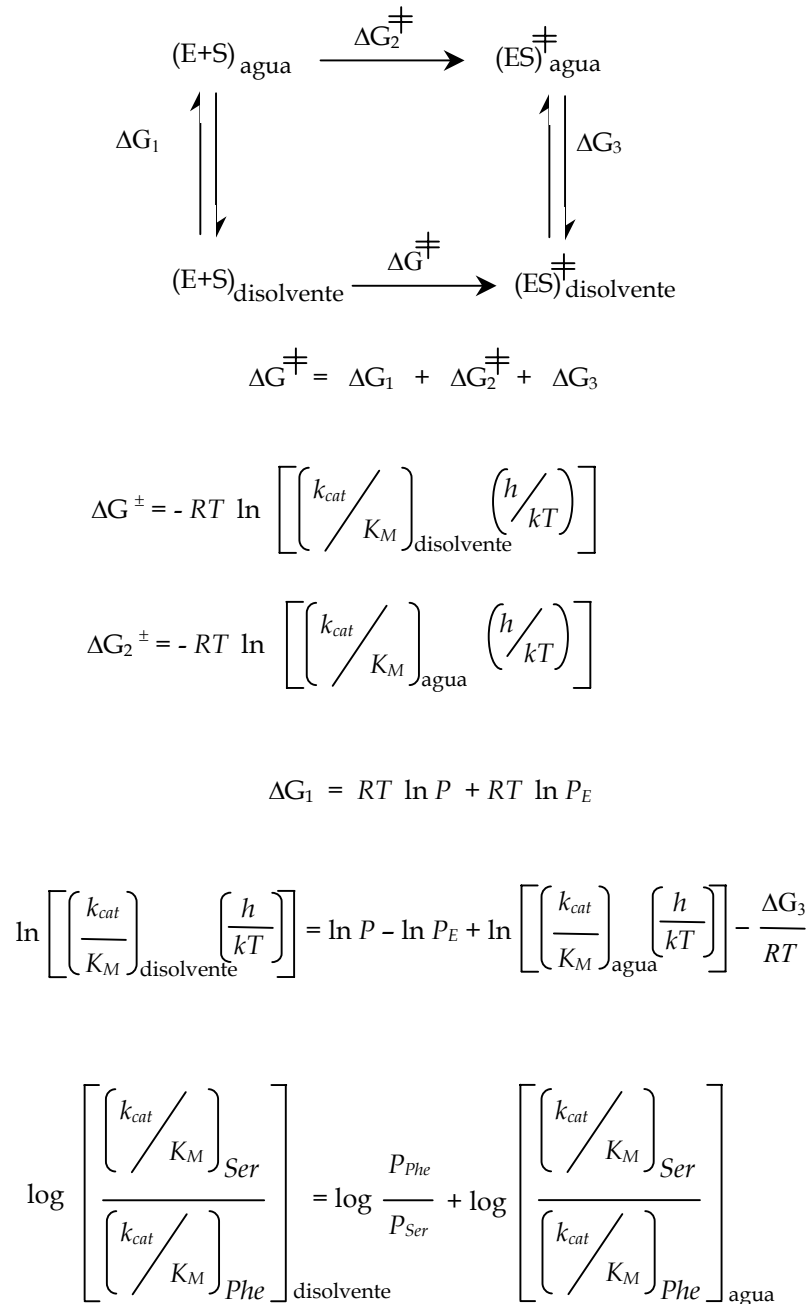
Los resultados de otros experimentos parecidos con resultados análogos a los anteriores^{358,359}, son también achacados a la falta de interacciones hidrofóbicas en los medios orgánicos.

Wescott y Klibanov³⁶⁰ han desarrollado un modelo termodinámico que puede predecir la especificidad por el sustrato de la subtilisina Carlsberg en medios orgánicos, sobre la base de la especificidad en agua y de las características físico-químicas del disolvente. Estos autores determinaron $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ para la transesterificación de N-acetil-L-fenilalanina y N-Acetil-L-serina con propanol, en 20 disolventes anhidros y encontraron que la relación $[k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}]_{\text{Ser}}/[k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}]_{\text{Phe}}$ variaba 68 veces. Racionalizaron sus resultados sobre la base del ciclo termodinámico mostrado en el Esquema 1.

³⁵⁸ Clapes P., Adlercreutz P. *Biochim. Biophys. Acta*, **1118**, 70-6, (1991)

³⁵⁹ Gololobov M.Y., Voyushina T.L., Stepanov V.M., Adlercreutz P. *FEBS Lett.*, **307** (3), 309-12, (1992)

³⁶⁰ Wescott C.R., Klibanov A.M. *J. Amer. Chem. Soc.*, **115**, 1629-31, (1993)



Esquema 1. Ciclo termodinámico

En este desarrollo h , k , P y P_E son la constante de Plank, la constante de Boltzman y los coeficientes de partición disolvente/agua, del sustrato y la enzima respectivamente. Para llegar a la ecuación final se ha supuesto que $\Delta G_{3,\text{Ser}} = \Delta G_{3,\text{Phe}}$.

Esta ecuación final nos permite relacionar la razón de los parámetros de especificidad para dos sustratos en cualquier disolvente con la del agua, siempre que

los coeficientes de partición de los dos sustratos sean conocidos. Puesto que el modelo se basa en el análisis termodinámico, que es independiente de la enzima, debería ser aplicable a cualquier par enzima-sustrato.

El uso de la ingeniería genética en combinación con la catálisis en medios no acuosos, ha resultado ser una poderosa herramienta para alterar la especificidad por el sustrato de las enzimas. Wangikar et al.³⁶¹ han demostrado que el efecto de mutaciones específicas en el centro activo, sobre la especificidad de subtilisina BNP', depende de la naturaleza del medio orgánico. La mutación polar en el centro activo (Gly166Asn) redujo 30 veces k_{cat}/K_M para la transesterificación de N-Ac-L-Ser-OEt con *n*-propanol en acetona. Sin embargo, la misma mutación activó la enzima en un factor de 4.5 en hexano. Los autores proponen que el efecto es debido a una estabilización significativa del estado de transición por una mutación polar en un disolvente no polar. Así, algunas mutaciones que tienen efectos negativos en medios acuosos mejoran la actividad en medios no acuosos.

Aunque los efectos del medio sobre la especificidad han sido demostrados para las lipasas y proteasas, algunos estudios indican que el fenómeno no está limitado a las enzimas hidrolíticas. Por ejemplo, para fenoles *para*-sustituidos, se ha visto que la dependencia de la hidrofobicidad que muestran los parámetros V_{max}/K_M , de la peroxidasa de raíz de rábano, es diferente en disolventes orgánicos que en agua³⁶².

Así como la naturaleza del disolvente tiene efecto inmediato sobre la especificidad, hay otros métodos para alterarla en un disolvente dado. La liofilización de subtilisina y quimotripsina de soluciones acuosas que contengan inhibidores competitivos³⁶³, no sólo aumenta la actividad de la enzima en un factor de 100 sino que también cambia la especificidad. Se sugiere que cuando un ligando enlaza a una enzima en solución acuosa, induce cambios conformacionales (análogos a los que producen los reguladores alostéricos) que permanecen durante la liofilización y luego en un determinado disolvente cuando se elimina el ligando.

³⁶¹ Wangikar P.P., Graycar T.P., Estell D.A. *J. Amer. Chem. Soc.*, **115**, 12231-7, (1993)

³⁶² Ryu K., Dordick J.S. *Biochemistry*, **31**, 2588-98, (1992)

³⁶³ Russell A.J., Klivanov A.M. *J. Biol. Chem.*, **263**, 11624-6, (1988)

2.-Esteroselectividad

La enantioselectividad, que es quizás el aspecto más atractivo de la catálisis enzimática, surge de la especial habilidad de las enzimas para diferenciar entre los enantiómeros de un par racémico. Esta capacidad se basa en la diferencia de energía libre de los estados de transición diastereoisoméricos para los dos enantiómeros. Aunque la mutagénesis se ha usado³⁶⁴ para alterar la enantioselectividad de las enzimas, pocos métodos han resultado ser tan versátiles como el uso de disolventes no acuosos³⁶⁵. Margolin et al.³⁶⁶ informaron de la diferencia de enantioselectividad de la subtilisina en disolventes orgánicos con respecto al agua, lo cual les permitió la incorporación de D-aminoácidos en péptidos en condiciones no acuosas. Una investigación mecanicista detallada de este fenómeno³⁶⁷ reveló que la enantioselectividad de las subtilisinas Carlsberg y BNP', elastasa, proteasa α -lítica, α -quimotripsina y tripsina fueron más bajas en medio no acuoso. Además, existía una correlación inversa entre la enantioselectividad de la subtilisina en la transesterificación de cloroetilo de N-acetilalanina y propanol y la hidrofobicidad del disolvente; esto es, cuanto más alta es la hidrofobicidad del disolvente más baja es la enantioselectividad de la enzima. Estos hallazgos fueron racionalizados sobre la base de que la unión del sustrato a la enzima va acompañada de la separación de moléculas de agua del centro activo³⁶⁸. El enlace "productivo" de D-aminoácidos no implica la incorporación de la cadena lateral en el "bolsillo" hidrofóbico del enzima y así dicho enlace produce la salida de muy pocas moléculas de agua en comparación con la incorporación del L-isómero. Los autores concluyen, que puesto que la salida de moléculas de agua hacia un disolvente hidrofóbico es termodinámicamente desfavorable, la reactividad del L-enantiómero en esos disolventes disminuye en mayor medida que la del D-enantiómero. El modelo predecía que la diferencia de enantioselectividad en agua y disolventes orgánicos debería ser más alta para los sustratos con cadenas laterales voluminosas. Éste resultó ser el caso.

³⁶⁴ Ozaki S.I. y Ortiz de Montellano P.R. *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 4487-8, (1994)

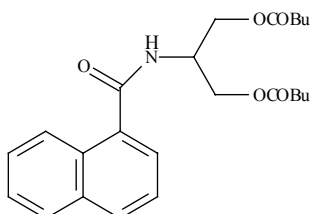
³⁶⁵ Klivanov A.M. *Acc. Chem. Res.*, **23**, 114-20, (1990)

³⁶⁶ Margolin A.L., Tai D-F., Klivanov A.M. *J. Amer. Chem. Soc.*, **109**, 7885-7, (1987)

³⁶⁷ Sakurai T., Margolin A.L., Russell A.J., Klivanov A.M. *J. Amer. Soc.*, **110**, 7236-7, (1988)

³⁶⁸ Dewar M.J.S., Storch D.M. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **82**, 2225-9, (1985)

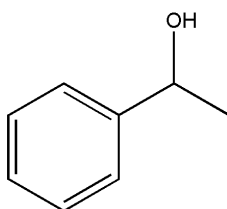
Esta correlación inversa enantioselectividad-hidrofobicidad se encontró también para la esterificación de ácido 2-cloroetilpropiónico con *n*-butanol³⁶⁹, catalizada por lipasa de *Candida cylindracea* y para la hidrólisis del compuesto **1** (Esq. 2), catalizada por lipasa de *Pseudomonas*³⁷⁰.



Esquema 2. Compuesto 1

En este último caso la selectividad proquiral de la enzima varió desde >30 en acetonitrilo a 2.6 en tetracloruro de carbono. Los autores emitieron la hipótesis de que, en el “modo” estereoselectivo de enlace, el bolsillo hidrofóbico de la lipasa está ocupado por el resto de naftilo. En el “modo” no-estereoselectivo, este resto se reparte entre la enzima y el disolvente y así el sustrato diéster puede estar orientado en las configuraciones *pro-R* o *pro-S* con igual probabilidad. Puesto que es termodinámicamente favorable para el resto naftilo hidrofóbico estar en el bolsillo hidrofóbico de la enzima cuando se utiliza un disolvente hidrofílico, prevalece en este caso el modo estereoselectivo.

Alternativamente, Sakurai et al.³⁷¹ estudiando la transesterificación del butirato de vinilo con el *sec*-fenetilalcohol (**2**) catalizada por subtilisina, encontraron que la correlación enantioselectividad-hidrofobicidad del disolvente era muy pobre.



Esquema 3. *sec*-Fenetilalcohol (**2**)

³⁶⁹ Gubicza L., Kelemen-Hovàrth I. *J. Mol. Catálisis*, **84**, L27-L32, (1993)

³⁷⁰ Terradas F., Teston-Henry M., Fitzpatrick P.A., Klibanov A.M. *J. Amer. Chem. Soc.*, **115**, 390-6, (1993)

En vez de ello, el factor de enantioselectividad $(k_{cat}/K_M)_S/(k_{cat}/K_M)_R$ correlacionaba bien con el momento dipolar y la constante dieléctrica del medio. Esta disparidad se atribuyó a que los sustratos enlazan a diferentes sitios de la enzima. Así, se introdujo un nuevo modelo que explicaba el efecto del disolvente sobre la selectividad para el alcohol. El modelo implicaba la presencia de dos bolsillos en el sitio de enlace de la subtilisina, uno mayor que otro. Los autores sugirieron que el enlace del enantiómero menos reactivo de **2**, creaba un alto impedimento estérico entre el grupo naftilo y el bolsillo pequeño de la enzima. Así, una disminución en la rigidez de la proteína que redujera este impedimento estérico, aumentaría la reactividad del enantiómero menos reactivo en mayor grado que la del enantiómero más reactivo, ya que este último no está sujeto a impedimentos estéricos. Entonces, puesto que la rigidez de una proteína se debe principalmente a interacciones electrostáticas y enlaces de hidrógeno, ésta es más alta en disolventes con baja constante dieléctrica (por ej. dioxano) que en los de alta constante dieléctrica (acetonitrilo). Así, la enantioselectividad en acetonitrilo es más alta.

La validez de este modelo fue sustentada por experimentos de modelización molecular con ordenador, que revelaron que el grupo fenilo del S-enantiómero de **2** ocupaba el espacio abierto del centro activo, mientras que el grupo metilo ocupaba una pequeña cavidad en dicho sitio³⁷². El enlace del R-enantiómero fue justamente al contrario.

No obstante, aunque los modelos hasta ahora sugeridos explican el efecto del disolvente sobre la enantioselectividad para la subtilisina Carlsberg, no son en absoluto universales. Por ejemplo, la hidrofobicidad del disolvente tiene un efecto muy minoritario sobre la enantioselectividad de la lipasa pancreática en la transesterificación de butirato de trifluoroetilo con 2-octanol y 1-feniletanol³⁷³. El factor de enantioselectividad en la transesterificación del 2,2,2-trifluoretil éster de Z-norvalina con metanol catalizada por lipasa de *Pseudomonas cepacia*, varía desde 1 en DMF (dimetilformamida) hasta 45 en benceno. Sin embargo, no se encuentra correlación entre hidrofobicidad de disolvente y selectividad de la lipasa³⁷⁴.

³⁷¹ Fitzpatrick P.A., Klivanov A.M. *J. Amer. Chem. Soc.*, **113**, 3166-71, (1991)

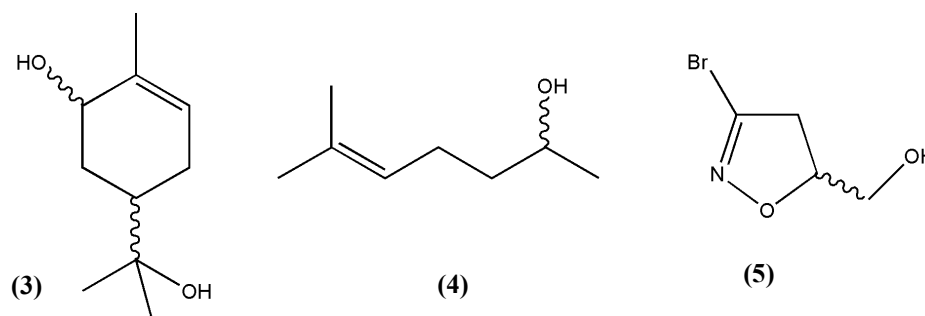
³⁷² Fitzpatrick P.A., Ringe D., Klivanov A.M. *Biotechnol. Bioeng.*, **40**, 735-42, (1992)

³⁷³ Kanerva L.T., Vihanto J., Halme M.H. *Acta Chem. Scand.*, **44**, 1032-5, (1990)

³⁷⁴ Miyazawa T., Mio M., Watanabe Y. *Biotechnol. Lett.*, **14** (9), 789-94, (1992)

Nakamura et al.³⁷⁵ observaron una inesperada correlación, en forma de campana, entre selectividad de lipasa de *Pseudomonas* e hidrofobicidad de los disolventes, cuando éstos eran separados en dos grupos: cíclicos y acíclicos. Para explicar su diferente comportamiento, los autores sugirieron que la interacción en el sitio activo, entre enzima y disolvente, afectaba a la enantioselectividad de la lipasa. Por término medio, las moléculas cíclicas son más voluminosas que las acíclicas y por tanto el volumen molar del disolvente debía ser tenido en cuenta. De hecho, se obtuvo una buena correlación entre enantioselectividad y volumen molar³⁷⁶.

Bovara et al.³⁷⁷ y Secundo et al.³⁷⁸ informaron acerca de la transesterificación de (\pm)-*trans*-sobrerol (**3**), (\pm)-sulcatol (**4**) y (\pm)-3-bromo-5-hidroximetil isoxazolin (**5**) catalizada por lipasa PS (Esq. 4).



Esquema 4. (\pm)-*trans*-sobrerol (**3**), (\pm)-sulcatol (**4**) y (\pm)-3-bromo-5-hidroximetil isoxazolin (**5**)

Los resultados mostraron que la razón enantiomérica variaba desde 500 en *tert*-amilalcohol hasta 69 en THF, pero no había correlación entre enantioselectividad e hidrofobicidad o constante dieléctrica del medio.

La enantioselectividad de la lipasa de páncreas porcino (PPL) en la acilación de **4**, estaba muy poco influenciada por la naturaleza del disolvente y por la del agente acilante. Resulta interesante que, mientras que la V_{\max} para la acilación de **4** era similar en todos los disolventes ensayados, los valores de K_M aumentaron con la polaridad del disolvente³⁷⁸. No se ha dado ninguna explicación a este fenómeno. Los autores reconocieron que aunque la enantioselectividad de PPL y la lipasa PS estaba influenciada por el disolvente, el resultado estereoquímico de la reacción no podía ser predicho únicamente sobre la base de las propiedades físico-químicas del disolvente: la

³⁷⁵ Nakamura K., Takebe Y., Kitayama T., Ohno A. *Tetrahedron Lett.*, **32** (37), 4941-4, (1991)

³⁷⁶ Nakamura K., Kinoshita M., Ohno A. *Tetrahedron*, **50** (16), 4681-90, (1994)

³⁷⁷ Bovara R., Carrea G., Ferrara L., Riva S. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2** (9), 931-8, (1991)

tendencia variaba para un sustrato dado, en función de la enzima y para una enzima dada, en función del sustrato. De manera similar a Nakamura³⁷⁶, los autores sugirieron que la selectividad del enzima estaba controlada, al menos en parte, por interacciones locales e inespecíficas entre el disolvente y la enzima, que afectan en mayor grado a la reactividad de un enantiómero que a la del otro.

Para evaluar el efecto que la geometría del disolvente tiene sobre la actividad, enantio- y regioselectividad de los enzimas, Ottolina et al.³⁷⁹ ensayaron varias lipasas y proteasas en dos disolventes enantioméricamente puros, (*R*)- y (*S*)-carvona. Aunque la actividad de todos los enzimas ensayados dependía de la configuración del disolvente, no se observó ninguna variación significativa en la regio- y enantioselectividad de las enzimas.

La magnitud del efecto del medio de reacción sobre la enantioselectividad de las enzimas fue revelada por Tawaki y Klibanov³⁸⁰, quienes demostraron que la preferencia enantiomérica de la proteasa de *Aspergillus oryzae* podía ser invertida por el medio de reacción. Mientras la transesterificación del cloroetil éster de *N*-acetil-fenilalanina con propanol en disolventes hidrofílicos, tales como acetonitrilo, DMF y piridina, fue más rápido para el L-enantiómero, lo contrario fue observado en disolventes hidrofóbicos, tales como tolueno, octano y tetracloruro de carbono. Los autores explicaron este fenómeno sobre la base de dos modos alternativos de enlace del L- y el D-enantiómero: en el “modo productivo” el L-enantiómero enlaza al enzima de tal manera que el grupo bencilo está sobre el bolsillo hidrofóbico de la enzima. Por el contrario, el D-isómero, con objeto de colocar el enlace hidrolizable en la posición adecuada, orienta el grupo bencilo hacia el disolvente. Lógicamente, si este disolvente es hidrofóbico, la hidrólisis será más rápida para el D-enantiómero.

También fue observada la inversión de la enantioselectividad para la esterificación de derivados del ácido fenilpropiónico, catalizada por lipasa de *Candida cylindracea*^{381,382}. El producto con la configuración *R* se obtenía (ee 84-86%) en tetracloruro de carbono, mientras que la acetona y el acetonitrilo favorecían la configuración *S* (ee 16%). Los autores formularon la hipótesis de que los cambios en la

³⁷⁸ Secundo F., Riva S., Carrea G. *Tetrahedron: Asymmetry*, **3** (2), 267-80, (1992)

³⁷⁹ Ottolina G., Bovara R., Riva S. *Biotechnol. Lett.*, **14** (10), 947-52, (1994)

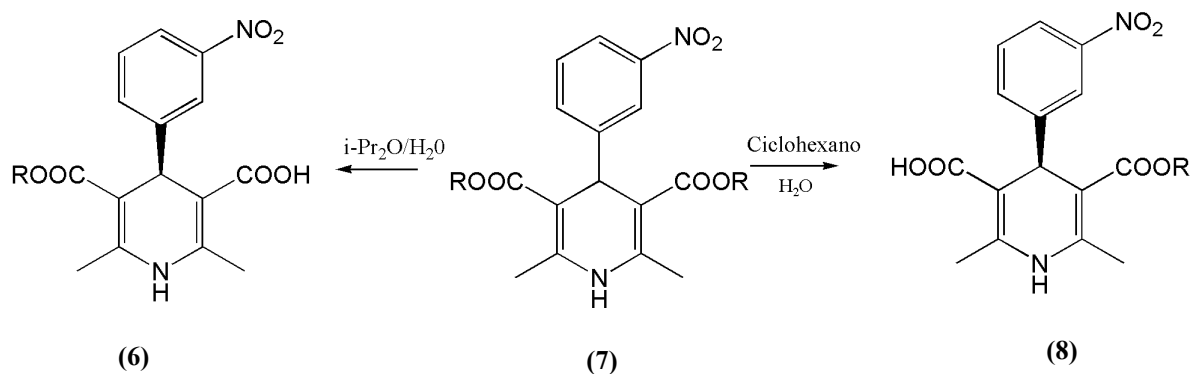
³⁸⁰ Tawaki S., Klibanov A.M. *Biocatalysis*, **8**, 3-19, (1993)

³⁸¹ Wu S.-H., Chu F.-Y., Wang K.-T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1** (7), 339-42, (1991)

³⁸² Ueji S., Fujino R., Okubo S.I. *Biotechnol. Lett.*, **14** (3), 163-8, (1992)

conformación de la enzima causados por interacción directa con los disolventes, eran los responsables de la inversión de la enantioselectividad.

Para la lipasa de *Pseudomonas* se ha observado un importante cambio en la estereoselectividad de la hidrólisis de derivados de la 1,4-dihidropiridina (7)³⁸³ (Esq. 5).



Esquema 5. Derivados de la 1,4-dihidropiridina (7)

Cuando se usa isopropiléter como medio de reacción, se obtiene el producto en la configuración *S* (6), con un 87% de rendimiento y > 99% ee. Sin embargo, cuando la hidrólisis se lleva a cabo en ciclohexano saturado con agua, se obtiene el isómero *R* (8) con un 88% de rendimiento y 89% ee. Puesto que la hidrofobicidad de los dos disolventes es similar, parece poco probable que la inversión de la enantioselectividad se deba a una diferencia en el reparto del sustrato entre la enzima y el disolvente. Los autores atribuyen el cambio a la interacción directa de la enzima con el disolvente.

La mayoría de los trabajos acerca del efecto del agua sobre la selectividad de las enzimas en medios orgánicos, indican que la enantioselectividad de aquéllas aumenta con el contenido en agua del medio^{384,385,369,386,387}. Aunque no se ha dado ninguna explicación a este fenómeno, puede argumentarse que dado que en la mayoría de los casos el aumento en enantioselectividad va acompañado de un aumento en la velocidad de la reacción, la adición de agua alivia las interacciones desfavorables enzima-disolvente y restaura la conformación nativa, inherentemente más selectiva.

³⁸³ Hirose Y., Kariya K., Sasaki I. *Tetrahedron Lett.*, **33** (47), 7157-60, (1992)

³⁸⁴ Bodnár J., Gubizca L., Szabó L.-P. *J. Molec. Catal.*, **61**, 353-61, (1990)

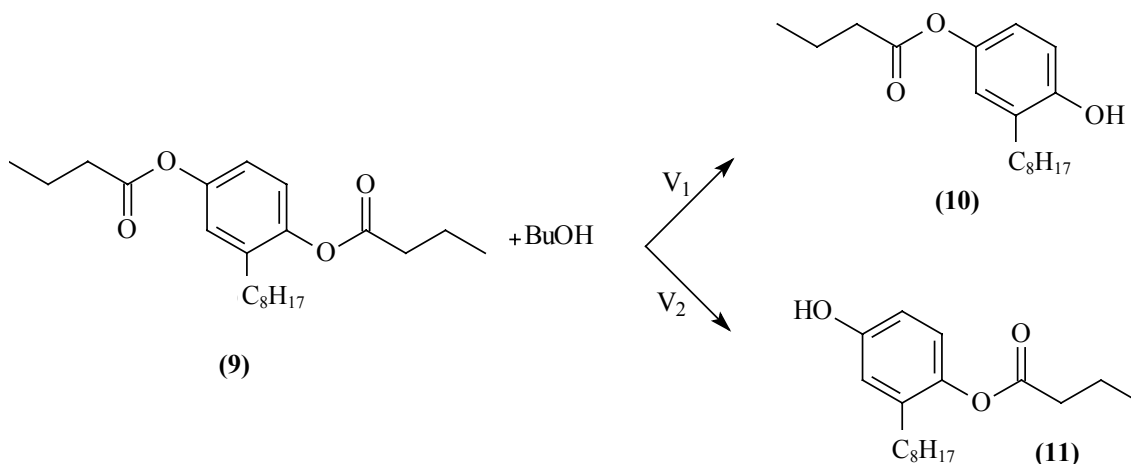
³⁸⁵ Kitaguchi H., Itoh I., Ono M. *Chem. Lett.*, 1203-6, (1990)

³⁸⁶ Högberg H.-E., Edlund H., Berglund P., Hedeström E. *Tetrahedron: Asymmetry*, **4** (10), 2123-6, (1993)

³⁸⁷ Arroyo M., Sinisterra J.V. *J. Org. Chem.*, **59**, 4410-7, (1994)

3.-Regioselectividad. La influencia del disolvente

Existen algunos trabajos sobre la influencia del medio en la regioselectividad de las enzimas. Rubio et al.³⁸⁸ encontraron que la relación de velocidades (v_1/v_2) para la transesterificación de **9** con butanol, catalizada por lipasa de *Pseudomonas cepacia*, difería significativamente en disolventes orgánicos (Esq. 6).



Esquema 6. Transesterificación del compuesto **9** por *Pseudomonas cepacia*

Existe una buena correlación entre el factor de regioselectividad $(k_{cat}/K_M)_1/(k_{cat}/K_M)_2$ y el parámetro de hidrofobicidad del disolvente ($\log P$). Para explicar este hallazgo, los autores sugieren que la lipasa tiene un surco hidrofóbico en la vecindad del sitio catalítico. Si el enlace de **9** ocurre de tal manera que el radical octilo ocupa el surco hidrofóbico, el grupo butirilo proximal se coloca en el sitio catalítico y se obtiene **10**. Alternativamente, el grupo butirilo distal puede quedar en la vecindad del centro activo, lo que conduciría a la formación de **11**. Para un disolvente hidrofóbico no existe la ventaja termodinámica de que el radical octilo se aloje en el surco hidrofóbico de la enzima, obteniéndose **11** en ese tipo de disolvente. En un disolvente hidrofílico, el radical octilo prefiere el surco hidrofóbico de la enzima, lo que conduce a la formación de **10**.

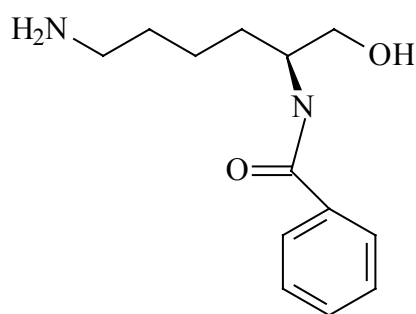
4.-Quimioselectividad

La quimioselectividad, esto es, la capacidad para distinguir entre grupos funcionales distintos, es también una propiedad de las enzimas que puede estar influenciada por el medio. Chinsky et al.³⁸⁹ informaron que la acilación de 6-amino-1-

³⁸⁸ Rubio E., Fernández-Mayorales A., Klivanov A.M. *J. Amer. Chem. Soc.*, **113**, 695-6, (1991)

³⁸⁹ Chinsky N., Margolin A.L., Klivanov A.M. *J. Amer. Chem. Soc.*, **111**, 386-8, (1989)

hexanol, catalizada por lipasa de *Aspergillus niger*, se producía preferentemente sobre el grupo hidroxilo. Esta inesperada selectividad, que es la contraria a la de la reacción química, permitió a los autores obtener una serie de monoésteres de aminoalcoholes con buen rendimiento, sin tener que recurrir a los grupos protectores. Tawaki y Klibanov³⁸⁰ continuaron el estudio e informaron que la quimioselectividad de las enzimas puede estar influenciada por el medio de reacción. La butirilación de una serie de aminoalcoholes en una variedad de disolventes orgánicos reveló que la razón de velocidades de *O*- a *N*- acilación era marcadamente dependiente del disolvente. Por ejemplo, la quimioselectividad de la lipasa de *Pseudomonas* en la acilación de *N*- α -benzoil-lisínol (**12**) con butirato de fluoroetilo, varió desde 1.1 en *tert*-butil alcohol a 21 en 1,2-dicloroetano, siendo el grupo hidroxilo más reactivo que el grupo amino en todos los disolventes ensayados.



Esquema 7. *N*- α -benzoil-lisínol (**12**)

Sorprendentemente, en los mismos disolventes, la lipasa de *Mucor meihei* exhibía preferencia por el grupo amino, con la quimioselectividad variando 18 veces. En este caso se observó una correlación entre quimioselectividad de la lipasa y capacidad para formar enlaces de hidrógeno: mientras la enzima catalizaba la acilación del grupo hidroxilo de los aminoalcoholes en los disolventes con baja tendencia a formar enlaces de hidrógeno, exhibía una fuerte preferencia por los grupos amino en los disolventes con alta tendencia a formar enlaces de hidrógeno. Los autores razonaron que, para llevar a cabo un ataque nucleofílico sobre el intermediario acil-enzima, los grupos nucleofílicos deben estar libres de enlaces de hidrógeno. Puesto que el grupo hidroxilo tiene una tendencia mayor a formar estos enlaces, se desactiva en mayor grado que el grupo amino en los disolventes que propicien enlaces de hidrógeno. De esta manera, la acilación en estos disolventes va hacia el grupo amino.

5.-Estructura y estabilidad de las enzimas en medios orgánicos

Varios estudios han indicado que enzimas tan diversas como PPL³⁹⁰, quimotripsina³⁹¹, ribonucleasa y lisozima³⁹² son más termoestables en disolventes orgánicos que en agua. Por ejemplo, PPL permaneció activa durante muchas horas (vida media más de 12 horas) cuando se incubó a 100°C en una mezcla casi anhidra de heptanol y tributirina (Figura 1)³⁹⁰.

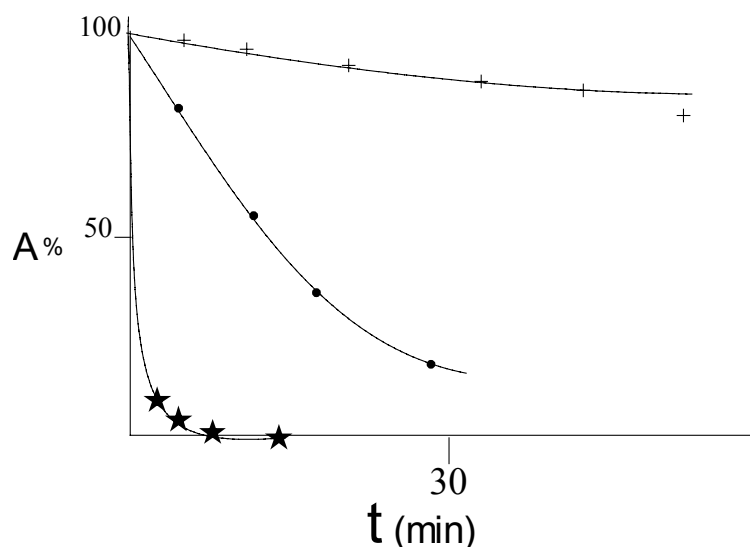


Figura 1.- Caída de la actividad de PPL (polvo seco) a 100°C en agua o tampón fosfato 0.1 M (*) y en una solución 2 M de heptanol en tributirina conteniendo el 0.8% (●) ó 0.015% (+) de agua.

La estabilidad más baja se observó en presencia de 0.8% p/v de agua, mientras que la inactivación fue casi instantánea en tampón o agua. Esta alta estabilidad térmica de las enzimas en disolventes orgánicos, especialmente en los hidrofóbicos y a bajo contenido en agua, se atribuyó a un aumento de la rigidez conformacional y a la ausencia de casi todas las modificaciones covalentes que dan lugar a la termoinactivación irreversible en agua³⁹².

Debe mencionarse que, como se ha demostrado por espectroscopía FTIR de lisozima y subtilisina, la estructura de un enzima es mucho más similar a la nativa en disolventes orgánicos puros como acetonitrilo, THF y 1-propanol que en mezclas agua-

³⁹⁰ Zaks A., Klivanov A.M. *Science*, **224**, 1249-51, (1984)

³⁹¹ Reslow M., Adlercreutz P., Mattiasson B. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **26**, 1-8, (1987)

³⁹² Volkin D.B., Staubli A., Langer R., Klivanov A.M. *Biotechnol. Bioeng.*, **37**, 843-53, (1991)

disolvente³⁹³. Este comportamiento es debido a la inherente restricción de la movilidad conformacional de la enzima en medios anhidros, en contraste con las mezclas agua-disolventes orgánicos.

Las estructuras cristalinas obtenidas por Rayos X han permitido obtener una imagen directa de las conformaciones de subtilisina en acetonitrilo y γ -quimotripsina en hexano³⁹⁴. La estructura de la subtilisina en acetonitrilo es esencialmente idéntica a la estructura tridimensional de la enzima en agua; las diferencias observadas han resultado ser menores que las que se observan entre dos estructuras obtenidas independientemente en solución acuosa. La γ -quimotripsina cristalina retenía su conformación en hexano y podía catalizar tanto reacciones de hidrólisis como de síntesis. Sin embargo, la movilidad disminuía y la conformación de las cadenas laterales cambiaba. Un estudio de intercambio isotópico con NMR de alta resolución ha mostrado también que la estructura del inhibidor de la tripsina de páncreas bovino se ve muy poco afectada por disolventes tales como acetonitrilo, THF, acetato de etilo y butanol³⁹⁵. Además, el análisis de Hammett, un método que da información sobre los estados de transición de las reacciones, ha revelado que el estado de transición de una reacción catalizada por subtilisina es el mismo en agua que en disolventes orgánicos³⁹⁶.

Regioselectividad de hidrolasas

Según la definición de la IUPAC, “una reacción regioselectiva es aquella en la cual la rotura o formación de un enlace ocurre en una determinada dirección, preferentemente sobre todas las demás posibles”³⁹⁷. En 1985, Klivanov et al.³⁹⁸ publicaron la acilación regioselectiva de glicoles alifáticos sencillos usando lipasa pancreática como catalizador. Desde entonces, esta metodología ha sido utilizada profusamente para una gran variedad de sustratos y bajo varias condiciones, que revisamos a continuación.

³⁹³ Griebenov K., Klivano A.M. *J. Amer. Chem. Soc.*, **118**, 11695-700, (1996)

³⁹⁴ Fitzpatrick P.L., Steinemtz A.C.U., Ringe D., Klivanov A.M. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **90**, 8653-7, (1993)

³⁹⁵ Desai U.R., Klivanov A.M. *J. Amer. Chem. Soc.*, **117**, 3940-5, (1995)

³⁹⁶ Pasta P., Riva S., Carrea G. *FEBS Lett.*, **236**, 329-32, (1988)

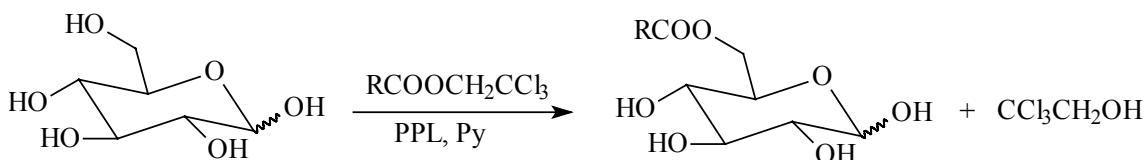
³⁹⁷ Muller P. *Pure Appl. Chem.*, **66**, 1077-84, (1994)

³⁹⁸ Cesti P., Zaks A., Klivanov A.M. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **11**, 401-7, (1985)

1.-Carbohidratos

La polaridad de la mayoría de estas moléculas restringe mucho la elección del disolvente, muy frecuentemente limitada a piridina, DMF o dimetilacetamida. Consecuentemente, sólo pueden usarse aquellas enzimas que retengan su actividad en disolventes tan polares. Tales limitaciones afectan también a la naturaleza del agente acilante³⁹⁹. Generalmente, los anhídridos son demasiado reactivos en disolventes apróticos y dan lugar a acilaciones inespecíficas no enzimáticas. A veces ocurre esto mismo para los vinilésteres, cuando se usan en un gran exceso en disolventes tales como piridina y DMF.

En un primer trabajo⁴⁰⁰ aplicado a los carbohidratos, se encontró que la lipasa pancreática catalizaba las esterificaciones regioselectivas de monosacáridos en piridina.



Esquema 8. Esterificaciones regioselectivas de monosacáridos por lipasa pancreática

Las reacciones se llevaron a cabo a escala de multigramos, usando ésteres de 2,2,2-tricloroetilo de ácidos alifáticos lineales como dadores de acilo.

Para ampliar el espectro de enzimas que pudieran emplearse en la acilación de monosacáridos, Wang et al.⁴⁰¹ sugirieron el uso de mezclas de disolventes para lograr buenas actividades de la lipasa y buenas solubilidades de los sustratos. Por ejemplo, una mezcla benceno-piridina (2:1) fue útil para la catálisis, por lipasa de *Candida cylindracea*, de la acilación selectiva del hidroxilo sobre C-6 de diferentes azúcares con acetato de vinilo.

Posteriormente, Riva et al.⁴⁰² sugirieron el uso de otro tipo de hidrolasas, en concreto proteasas. Se encontró que la subtilisina, una proteasa de *Bacillus licheniformis*, era estable y activa en numerosos disolventes, incluyendo piridina y

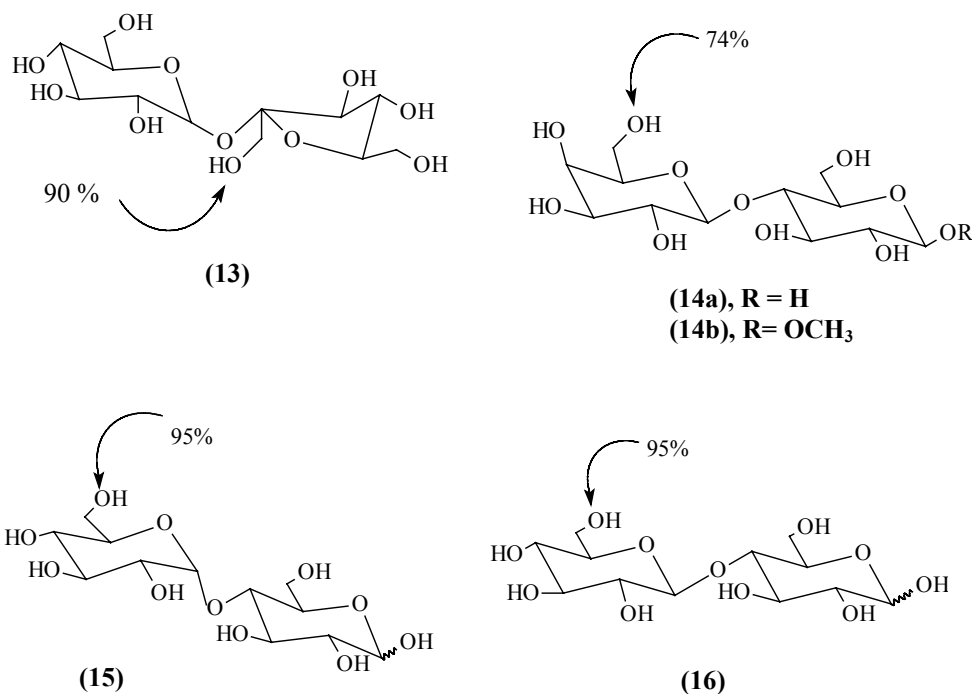
³⁹⁹ Riva S., Secundo F. *Chimica Oggi.*, (6), 9-16, (1990)

⁴⁰⁰ Therisod M., Klibaabov A.M. *J. Amer. Chem. Soc.*, **108**, 5638-40, (1986)

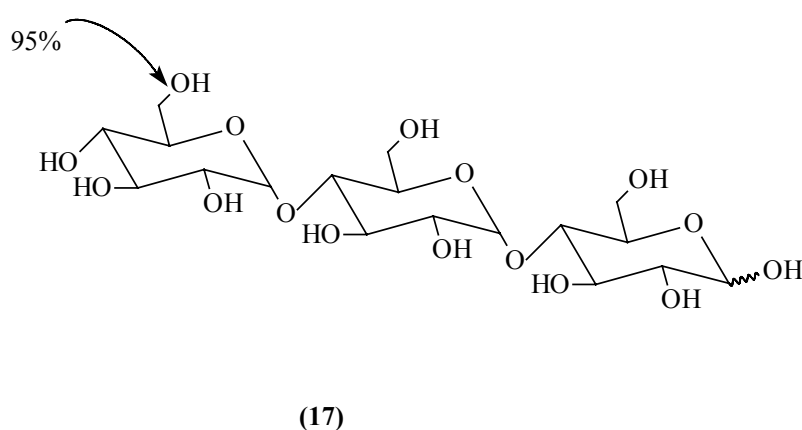
⁴⁰¹ Wang Y.F., Lalonde J.J., Momongan M. *J. Amer. Chem. Soc.*, **110**, 7200-5, (1988)

⁴⁰² Riva S., Chopineau J., Kieboom A.P.G. *J. Amer. Chem. Soc.*, **110**, 584-9, (1988)

dimetilformamida. De este modo, se obtuvieron, a escala preparativa, una serie de ésteres primarios de monobutanoilo de mono-, di- y oligosacáridos (Esq. 9a y 9b).

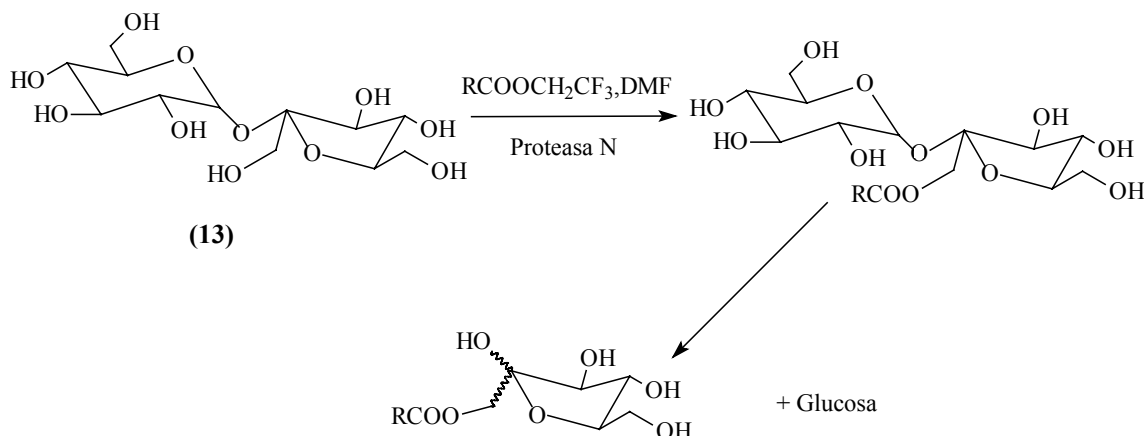


Esquema 9a. Formación de ésteres primarios de monobutanoilo de mono-, di- y oligosacáridos



Esquema 9b. Formación de ésteres primarios de monobutanoilo de mono-, di- y oligosacáridos

En el caso de la sacarosa (**13**), se observó la esterificación del OH en 1', el menos reactivo de los hidroxilos primarios. Como continuación a este trabajo, Carrea et al.⁴⁰³ llevaron a cabo una investigación sistemática de la utilidad del método para la síntesis de una serie de ésteres de sacarosa en el 1'-OH, con grupos acilo de diferentes tipos y tamaños. Estos compuestos podían ser fácilmente convertidos, vía hidrólisis catalizada por α -glucosidasa, en la correspondiente 1-O-acil fructosa (Esq. 10).



Esquema 10. Esterificación del hidroxilo en 1' de la sacarosa y conversión en 1-O-acil fructosa

La discriminación regioselectiva de grupos hidroxilo secundarios es aún más interesante desde el punto de vista sintético. El primer trabajo sobre este tema fue también publicado por el grupo de Klivanov⁴⁰⁴. Por ejemplo, cuando se usa 6-O-butanoil-glucosa como sustrato de la lipasa de *Chemobacterium viscosum* en THF, esta enzima tiene una marcada preferencia por el hidroxilo en la posición 3, mientras que la lipasa pancreática dirige su acción hacia el hidroxilo en 2. Se obtienen los mismos resultados cuando el grupo hidroxilo primario en 6 se protege con trietil éter o con *t*-butil-difenil-sililéter. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla siguiente.

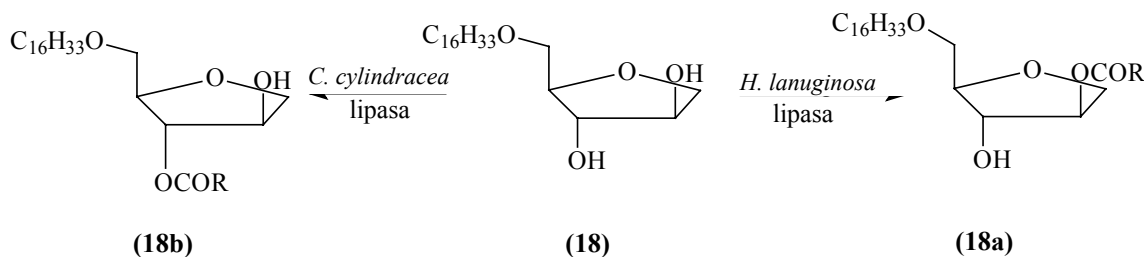
6-O-butanoil azúcar (sustrato)	Relación 3,6/2,6- di-O-butanoilo			
	Lipasa Pancreática	PPL	Lipasa de <i>Candida cylindracea</i>	Lipasa de <i>Aspergillus</i>
Glucosa	>50	0.1	0.4	<50
Galactosa	1.5	1.5	0.5	4.9
Manosa	4.0	0.7	2.0	1.5

⁴⁰³ Carrea G., Riva S., Secundo F. J. *Chem. Perkin Trans. I.*, 1057-61, (1989)

⁴⁰⁴ Therisod M., Klivanov A.M. J. *Amer. Chem. Soc.*, **109**, 3977-81, (1987)

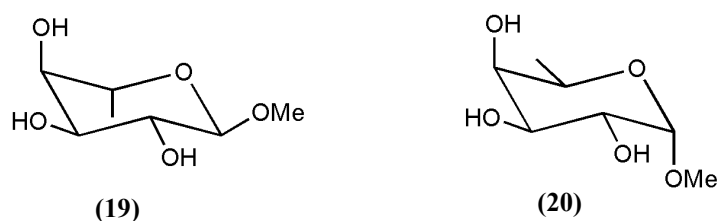
El punto más llamativo es la posibilidad de modular la posición de acilación simplemente cambiando el origen de la lipasa.

De manera análoga, Riva et al.⁴⁰⁵ informaron de un interesante ejemplo de complementariedad en la acilación por diferentes lipasas. La esterificación enzimática de 1,4-anhidro-5-O-hexadecil-D-arabinitol (**18**) en benceno dio lugar a los productos **18a** ó **18b** (Esq. 11).



Esquema 11. Esterificación enzimática de 1,4-anhidro-5-O-hexadecil-D-arabinitol (**18**) en benceno, utilizando lipasa de *Candida Cylindracea* y de *Humicola lanuginosa*

Los resultados obtenidos por Ronchetti et al.⁴⁰⁶ fueron asimismo muy interesantes. Ellos compararon la acilación catalizada por tres lipasas diferentes de metil-6-desoxi-piranósidos pertenecientes a series estéricas opuestas. Dos azúcares, el D-fucósido (**19**) y el L-ramnósido (**20**), fueron los mejores sustratos.



Esquema 12. Acilación catalizada por lipasas. Ronchetti et al.

Estos resultados se explicaron sugiriendo que la orientación del azúcar en el centro activo de las lipasas estaba determinado por los tres grupos hidroxilo

⁴⁰⁵ Nicotra F., Riva S., Secundo F. *Tetrahedron Lett.*, **30**, 1703-4, (1989)

⁴⁰⁶ Ciuffreda P., Colombo D., Ronchetti F. *J. Org. Chem.* **55**, 4187-90, (1990)

secundarios. Como se indica en la figura anterior, **19** y **20** poseen la misma secuencia, axial-ecuatorial-ecuatorial por lo que la acilación tiene lugar en el mismo extremo de este triplete. Se obtienen resultados similares con los azúcares “padre”, metil- α -galactopiranosidos y metil- α -manopiranosidos, previamente protegidos en sus hidroxilos primarios⁴⁰⁷ y con los correspondientes glucopiranosidos y 6-desoxiglucopiranosidos⁴⁰⁸.

Bashir et al.⁴⁰⁹ han hecho una revisión muy completa de la esterificación enzimática de carbohidratos.

2.- Glicósidos de productos naturales

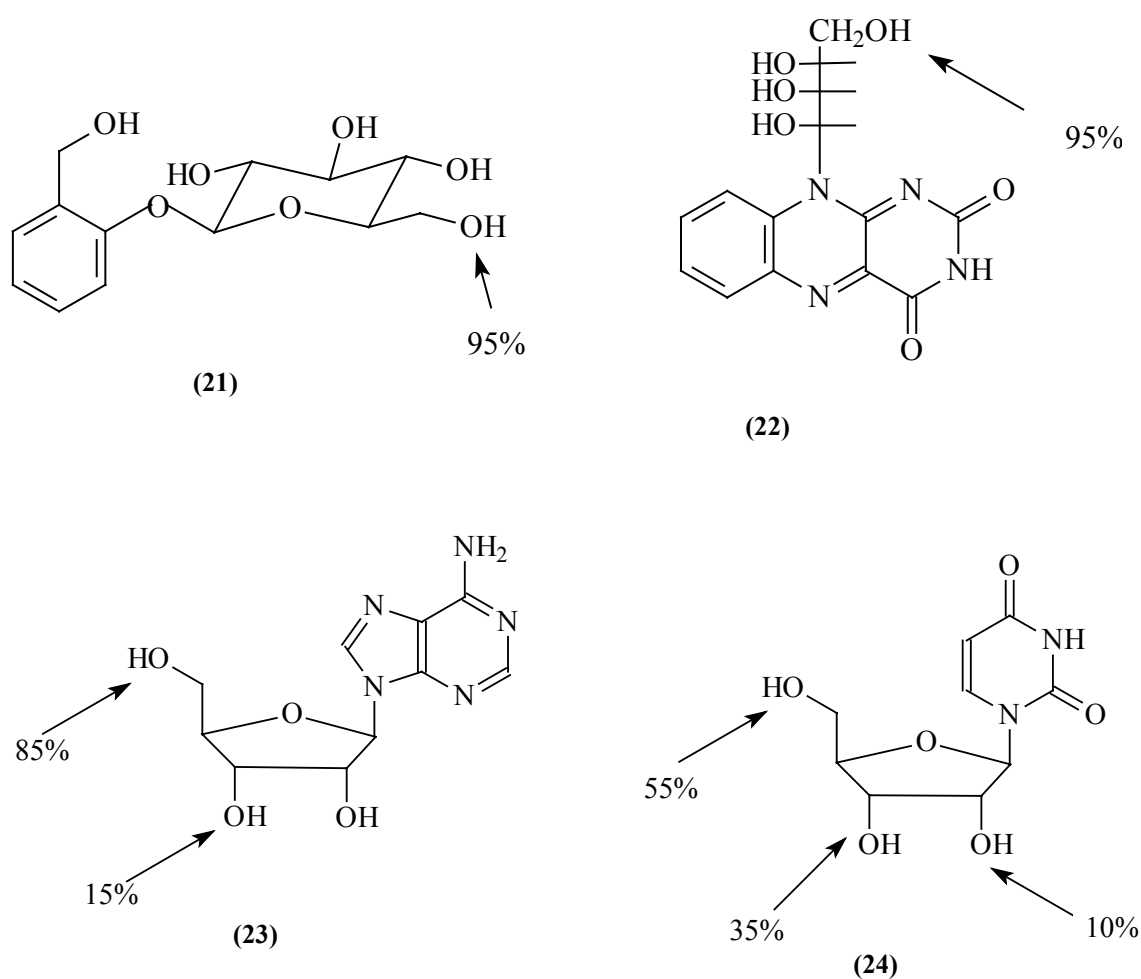
Los glicósidos de varias clases de productos naturales se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y frecuentemente aparecen esterificados con grupos alifáticos y aromáticos (principalmente acetato, malonato, *p*-cumarato, y ferulato) en grupos hidroxilo específicos de sus anillos de azúcar. Muchas de estas moléculas son bioactivas. En la naturaleza, la formación de estos ésteres es el último paso en el proceso biosintético y es catalizado por diferentes aciltransferasas. Estas enzimas muestran relativa flexibilidad hacia el grupo acilo pero son estrictamente selectivas para el sustrato a ser esterificado. Además, se requieren cantidades estequiométricas del correspondiente acil-CoA y por todo ello estas enzimas no son muy útiles para la síntesis *in vitro* de laboratorio.

En uno de los artículos antes mencionados, Klivanov et al.⁴⁰² informaron de que la subtilisina era también capaz de acilar glucósidos naturales regioselectivamente. La reacción fue llevada a cabo en cuatro sustratos modelo: salicina (**21**), riboflavina (**22**) y los nucleósidos adenosina (**23**) y uridina (**24**) (Esq. 13).

⁴⁰⁷ Colombo D., Ronchetti F., Toma L. *Tetrahedron*, **47**, 103-10, (1991)

⁴⁰⁸ Colombo D., Ronchetti F., Scala A. J. *Carbohydr. Chem.*, **11**, 89-94, (1992)

⁴⁰⁹ Bashir N. B., Phytian S.J., Reason A.J., Roberts S.M. J. *Chem. Perkin. Trans. I*, 2203-22, (1995)



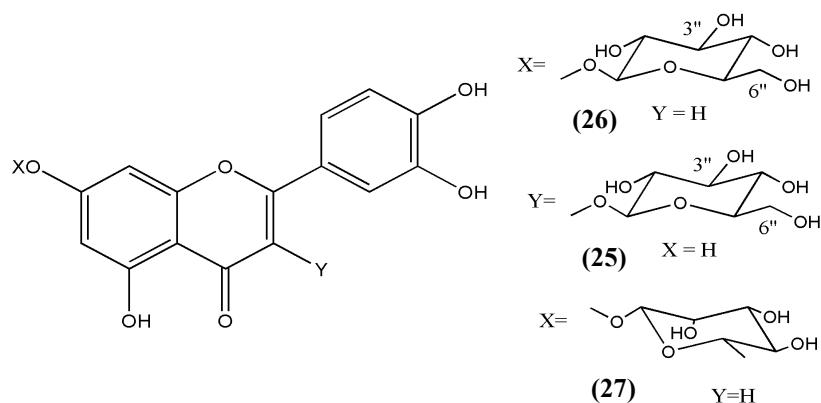
Esquema 13. Acilación regioselectiva de glucósidos naturales

La subtilisina no solo mostró regioselectividad dentro del anillo glicosídico sino de éste con respecto a los grupos funcionales de la aglicona.

Glicósidos de flavonoides

Estas sustancias y sus ésteres son un importante grupo de productos naturales que se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal. En un primer trabajo, Danieli et al.⁴¹⁰ aplicaron la metodología usual (subtilisina suspendida en una disolución del sustrato en piridina y butanoato de trifluoroetilo) a tres flavonoles monoglicósidos: isoquercetina (**25**), luteolina-7-glucósido (**26**) y quercitrina (**27**) (Esq. 14).

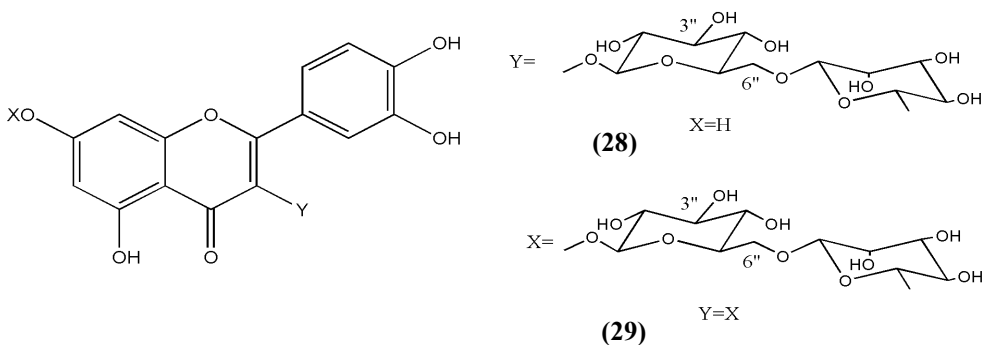
⁴¹⁰ Danieli B., DeBellis P., Carrea, G. *Heterocycles*, **29**, 2061-4, (1989)



Esquema 14. Acilación de flavonoles monoglicósidos. Danieli et al.

Los dos glucósidos, **25** y **26**, fueron acilados para dar los correspondientes 6''-O-butanoatos, junto con pequeñas cantidades de 3''-O-mono y 3',6''-O-dibutanoatos. El ramnósido **27** no reaccionó en absoluto.

En un trabajo posterior⁴¹¹ se consideraron glicósidos de flavonoles más complejos con disacáridos como rutina (**28**) y hesperidina (**29**). Los resultados fueron particularmente curiosos dado que la posición acilada fue la 6'' en los dos casos (Esq. 15).

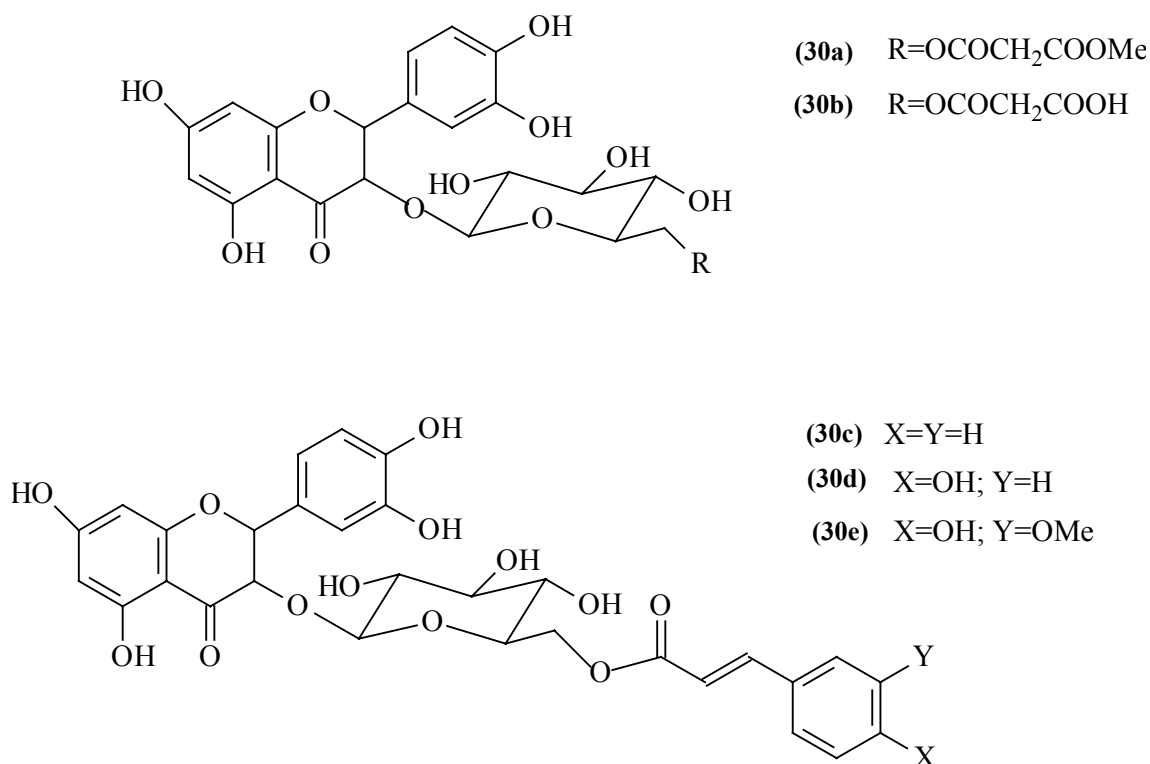


Esquema 15. Acilación de glucósidos de flavonoles más complejos

Posteriormente, los mismos autores⁴¹² abordaron la síntesis quimioenzimática de fenilpropenoatos (cinamato, cumarato, ferulato) de la flavona **30**. Los productos **30c-30e** se obtuvieron a partir de la introducción inicial del residuo de metilmalonato en el 6''-OH, catalizada por subtilisina, hidrólisis enzimática selectiva del diéster mixto (**30a**) por la acción de biophina esterasa y condensación de Knoevenagle del monoéster malónico (**30b**) con los aldehídos aromáticos apropiados (Esq. 16).

⁴¹¹ Danieli B., Bertario A., Carrea G. *Helv. Chim. Acta*, **73**, 1837-44, (1990)

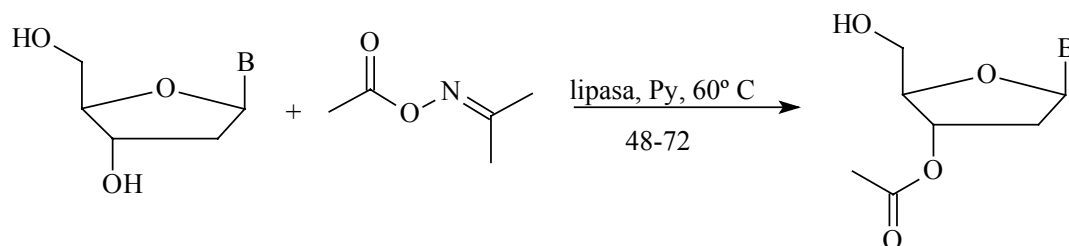
⁴¹² Danielli B., Bertario A., Carrea G. *Helv. Chim. Acta*, **76**, 2981-91, (1993)



Esquema 16. Síntesis quimioenzimática de fenilpropenoatos de la flavona 30

Nucleósidos

Este área fue cuidadosamente investigada por Gotor y Moris⁴¹³. Usando ésteres de oxima como dadores de acilo irreversibles y lipasa, obtuvieron la acilación regioselectiva de 2'-desoxinucleósidos en el grupo alcohólico secundario, en vez de en el grupo hidroxilo primario, químicamente más reactivo (Esq. 17).



Esquema 17. Acilación regioselectiva de 2'-desoxinucleósidos

Agliconas

En casi todos los casos, la acilación tiene lugar sobre el residuo de azúcar. Sin embargo, hay dos ejemplos descritos para la acilación en la aglicona^{414,415}.

⁴¹³ Gotor V., Moris F. *Síntesis*, 626-8, (1991)

⁴¹⁴ Evidente A., Fujii T., Iacobellis N.S. *Phytochemistry*, **30**, 3505-10, (1991)

⁴¹⁵ Colombo D., Ronchetti F., Scala A. *Tetrahedron: Asymmetry*, **5**, 1377-84, (1994)

Otros polioles

Evidentemente, la habilidad de las hidrolasas para discriminar entre grupos hidroxilo no se limita a los azúcares y glicósidos. Ciclitolos, esteroides, alcaloides, etc. han sido sustratos para las hidrolasas, en reacciones del tipo de las que estamos tratando. Para una revisión véase Riva⁴¹⁶. Este mismo autor hace un resumen en una revisión⁴¹⁷ posterior según el cual, las proteasas y lipasas han sido utilizadas para:

- (1) Catalizar un paso de protección en una síntesis quimioenzimática de derivados de azúcar. Por ejemplo, la esterificación catalizada por subtilisina de lactósidos ha sido utilizada para un abordaje quimioenzimático a 6'-desoxi-6'-fluoro- y 6-desoxi-6-fluoro-lactósidos⁴¹⁸.
- (2) Sintetizar ésteres específicos de glicósidos naturales. Por ejemplo, se ha descrito la obtención de ésteres malónicos de glicósidos de flavonoides tales como isoquercetina, rutina y naringina⁴¹⁹.
- (3) Aumentar el conocimiento básico de la selectividad de las hidrolasas. El control de la regioselectividad catalizada por enzimas ha sido estudiado⁴²⁰ usando la acilación de la sacarosa con ésteres de vinilo como reacción modelo.
- (4) La producción a gran escala de acrilatos de azúcar, monómeros asequibles para la producción de nuevos hidrogeles poliméricos⁴²¹.
- (5) La producción a gran escala de nuevos biosurfactantes⁴²².

⁴¹⁶ Riva S. En: "Enzymatic Reactions in Organic Media" (Es. A.M.P. Koshinen, A.M. Klivanov), Blackie Academic & Professional, London, pp. 140-69, (1996)

⁴¹⁷ Carrea G., Riva S. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **39**, 2226-54, (2000)

⁴¹⁸ Cai S., Hakomori S., Toyokuni T. *J. Org. Chem.*, **57**, 3431-67, (1992)

⁴¹⁹ Riva S., Danielli B., Luisetti M. *J. Nat. Prod.*, **59**, 618-21, (1996)

⁴²⁰ Rich J.O., Bedell B.A., Dordick J.S. *Biotechnol. Bioeng.*, **45**, 426-34, (1995)

⁴²¹ Chen X., Jonson J.S., Dordick J.S., Rethwisch D.G. *Macromol. Chem. Phys.*, **195**, 3567-78, (1994)

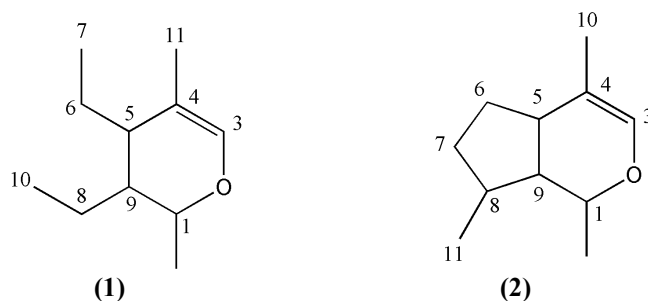
⁴²² Adelhorst K., Bjorkling F., Godtfredsen S.E., Kirk O. *Synthesis*, 112-5, (1990)



Acetilación enzimática regioselectiva de
secoiridoides

Parte teórica

Secoiridoide es un término que se usa para designar a un grupo de monoterpenos con la estructura básica **1** (Esq. 18).



Esquema 18. Estructura de secoiridoides (**1**) e iridoides (**2**)

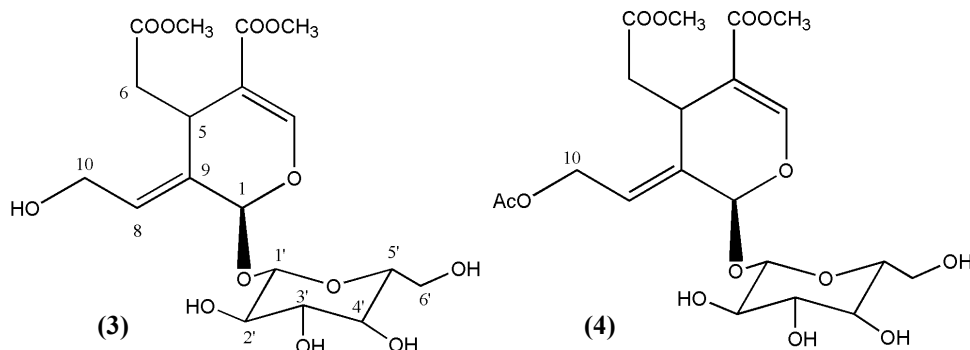
Derivan a su vez de los iridoides, cuya estructura básica es **2**, por rotura del enlace entre C-7 y C-8. Estos compuestos están generalmente glucosilados en la posición 1.

La familia Oleaceae es una fuente muy importante de estos productos. La distribución de los diferentes tipos de iridoides y secoiridoides, así como sus diferentes rutas biosintéticas, han sido empleadas como marcadores taxonómicos para los diferentes géneros de la familia.

Aunque originariamente no se les dio importancia, en la actualidad, sus propiedades biológicas y farmacológicas han sido objeto de numerosos estudios y revisiones²⁸⁵.

De la especie *Jasminum odoratissimum* han sido aislados varios compuestos de este tipo. Los dos más abundantes son el 10-hidroxioléósido dimetil éster (**3**) (Esq. 19) y su derivado acetilado, 10-acetoxioléósido dimetil éster (**4**)⁴²³.

⁴²³ Trujillo J. M., Hernández J. M., Pérez J.A., López H., Frías I. *Phytochemistry*, **42**, 553-4, (1996)



Esquema 19. 10-hidroxioléosido dimetil éster (3) y 10-acetoxiléosido dimetil éster (4)

La esterificación regioselectiva de estos productos puede ser interesante para mejorar su posible actividad biológica o ampliar el espectro de la misma. Dado que los métodos de la química convencional resultarían muy costosos, decidimos emplear hidrolasas en disolventes orgánicos. Como hemos visto, este método había sido aplicado con éxito a otros glucósidos pero nunca de secoiridoides.

En una primera serie de experimentos se usó pancreatina, un preparado comercial de SIGMA, que es un extracto de páncreas porcino.

Así, en un experimento previo se incubaron 100 mg del compuesto 4 disueltos en 2.5 ml de THF (secado sobre tamiz molecular de 3 Å) con 0.15 ml de acetato de tricloroetilo, 0.05 ml de dietilamina y 200 mg de pancreatina SIGMA que se mantuvieron en suspensión. La mezcla se agitó a 39°C durante 7 días y en mitad de este período se añadieron 0.1 ml de éster y 50 mg de enzima adicionales. Al cabo de los siete días, se centrifugó a 8000 rpm para eliminar la enzima y se separaron los componentes del sobrenadante por HPLC. La Figura 2 muestra la representación gráfica del cromatograma obtenido.

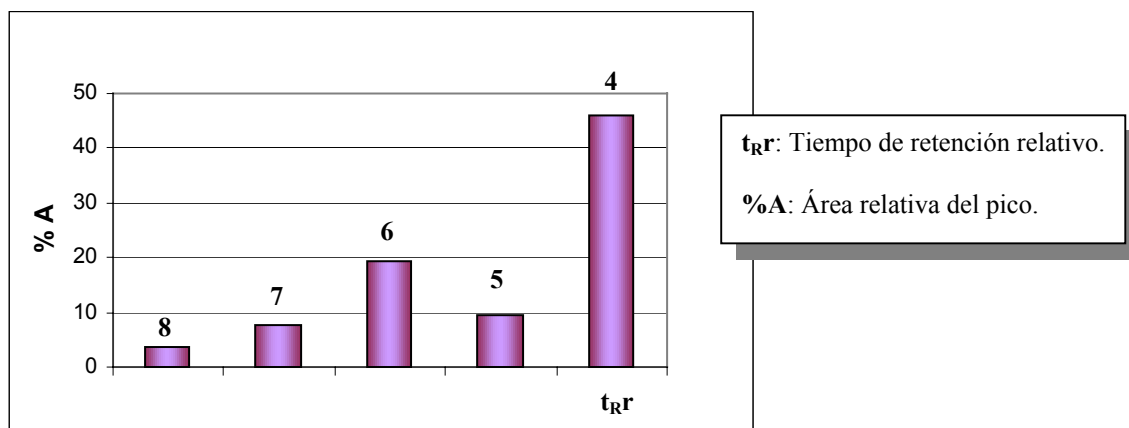


Figura 2. Separación por HPLC de los productos de reacción de transacetilación de 10-acetoxioleósido dimetil éster (**4**) con pancreatina a 39°C

El producto mayoritario y con mayor tiempo de retención, corresponde al producto de partida (**4**), mientras que el señalado en la gráfica como **6**, corresponde al producto que resulta de la acetilación de **4** en la posición 6' (anillo de glucosa). Éste es un producto natural que se aísla de *Jasminum odoratissimum*⁴²⁴.

El espectro de ¹H-NMR del producto señalado como **7** (Fig. 3) muestra el desplazamiento de un triplete con integral para un protón a δ 4.96 (Tabla 1). En el espectro COSY se observa un acoplamiento del protón anomérico de la glucosa con la señal del protón geminal al nuevo grupo acetato. Asimismo, a δ 2.19 aparece un singlete con integral para tres protones y que corresponde a este grupo acetato. Se trata, por lo tanto, del 2' acetoxi derivado del producto de partida (**4**).

⁴²⁴ López H., Pérez J.A., Hernández J.M., Trujillo J.M., *J. Nat. Prod.*, **60**, 1334-7 (1997)

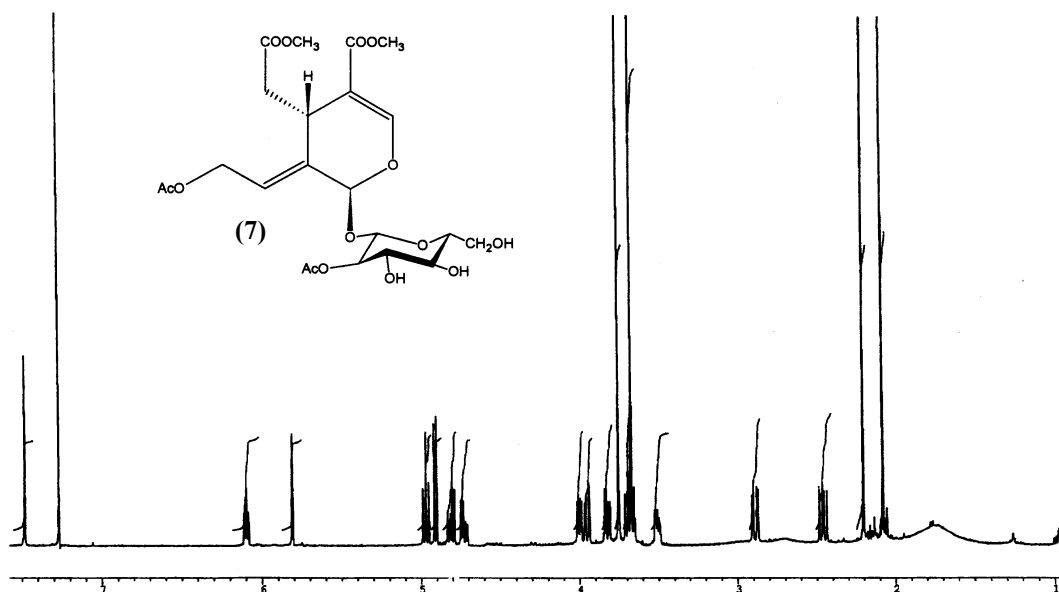


Figura 3. Espectro de ¹H-NMR (CDCl₃) del compuesto 7 (2'-O-acetil-10-acetoxioleósido dimetil éster)

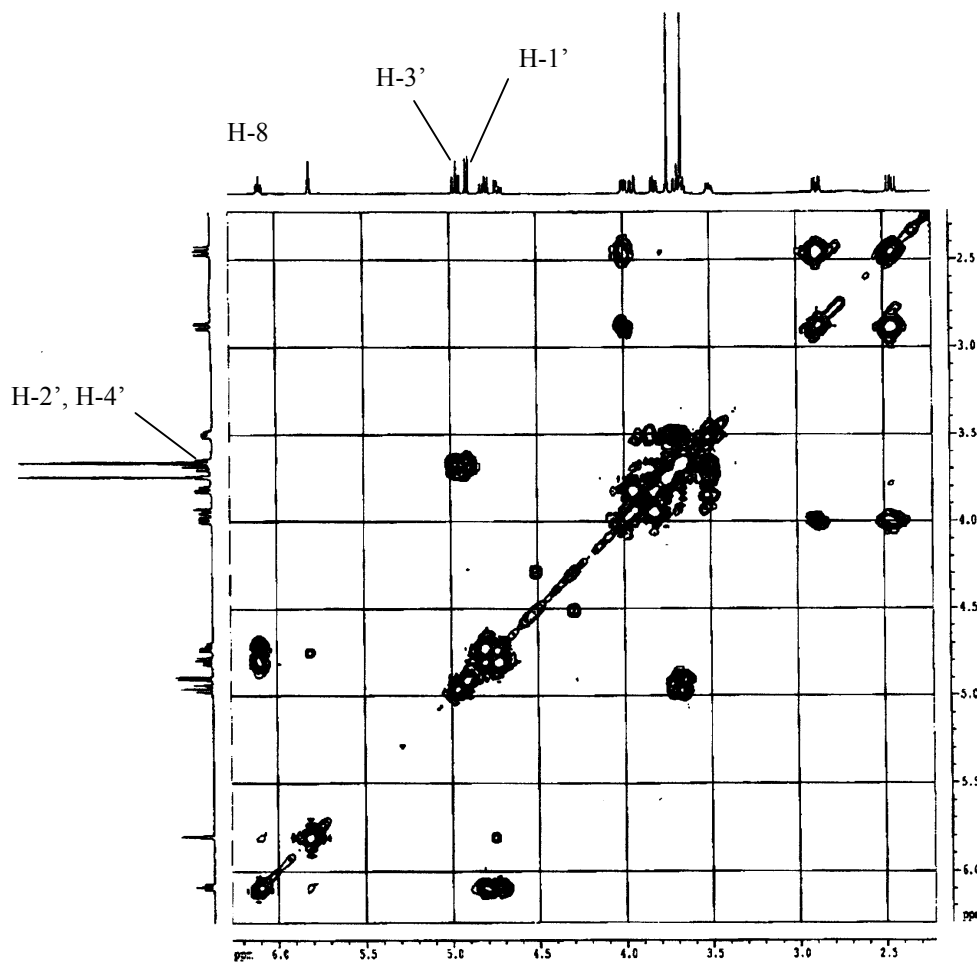


Figura 4. Experimento COSY del compuesto 7

El espectro de $^1\text{H-NMR}$ del producto señalado en la gráfica como **8** (Fig. 5), muestra entre δ 4.90 y 4.96 una señal compleja que corresponde al protón anomérico (Tabla 1). Además, respecto al producto de partida (**4**), se observa el desplazamiento de las señales correspondientes a los protones 6'a y 6'b. Esto nos indica que el compuesto **8** posee dos grupos acetilo, lo cual está apoyado por la aparición de dos singletes, con integral para tres protones en cada caso, a δ 2.11 y 2.14.

Debido al desplazamiento de las señales de los protones 6'a y 6'b, podemos concluir que uno de los grupos acetilo debe encontrarse sobre la posición 6' de la glucosa. La posición del otro grupo acetilo puede deducirse del estudio del experimento COSY, en el que se observa el acoplamiento entre la señal del protón anomérico y la señal del protón geminal a dicho acetato. Dicho grupo se encuentra, por consiguiente, en la posición 2' del anillo de glucosa. Por lo tanto, la acetilación ha tenido lugar en las posiciones 2' y 6'.

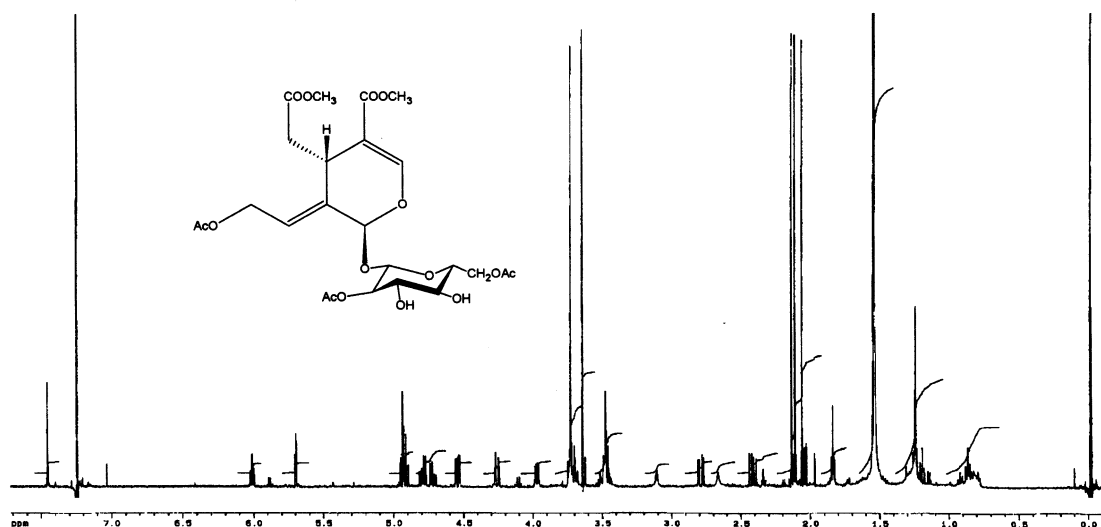


Figura 5. Espectro de $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) del compuesto **8**
(2,6'-O-diacetil-10-acetoxioleósido dimetil éster)

Finalmente, la fracción señalada como **5** es una mezcla que no se ha logrado separar. En cualquier caso, sus espectros de NMR señalan que se trata de un diacetato y que ha habido una acetilación en una posición distinta a la de los demás.

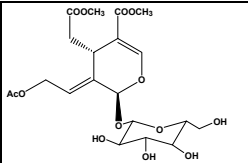
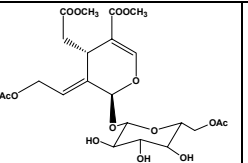
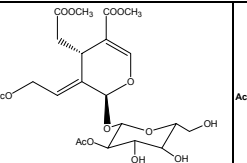
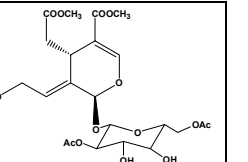
				
H	4	6	7	8
1	5.81 (s)	5.57 (s)	5.80 (s)	5.71 (s)
3	7.49 (s)	7.48 (s)	7.47 (s)	7.46 (s)
5	3.98 (dd, $J_1=4.0$, $J_2=9.5$)	4.02 (dd, $J_1=4.0$, $J_2=9.5$)	3.91 (dd, $J_1=4.2$, $J_2=9.8$)	3.98 (dd, $J_1=4.0$, $J_2=9.5$)
6a	2.43 (dd, $J_1=9.4$, $J_2=14.6$)	2.43 (dd, $J_1=9.5$, $J_2=15.3$)	2.45 (dd, $J_1=9.8$, $J_2=14.8$)	2.42 (dd, $J_1=9.5$, $J_2=15.3$)
6b	2.83 (dd, $J_1=4.0$, $J_2=14.6$)	2.83 (dd, $J_1=9.5$, $J_2=15.3$)	2.87 (dd, $J_1=4.2$, $J_2=14.8$)	2.87 (dd, $J_1=4.0$, $J_2=15.3$)
8	6.11 (t, $J=6.5$)	6.10 (t, $J=6.0$)	6.00 (t, $J=6.5$)	6.02 (t, $J=6.2$)
10a	4.78 (dd, $J_1=6.5$, $J_2=13.2$)	4.75 (dd, $J_1=6.2$, $J_2=13.2$)	4.71 (dd, $J_1=5.8$, $J_2=13.5$)	4.72 (dd, $J_1=6.15$, $J_2=15.5$)
10b	4.68 (m)	4.82-4.88 (m)	4.79 (dd, $J_1=7.5$, $J_2=13.5$)	4.79 (dd, $J_1=7.77$, $J_2=15.15$)
1'	4.85 (d, $J=7.5$)	4.83 (d, $J=7.8$)	4.89 (d, $J=7.7$)	4.90-4.96 (m)
2'	3.64 (bajo H1')	3.64 (bajo H1')	4.96 (t, $J=9.33$)	4.69 (t, $J=8.1$)
3'	3.40-3.70 (m)	3.42-3.55 (m)	3.65-3.70 (m)	4.90-4.96 (m)
4'	3.42-3.55 (m)	3.42-3.55 (m)	3.65-3.70 (m)	3.48 (t, $J=8.4$)
5'	3.40-3.70 (m)	3.42-3.55 (m)	3.49 (m)	3.51 (m)
6'a	3.80 (m)	4.27 (dd, $J_1=2.0$, $J_2=12.3$)	3.81 (dd, $J_1=5.3$, $J_2=12.1$)	4.29 (dd, $J_1=1.8$, $J_2=12.3$)
6'b		4.51 (dd, $J_1=4.3$, $J_2=12.3$)	3.94 (dd, $J_1=3.0$, $J_2=12.1$)	4.49 (dd, $J_1=4.1$, $J_2=12.3$)
C ₇ -OCH ₃	3.65 (s)	3.62 (s)	3.66 (s)	3.64 (s)
C ₁₁ -OCH ₃	3.72 (s)	3.74 (s)	3.74 (s)	3.73 (s)

Tabla 1. Datos espectroscópicos de los compuestos 4, 6, 7 y 8

La acetilación en 2', 6' puede tener lugar a partir del compuesto acetilado en la posición 6', dado que la cantidad de enzima que se incluye es suficientemente alta. Resulta interesante constatar que la posición 3' del anillo de glucosa no se acetila. Este hecho puede achacarse a un efecto de orientación del sustrato sobre la enzima y sugiere que el grupo hidroxilo 3' quedaría más alejado del centro activo que el resto de los hidroxilos.

Se decidió entonces modificar el grupo saliente del dador de acetilo, con el objeto de disminuir la reactividad del mismo, lo que podría dar lugar a un aumento de la selectividad de la acetilación. Para ello se empleó acetato de etilo seco sobre tamiz molecular de 3Å. Éste serviría tanto de disolvente como de reactivo, de tal manera que ahora la transesterificación estaría exclusivamente catalizada por la enzima, aumentándose de manera considerable la sencillez de la operación.

Se llevó a cabo una serie de experimentos, utilizando proporciones variables sustrato/AcOEt/enzima y se siguió el curso de la reacción por HPLC a lo largo de 9 días e inyectando alícuotas a diferentes tiempos. Aunque durante los primeros días sólo se detectó la formación del producto acetilado en 6', el resultado final es idéntico al representado en la Figura 2. Por lo tanto, en este caso, la naturaleza del dador de acetilos no parece tener influencia alguna sobre la regioselectividad de la reacción.

Se hicieron experimentos con otros dadores de grupos acetilo. Al emplear acetato de vinilo y acetato de metilo se obtuvieron resultados similares a los del acetato de etilo. Por otra parte, empleando acetato de *t*-butilo no se produjeron transformaciones apreciables del producto de partida.

Efecto de la temperatura

Como se ha mencionado, las enzimas son particularmente termoestables y activas en disolventes orgánicos. Pensamos que el aumento de la temperatura hasta 100°C (temperatura máxima descrita para mantener la actividad) podría mejorar el rendimiento de la reacción. Se llevaron a cabo experimentos a 80°C con 50 mg de sustrato, 5 ml de acetato de etilo o de vinilo y 340 mg de pancreatina. Se fueron tomando alícuotas cada 24 horas que fueron inyectadas en el cromatógrafo de HPLC.

Las posiciones de acetilación fueron las mismas que en los experimentos llevados a cabo a 39°C (Fig. 2), por lo tanto la temperatura no parece afectar a las posiciones de acetilación. Por otra parte, respecto a los rendimientos, puede deducirse que cada una de las posiciones de acetilación tiene una temperatura y un tiempo de incubación óptimos. Así por ejemplo, el máximo rendimiento para la acetilación en 2' tiene lugar a 80°C y 48 h, mientras que para la acetilación en 6' está a 80°C y 72 h. Finalmente, el producto acetilado en las posiciones 2' y 6' es el mayoritario al cabo de 6 días a 80°C, siendo el rendimiento en este caso del 100%.

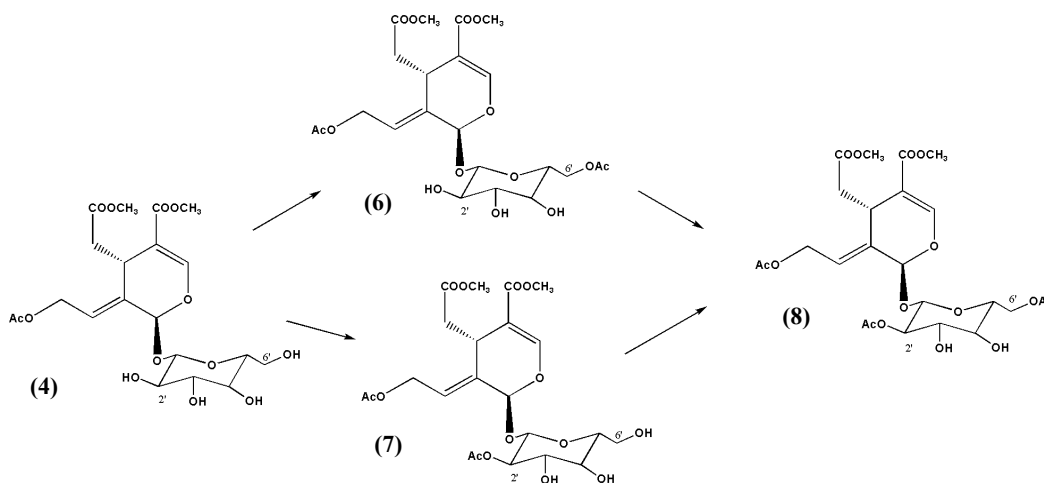
Efecto del tipo de hidrolasa

Como ya se ha mencionado, la pancreatina empleada en estos experimentos es en realidad un extracto de páncreas porcino con actividad hidrolítica que, debido a su bajo coste, se emplea frecuentemente en enzimología "no acuosa" para reacciones de transesterificación.

En el catálogo de SIGMA, empresa que comercializa dicho extracto, se especifica que es una mezcla de ribonucleasa, tripsina, proteasa, amilasa y lipasa, siendo las principales las tres últimas. Decidimos repetir nuestros experimentos utilizando cada una de estas enzimas puras por separado a excepción de la ribonucleasa. Además, ensayamos una lipasa de origen vegetal, la lipasa de germen de trigo.

Los ensayos se llevaron a cabo simultáneamente para todas las enzimas a 50°C, durante 9 días, con las cantidades y condiciones descritas. Para tripsina, proteasa y lipasa de germen de trigo, no se observó transformación apreciable. Para la lipasa se observaron los mismos resultados que para la pancreatina.

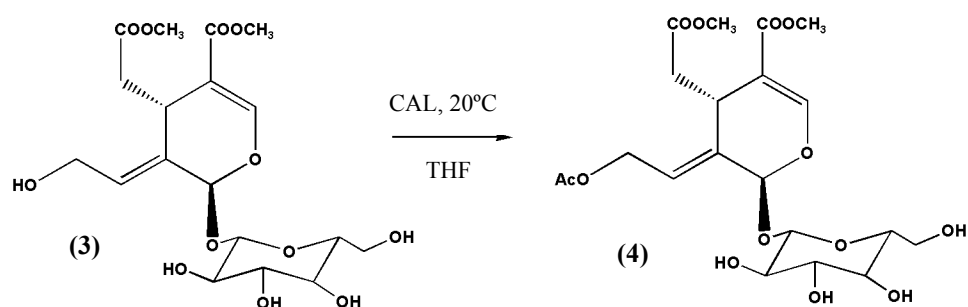
Aunque en cuanto al rendimiento los resultados son muy pobres, podría sugerirse para esta enzima el siguiente esquema.



Esquema 20. Secuencia de acetilación de la lipasa pancreática

De esta manera, por lo que respecta a los tres hidroxilos secundarios, la lipasa pancreática parece ser específica para la posición 2'.

El panorama cambia totalmente cuando se utiliza lipasa de *Candida antarctica* (CAL) (Novozyme corp. de SIGMA). En este caso empleamos como sustrato el 11-hidroxioléosido dimetil éster (3), con objeto de estudiar la regioselectividad de la enzima con respecto a la aglicona o al anillo glucosídico. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente, empleando THF como disolvente y acetato de etilo o vinilo como dador de acetilo.



Esquema 21. Acetilación del 11-hidroxioléósido dimetil éster (3) por CAL

Los resultados de la acetilación de **3**, en función del tiempo de reacción y empleando acetato de vinilo como donador de grupos acetilo, se muestra en la Figura 6.

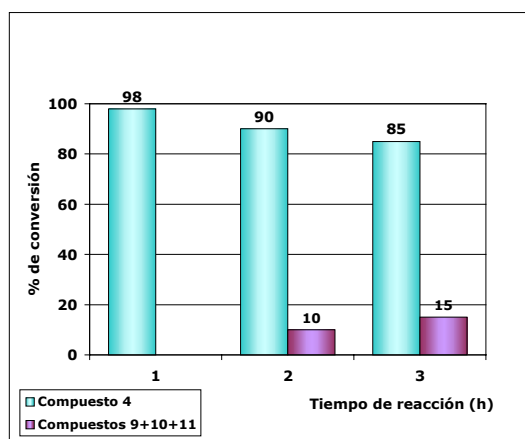
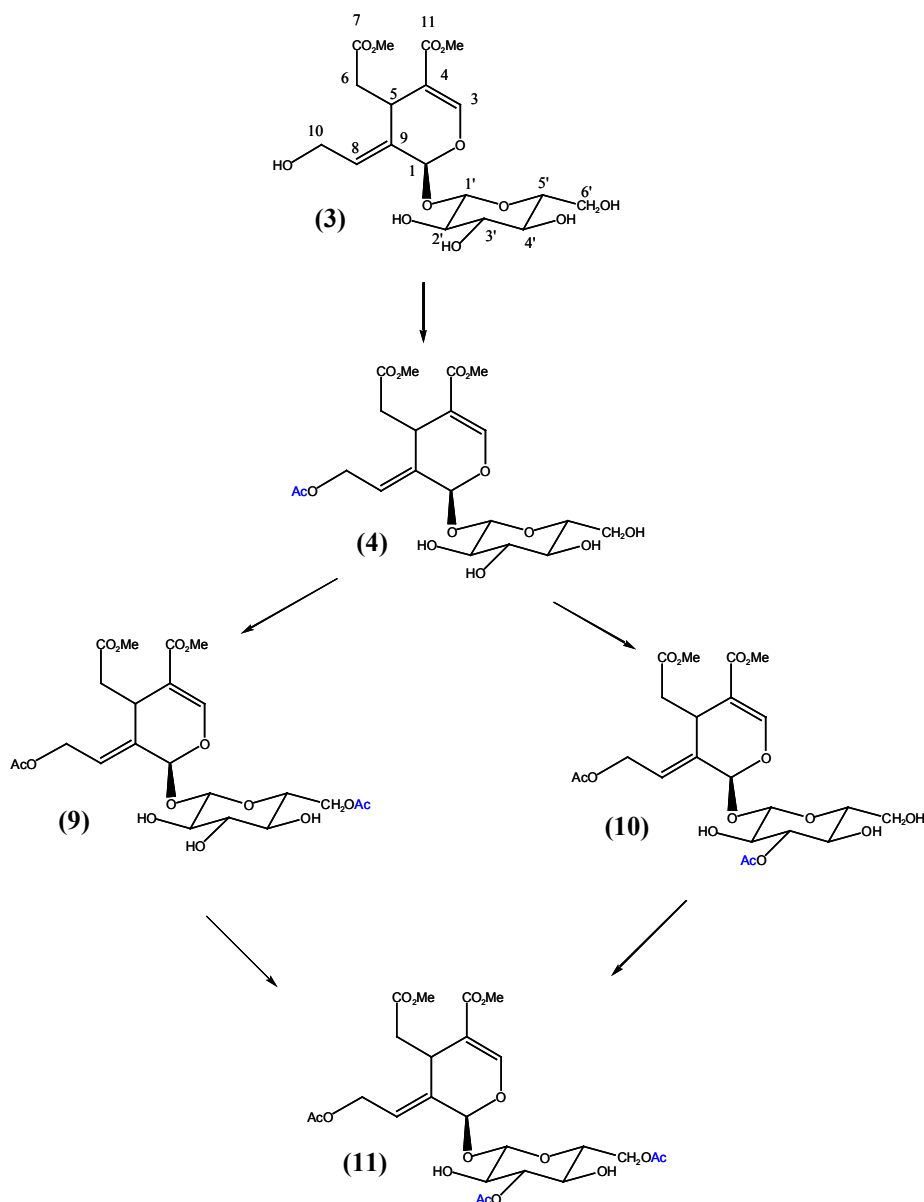


Figura 6. Acetilación del compuesto **3** catalizada por CAL empleando acetato de vinilo como donador de grupos acetilo

En este caso, se obtiene una conversión regioselectiva y casi cuantitativa de **3** en **4** y aunque la acetilación enzimática regioselectiva de glucósidos naturales en medios orgánicos es ampliamente conocida, es bastante inusual que ocurra en la aglicona⁴²⁵.

Después de 2 horas se detectan pequeñas cantidades de los compuestos **9**, **10** y **11** (Esq. 22), lo que significa que la enzima ha comenzado a emplear el compuesto **4** como sustrato.

⁴²⁵ Riva S. J. *Mol. Catal. B: Enzymatic.*, **43**, 19-20, (2002)



Esquema 22. Acetilación regioselectiva de secoiridoides por CAL

Los datos espectroscópicos del compuesto **9** son idénticos a los de 6'-O-acetil-10-acetoxioleósido dimetil éster, que ya ha sido aislado de *Jasminum odoratissimum*⁴²⁴.

Por otra parte, los compuestos **10** y **11** no habían sido previamente descritos y sus estructuras fueron establecidas mediante ¹H y ¹³C-NMR, espectroscopía bidimensional (COSY, HSQC, HMBC y ROESY) y espectrometría de masas FAB de alta resolución.

El compuesto **10** fue aislado como un aceite amarillento que en HR-MS (FAB) dio un peso molecular $[M+Na]^+$ de 541.1522 en concordancia con la fórmula $C_{22}H_{30}O_{14}Na$.

En el espectro de 1H -NMR (Fig. 7), resulta de especial interés la señal a δ 4.97 asignada a H-3'. Este valor corresponde a un desplazamiento paramagnético de 1.5 ppm con respecto al valor de este protón en un derivado no acetilado del glucósido, causado por la presencia de un grupo acetoxi sobre C-3'. Las restantes señales del espectro muestran valores muy similares a los del producto de partida. La información aportada por los experimentos COSY, HMBC y HSQC apoyan la estructura propuesta.

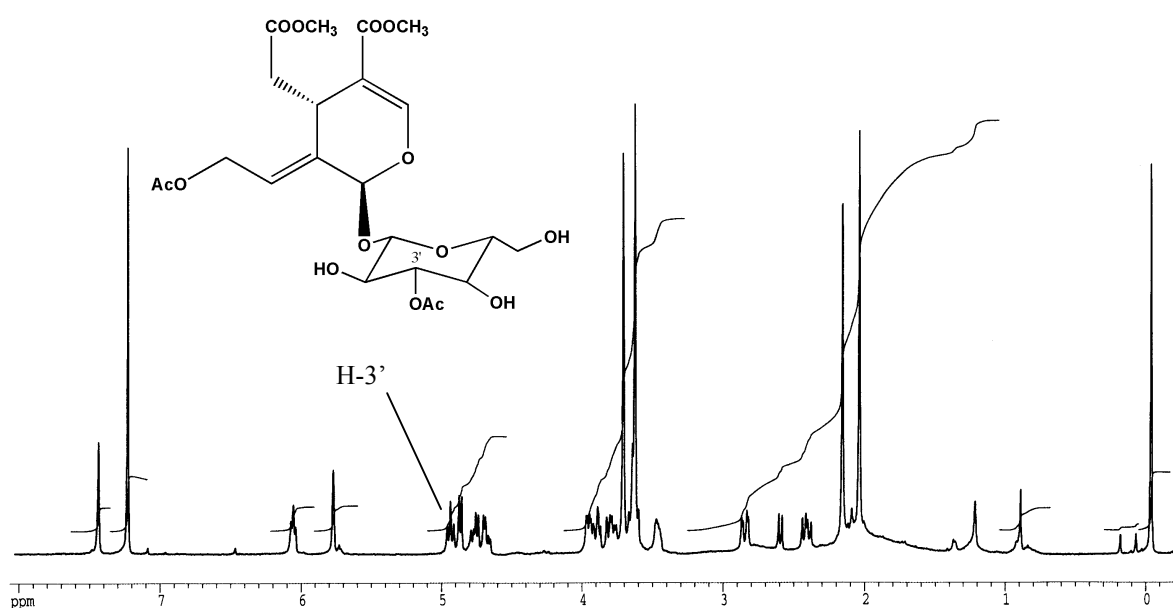


Figura 7. Espectro de 1H -NMR ($CDCl_3$) del compuesto **10**

El compuesto **11** fue aislado, al igual que en el caso anterior, como una sustancia aceitosa y amarillenta. En HR-MS (FAB) dio una masa $[M+Na]^+$ de 583.1571 que corresponde a una fórmula $C_{24}H_{32}O_{15}Na$ que podría implicar la presencia de un grupo acetilo adicional con respecto a los compuestos **9** ó **10**. Esta hipótesis fue confirmada por los datos aportados por el espectro de 1H -NMR (Fig. 8), en el que se observa el desplazamiento paramagnético de la señal asignada a H-3' a δ 4.99 y de los dos protones (6'a y 6'b) del grupo metileno del resto de glucosa en relación con el compuesto de partida (Tabla 2).

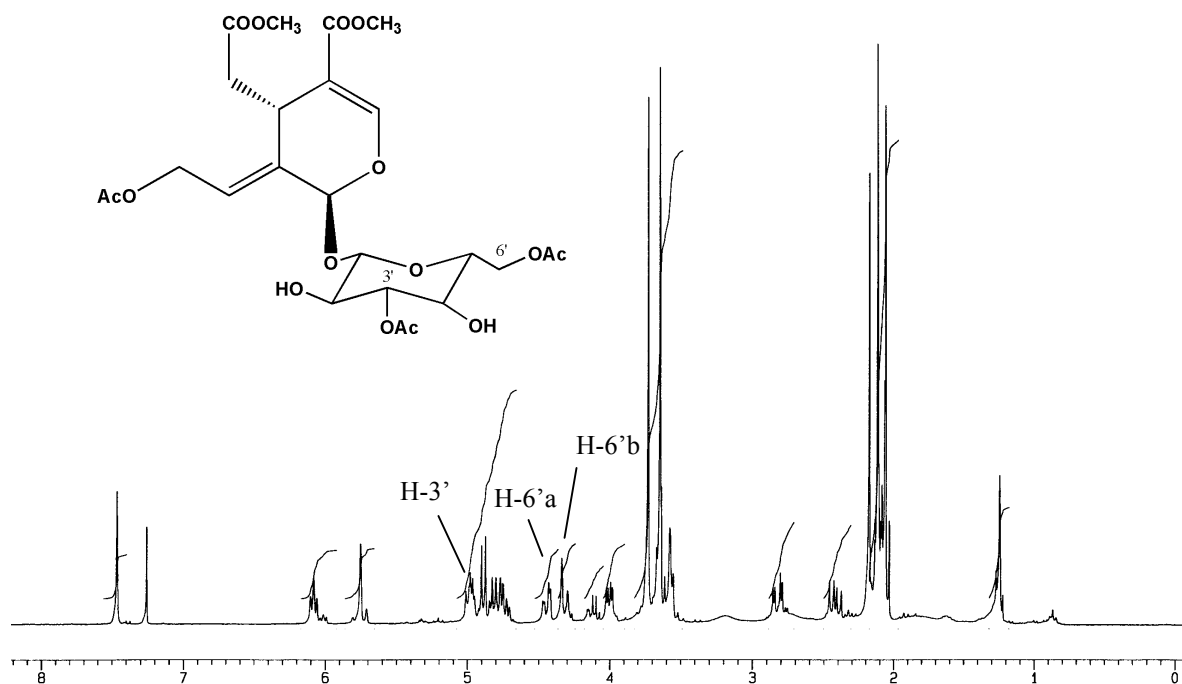
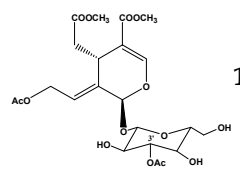
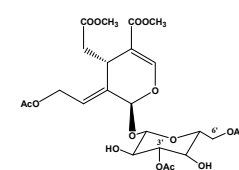


Figura 8. Espectro de ¹H-NMR (CDCl₃) del compuesto 11

	 10		 11	
	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C
1	5.81 (s)	93.7	5.76 (s)	93.2
3	7.47 (s)	153.2	7.47 (s)	153.0
4		108.1		108.2
5	4.00 (dd, $J_1=4.0, J_2=8.0$)	31.2	4.01 (dd, $J_1=3.9, J_2=9.0$)	30.9
6a	2.88 (dd, $J_1=4.0, J_2=16.0$)	40.1	2.83 (dd, $J_1=4.0, J_2=15.3$)	39.8
6b	2.45 (dd, $J_1=8.0, J_2=16.0$)		2.42 (dd, $J_1=9.6, J_2=15.3$)	
7		171.4		166.3
8	6.10 (t, $J=6.4$)	123.8	6.08 (t, $J=6.6$)	123.9
9		131.7	4.74 (dd, $J_1=5.6, J_2=13.5$)	131.5
10a	4.81 (dd, $J_1=8.0, J_2=16.0$)	60.5	4.74 (dd, $J_1=5.6, J_2=13.5$)	60.6
10b	4.72 (dd, $J_1=4.0, J_2=16.0$)		4.84 (dd, $J_1=7.6, J_2=13.5$)	
11		166.3		153.0
1'	4.91 (d, $J=7.8$)	100.1	4.89 (d, $J=7.2$)	99.6
2'	3.61-3.73 (H-2'+H-4')	71.7	3.60-3.70 (m)	74.6
3'	4.97 (t, $J=9.3$)	78.1	4.99 (t, $J=7.3$)	77.2
4'	3.61-3.73 (H-2'+H-4')	69.3	3.58 (m)	68.7
5'	3.51 (m)	76.4	3.60-3.70 (m)	71.6
6'a	3.95 (d, $J=12.0$)	62.0	4.45 (d, $J=12.3$)	62.8

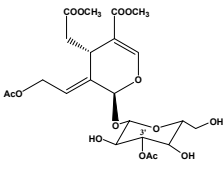
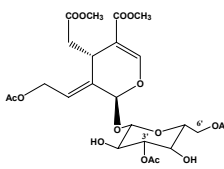
	 10		 11	
	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C
6'b	3.82 (dd, $J_1=4.0$, $J_2=12.0$)		4.33 (d, $J=12.3$)	
C ₁₀ -CH ₃ CO	2.06 (s)	20.9, 170.8	2.06 (s)	20.8, 171.1
C _{3'} -CH ₃ CO	2.18 (s)	21.0, 172.6	2.18 (s)	21.0, 172.3
C _{6'} -CH ₃ CO			2.11 (s)	20.9, 171.5
C ₇ -OCH ₃	3.65 (s)	51.6	3.65 (s)	51.7
C ₁₁ -OCH ₃	3.73 (s)	51.9	3.74 (s)	51.5

Tabla 2. Datos de ¹H-NMR y ¹³C-NMR de los compuestos 10 y 11

Al emplear acetato de etilo como fuente de grupos acetilo (Fig. 9), el compuesto 3 reacciona más lentamente, pero después de 24 horas la acetilación de la aglicona ha ocurrido casi por completo, sin acetilación del azúcar.

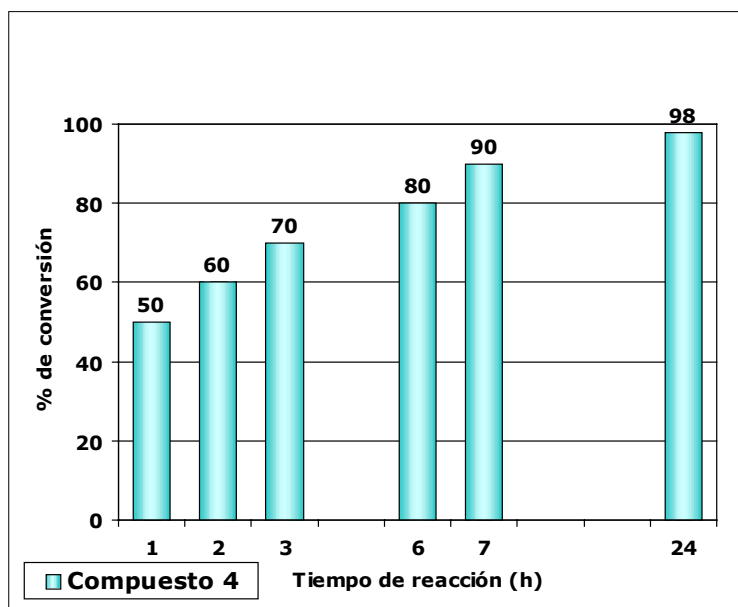


Figura 9. Acetilación del compuesto 3 catalizada por CAL empleando acetato de etilo como donador de grupos acetilo

Cuando el compuesto 4 es utilizado como sustrato por CAL (Figuras 10 y 11) se observa de nuevo cómo el acetato de vinilo es más reactivo que el acetato de etilo, que es a la vez dador de grupos acetilo y disolvente.

La acetilación del azúcar es más lenta y menos regioselectiva que la de la aglicona. La enzima no discrimina entre las posiciones 3' y 6' y después de 10 horas de reacción ambas posiciones están acetiladas.

Tal como se muestra en la Figura 10, la aparición de los intermedios **9** y **10**, sin la presencia de **11** tras 5 horas de reacción, es coherente con la idea de la formación de **11** a partir de **9** y **10** y no directamente a partir de **4**. Esto indica que tanto **9** como **10** deben servir de sustrato para el enzima, obteniéndose en ambos casos el compuesto **11**, tal como muestra el Esquema 22.

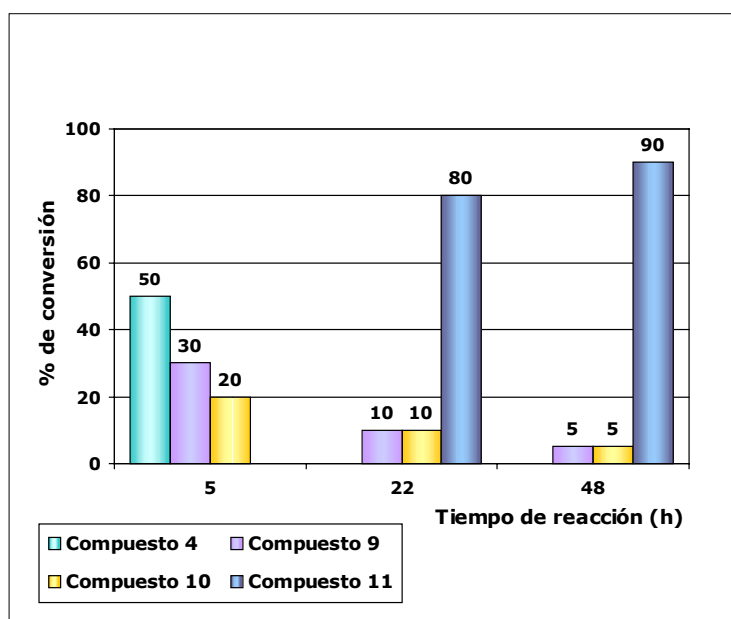


Figura 10. Acetilación del compuesto **4** catalizada por CAL empleando acetato de vinilo como donador de grupos acetilo.

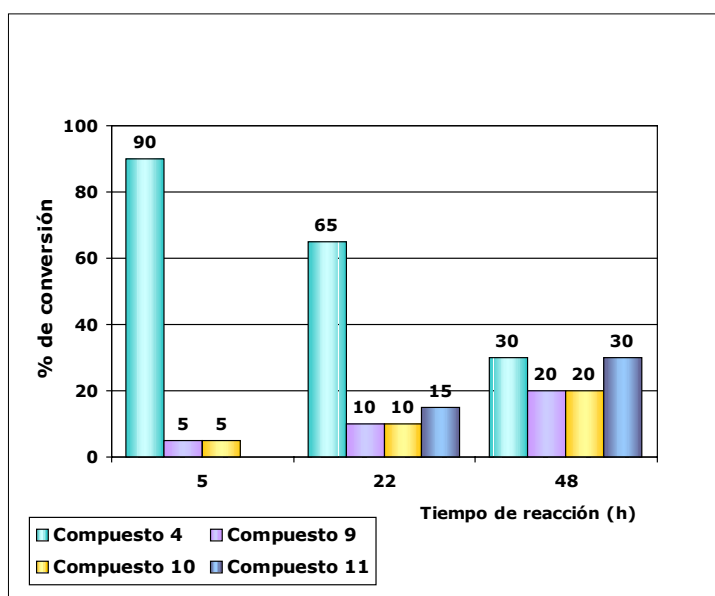


Figura 11. Acetilación del compuesto **4** catalizada por CAL empleando acetato de etilo como donador de grupos acetilo.

La Figura 12 muestra la obtención de **11** a partir de **9** y **10** empleando como donador de grupos acetilo el acetato de vinilo. La acetilación tiene lugar en la posición 3' cuando 6' está ocupada y viceversa.

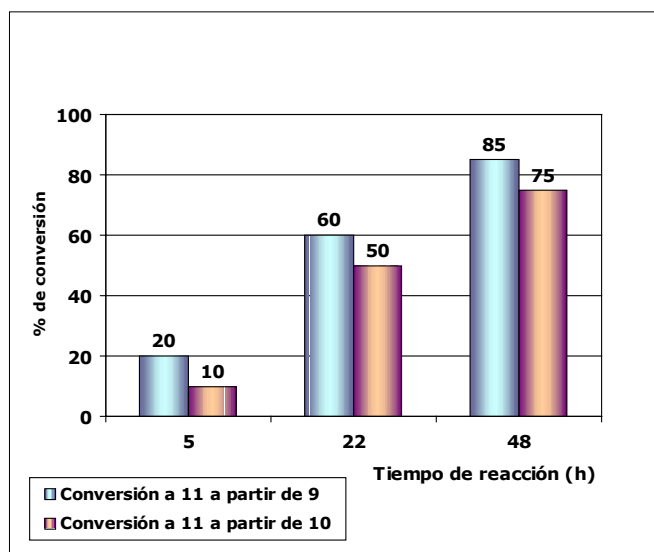
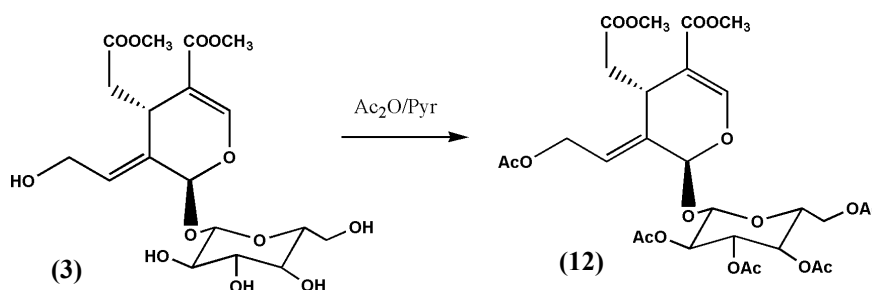


Figura 12. Acetilación de los compuestos **9** y **10** catalizada por CAL empleando acetato de vinilo como donador de grupos acetilo

Finalmente, se decidió emplear el derivado pentaacetilado de 10-hidroxioléosido dimetil éster (**3**) como sustrato para la lipasa de *Candida antarctica*. Se preparó dicho derivado mediante tratamiento del compuesto **3** con anhídrido acético/piridina (Esq. 23). Se obtuvo un compuesto que en espectrometría de masas de alta resolución dio una masa de 644.196503. A este valor corresponde una fórmula $C_{28}H_{36}O_{17}$. El espectro de 1H -NMR (Fig. 13) muestra la presencia de los cinco grupos acetilo entre δ 2.02 y 2.09, así como las restantes señales características del compuesto.



Esquema 23. Obtención del derivado pentaacetilado (**12**) a partir de 10-hidroxioléosido dimetil éster (**3**)

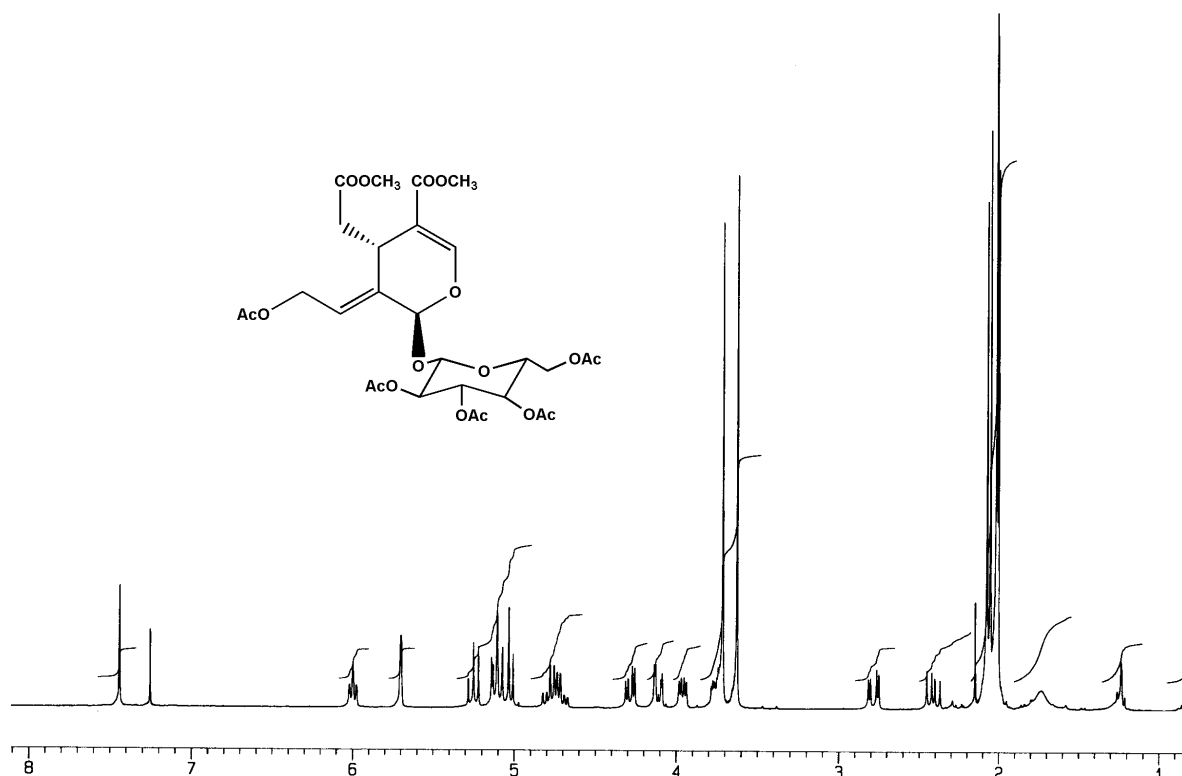


Figura 13. Espectro de ¹H-NMR (CDCl₃) del compuesto **12** (derivado pentaacetilado de 10-hidroxioléosido dimetil éster (**3**))

Al tratar el derivado **12** con CAL, empleando como disolvente la mezcla MeOH/H₂O (5/95) durante 2 horas y a temperatura ambiente, se obtuvo mediante cromatografía HPLC el compuesto **13**. En el espectro de ¹H-NMR (Fig. 14) se puede observar que sólo hay cuatro grupos acetilo. Por otra parte, las señales correspondientes a los protones 10a y 10b del derivado pentaacetilado (**12**) (dos dobles dobletes centrados a δ 4.73 y 4.77), sufren un desplazamiento diamagnético, situándose entre δ 4.27 y 4.38, lo que indica que la desacetilación ha ocurrido únicamente en la genina.

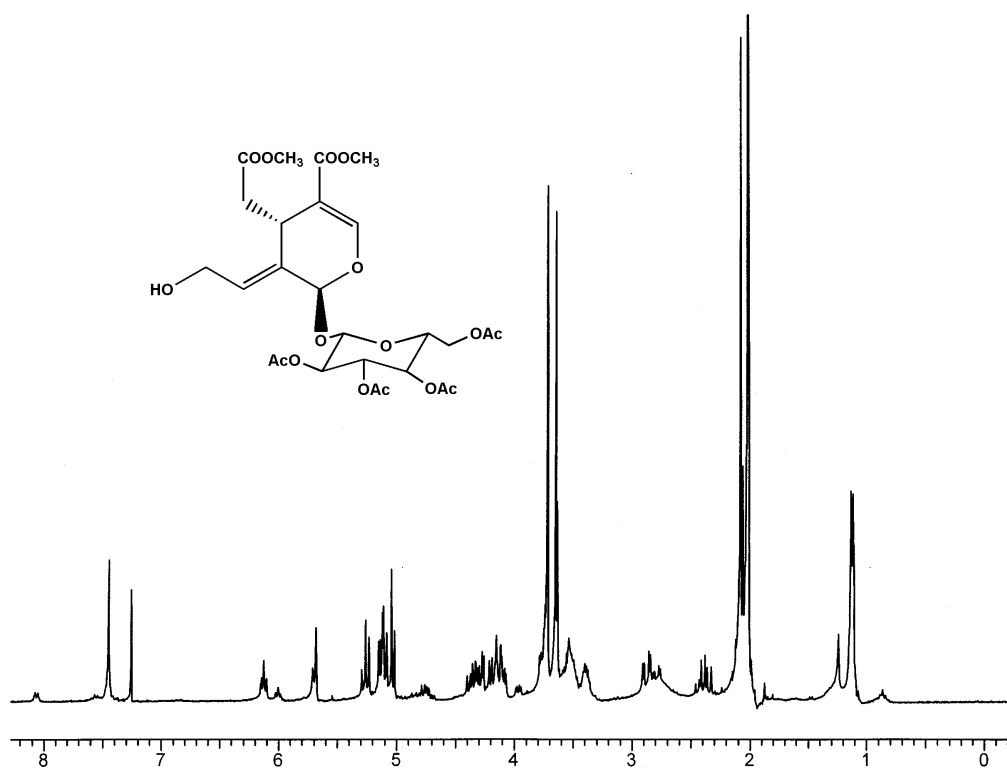
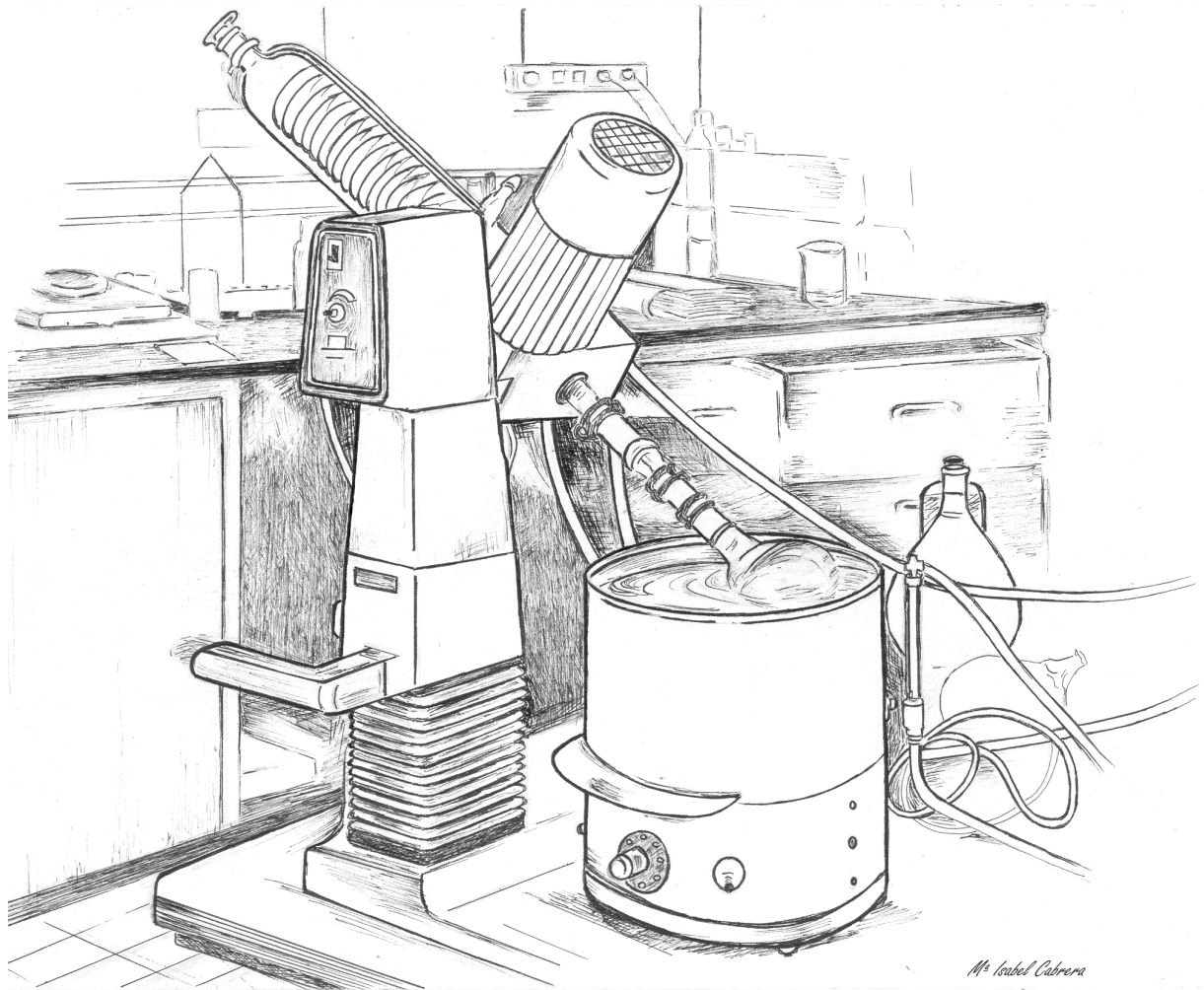
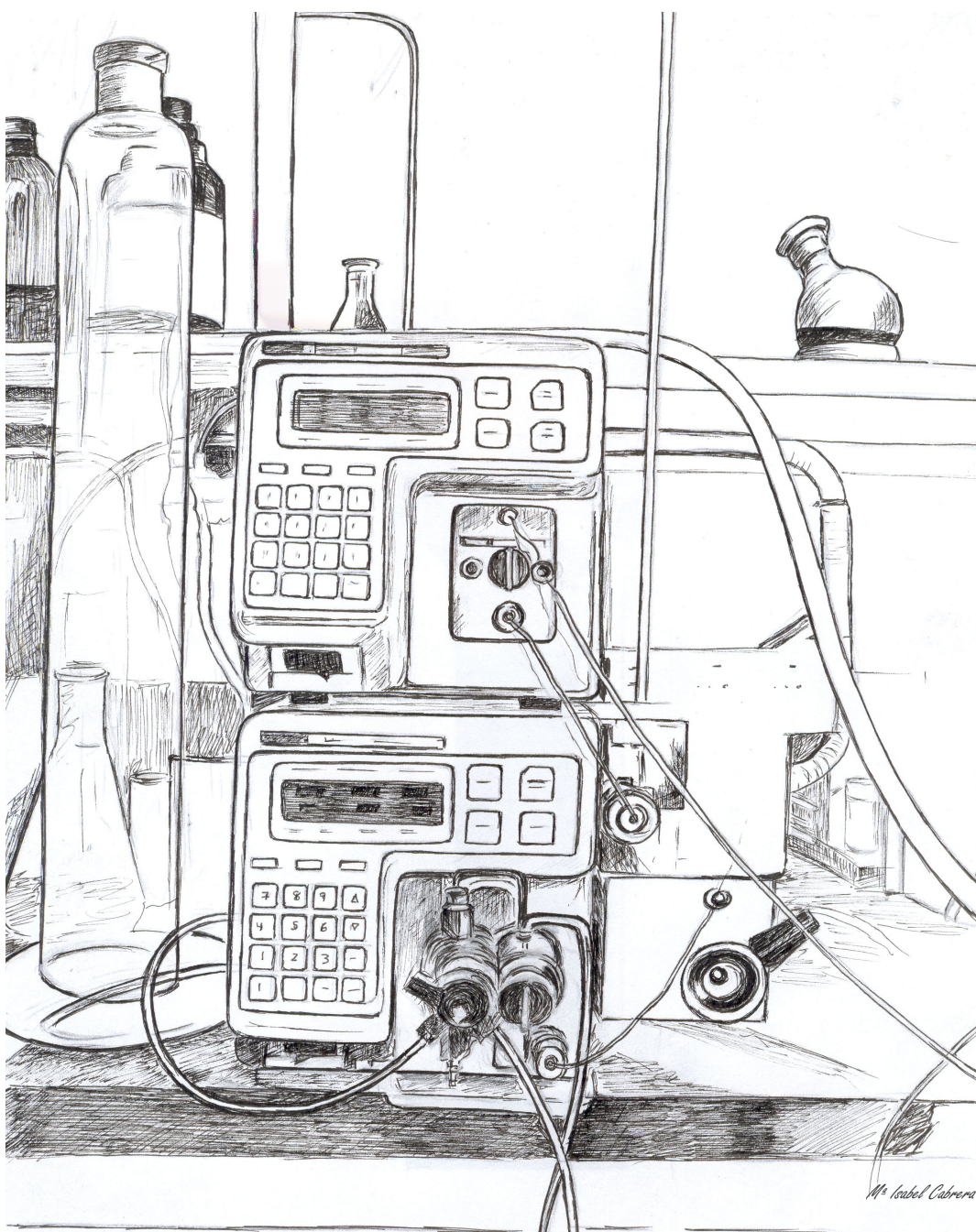


Figura 14. Espectro de ¹H-NMR (CD₃Cl) del compuesto **13** obtenido tras tratar el compuesto **12** con CAL (MeOH/Agua : 5/95)



Parte experimental



Métodos generales e instrumentación

Parte experimental

1. Extracción

Tanto la extracción de la raíz de *Bupleurum handiense* como de la parte aérea de *Justicia hyssopifolia* se llevaron a cabo en un soxhlet con etanol a reflujo, como se describe más adelante.

2. Técnicas cromatográficas

2.1. Cromatografía en capa fina

Las cromatografías en capa fina se realizaron sobre cromatofolios de gel de sílice tipo G, con indicador de luminiscencia a 254 nm Polygram Sil G/UV. Las placas fueron reveladas con vainillina-ácido sulfúrico (0.5 g de vainillina disueltos en 100 ml de una mezcla ácido sulfúrico/etanol 40:10), con óleum (4% de ácido sulfúrico, 80% de ácido acético y 16% de agua) o con permanganato potásico acuoso (disolución de concentración menor del 2%) y posterior calentamiento a 120°C durante varios minutos. Ocasionalmente y con el objeto de seguir la desaparición de los aldehídos aromáticos en los procesos sintéticos que se llevaron a cabo, se empleó un revelador específico de aldehídos (disolución de 2,4-dinitrofenilhidracina 0.4% en ácido clorhídrico 2N).

2.2. Cromatografía en columna

Para cromatografiar los productos se usó gel de sílice (0.063-0.2 mm) de la marca MERCK. Las columnas se montaron aplicando vacío en el extremo inferior de las mismas y vertiendo la gel en su interior al tiempo que se las sometía a vibración. Tras poner la cabeza la columna fue eluida con n-hexano y luego con la mezcla de disolventes apropiada. Como norma general, la cantidad de gel de sílice (0.2-0.5 mm) empleada para formar las cabezas de las columnas fue la mínima necesaria, no excediendo del 10 % en peso de la gel (0.0063-0.2 mm) empleada para la columna.

Para las columnas cromatográficas de Sephadex se empleó SEPHADEX LH-20 de PHARMACIA FINE CHEMICALS. Se colocaron 100 g de Sephadex en un vaso de precipitados de 1 L, se añadieron 410 ml de metanol y se dejó reposar la suspensión durante al menos 12 h tras las cuales se vertió en la columna. Ésta fue estabilizada haciendo pasar la mezcla eluyente en una cantidad igual a tres veces el volumen de la

columna. Una vez filtrada, la muestra a cromatografiar se vertió sobre la parte superior de la columna, disuelta en la mínima cantidad de eluyente.

2.3. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

El aislamiento y purificación de muchos productos se llevó a cabo mediante el empleo de un cromatógrafo de HPLC, equipado con una bomba JASCO PU-980 y un detector JASCO UV-975.

Se emplearon columnas Supelco de 10 x 250 mm rellenas de gel de sílice con tamaño de partícula de 5 μm . Para las mezclas eluyentes se emplearon disolventes purificados y filtrados en nuestro laboratorio.

3. Instrumentación

3.1. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (NMR)

Los espectros de ^1H -NMR y ^{13}C -NMR se realizaron en un espectrómetro de 300 MHz, Bruker Avance 300, empleando deuterocloroformo como disolvente y tetrametilsilano (TMS) como referencia interna, salvo que se indique otra cosa. Los valores de desplazamiento químico (δ) se expresan en ppm y las constantes de acoplamiento (J) se expresan en Hz. Los espectros bidimensionales (COSY, HSQC, HMBC y ROESY) se realizaron en un espectrómetro Bruker Avance 400 (400 MHz), utilizando deuterocloroformo como disolvente.

3.2. Espectroscopía infrarroja

Los espectros de infrarrojo se realizaron en un espectrofotómetro Bruker IFS 55/28 (FTIR) en pastillas de cloruro sódico. Los valores de $\nu_{\text{máx}}$ se expresan en cm^{-1} .

3.3. Espectroscopía ultravioleta

Los espectros de ultravioleta se llevaron a cabo en un espectrofotómetro Jasco V-560, empleando una celda de cuarzo de 5 mm. Como disolvente se utilizó etanol. Los valores de $\lambda_{\text{máx}}$ se expresan en nm.

3.4. Espectrometría de masas de baja y de alta resolución

Los espectros de masas de baja y de alta resolución se realizaron en un espectrómetro VG AutoSpec de sector magnético a potenciales de ionización de 70 eV.

3.5. Rotación óptica

La actividad óptica se determinó en un polarímetro Perkin Elmer, modelo 343, empleando la línea D del sodio a 25°C y en disolución de cloroformo seco en células de 1 dm. La concentración se expresa en g/100 ml de disolución.

3.6. Puntos de fusión

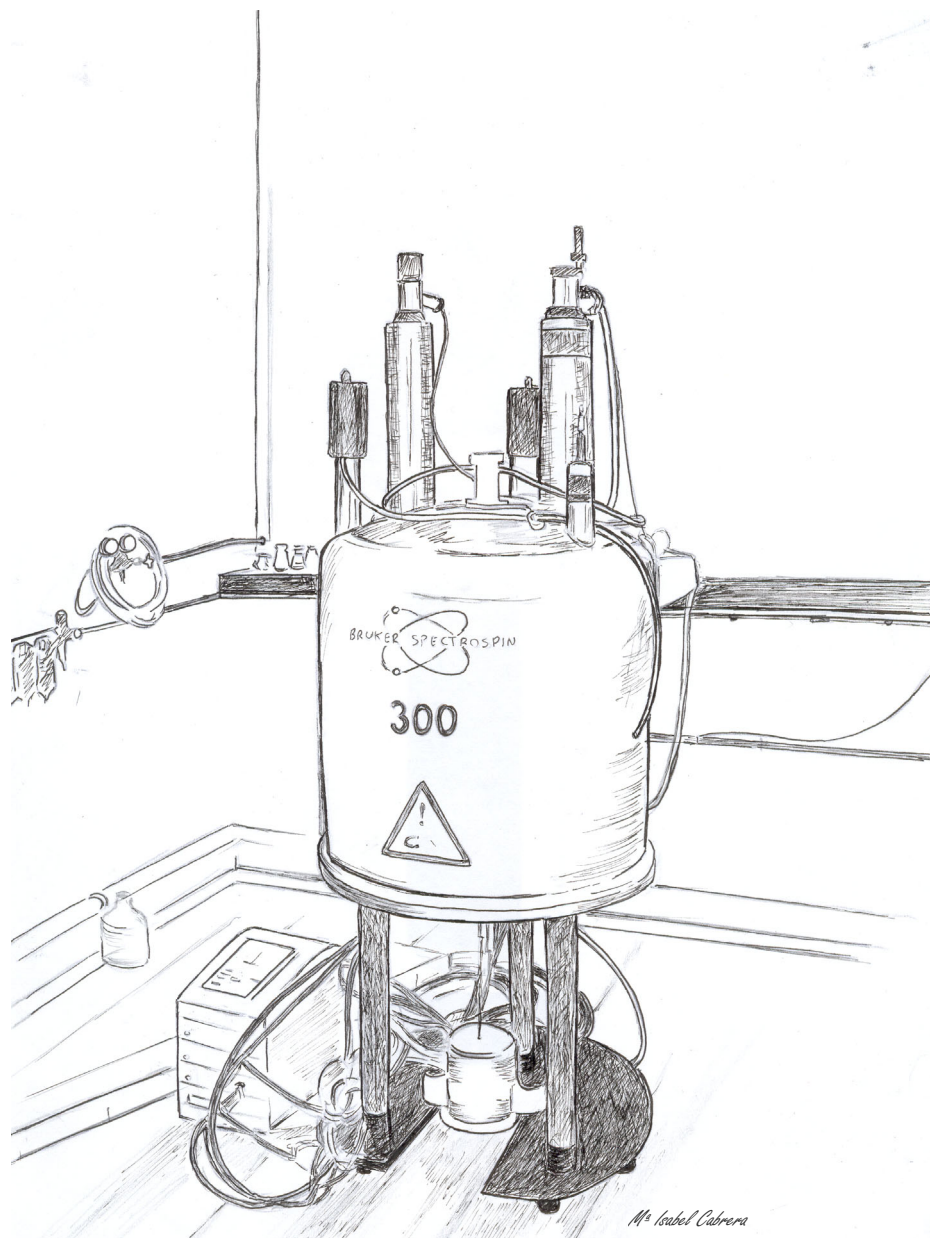
Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Buchi modelo 535. Los datos se expresan en grados centígrados y sin corregir.

3.7. Disolventes y reactivos

Los disolventes fueron secados y destilados empleando métodos estándar. Tanto el tetrahidrofurano (THF) como la diisopropilamina fueron secados y destilados sobre sodio metálico. La hexametilfosfotriamida (HMPA) fue secada y destilada sobre hidruro cálcico y almacenada sobre tamiz molecular. Normalmente los reactivos se usaron en su forma comercial sin purificación. Los reactivos organometálicos (*n*-BuLi y LDA) fueron valorados antes de ser utilizados, empleando *N*-bencilbenzamida como indicador⁴²⁶.

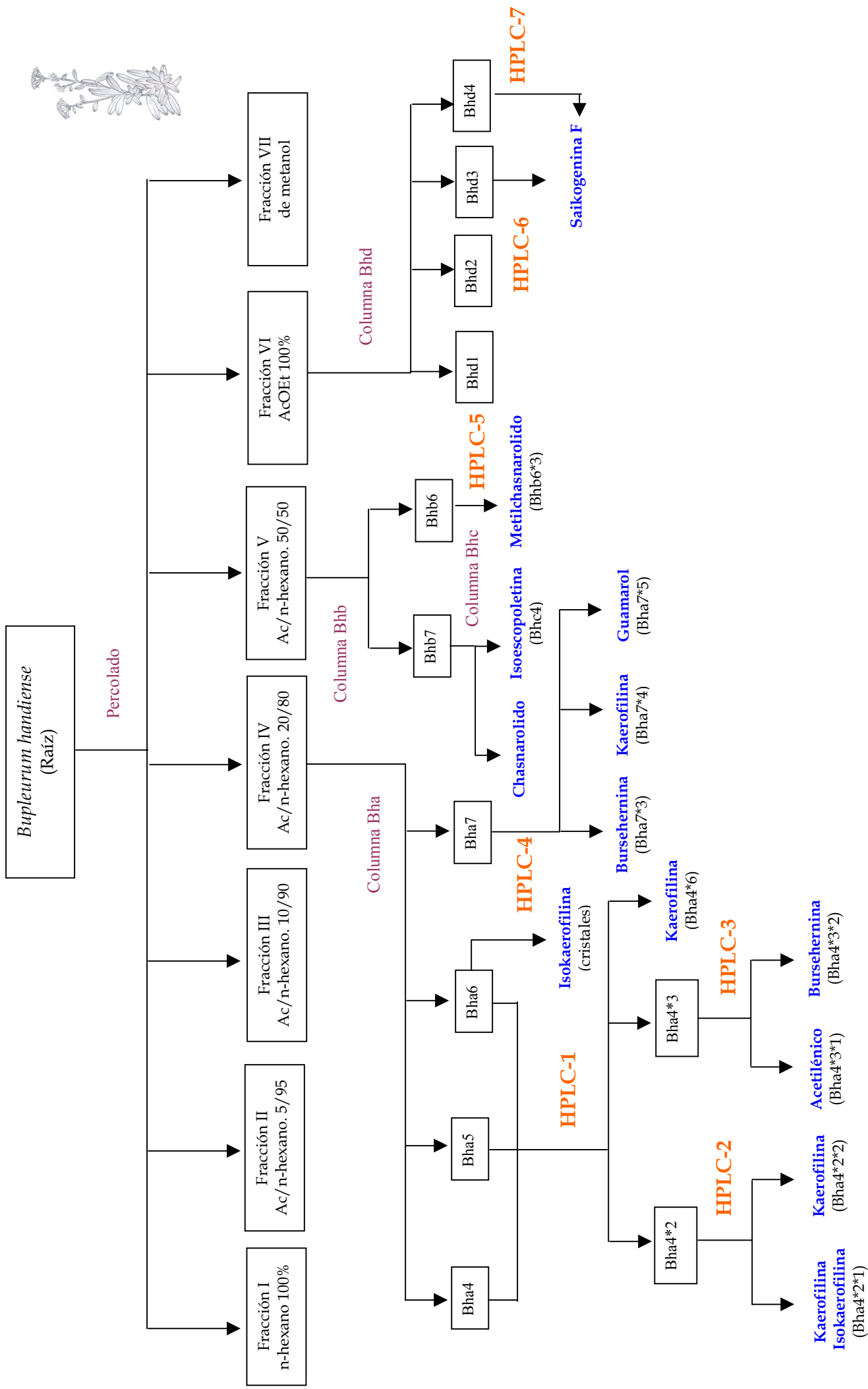
Los productos de origen natural y sintético se han nombrado en la parte experimental empleando su nombre trivial o la nomenclatura sistemática (IUPAC), dada por un programa informático. No obstante, con el objeto de mantener una única numeración para todos los lignanos, las asignaciones de los espectros de ¹H-NMR y ¹³C-NMR se han realizado siguiendo la numeración clásica de estos compuestos. Ésta consiste en numerar del 1 al 6 los carbonos de un anillo aromático, empezando por aquel carbono que lleve unida la cadena lateral, la cual es numerada del 7 al 8. La otra subunidad C₆-C₃ es numerada del mismo modo, añadiéndose una prima (') para diferenciarla de la primera.

⁴²⁶ Burchat A. F., Chong J.M., Nielsen N. *Journal of Organometallic Chemistry*, 542, 281-3, (1997)



Separación cromatográfica y datos espectroscópicos de los productos aislados del extracto etanólico de la raíz de *Bupleurum handiense*

Parte experimental



Aproximadamente 3.6 Kg de raíces secas de *Bupleurum handiense*, cultivada y recolectada en el jardín del Instituto Universitario de Bioorgánica "Antonio González" en enero de 1998 y secadas a la sombra, se extrajeron con etanol a reflujo hasta agotamiento, obteniéndose un extracto que concentrado y seco pesó unos 200 g.

Columna de percolado

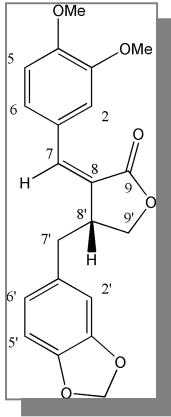
El extracto obtenido de la manera anteriormente descrita fue disuelto en la cantidad apropiada de metanol y se absorbió sobre gel de sílice de 0.2-0.5 mm. Posteriormente, se montó una columna cromatográfica de percolado con gel de capa fina 60 pF₂₅₄₊₃₆₆ y a vacío que fue eluida primero con n-hexano para eliminar ceras en la medida de lo posible y luego con mezclas de acetato de etilo/n-hexano de polaridad creciente hasta llegar a acetato de etilo 100%. Se obtuvieron, de este modo, 7 fracciones (I, II, III, IV, V, VI y VII), teniendo las dos primeras, una vez llevadas a sequedad, el aspecto y el olor característico de las ceras.

Fracción de percolado IV (extraída con acetato de etilo/n-hexano 20/80)

La fracción IV de la columna de percolado, de peso aproximado 7 g, fue disuelta en metanol y absorbida sobre gel de 0.2-0.5 mm con el objeto de preparar una cabeza. Esta fracción fue cromatografiada mediante una columna gravitatoria de gel de sílice 0.2-0.063 mm que denominamos *Bha* y que fue eluida con n-hexano, aumentando la polaridad de un modo gradual con mezclas de acetato de etilo/n-hexano.

La evolución de la columna se siguió por capa fina y empleando vainillina-ácido sulfúrico como revelador, reuniéndose aquellas fracciones que parecían tener los mismos productos. Se obtuvieron 7 fracciones (Bha1...Bha7), siendo descartadas las 3 primeras por contener gran cantidad de ceras. De la fracción Bha6 se separaron cristales cuyo estudio espectroscópico reveló que se trataba de un lignano conocido en la literatura química como **isokaerofilina**.

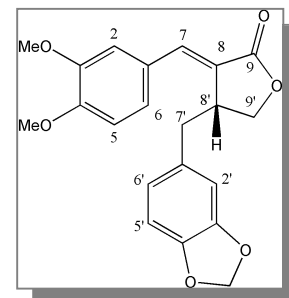
Producto-1. **Isokaerofilina**

Punto de fusión:	130° C	
$[\alpha]_D^{20}$:	-76.4 (c=0.6, CHCl ₃)	
UV $\lambda_{\text{máx}}$ (EtOH) nm:	337, 293, 237	
IR $\nu_{\text{máx}}$ (CHCl ₃) cm ⁻¹ :	1735, 1630, 1600, 1580, 1028, 938	
HR-MS:	[M] ⁺ a m/z 368.1257 (C ₂₁ H ₂₀ O ₆ requiere 368.1256)	
MS m/z (%):	368 [M] ⁺ (20), 233 (100), 177 (43), 151 (2), 135 (61)	
¹ H-NMR (CDCl ₃) δ :	2.79 (dd, $J_1=9.0$ Hz, $J_2=13.7$ Hz, 1H, H-7' α), 2.95 (dd, $J_1=6.6$ Hz, $J_2=13.7$ Hz, 1H, H-7' β), 3.23-3.30 (m, 1H, H-8'), 3.91 (s, 3H, OMe), 3.94 (s, 3H, OMe), 4.11 (dd, $J_1=3.9$ Hz, $J_2=9.0$, 1H, H-9' α), 4.33 (dd, $J_1=7.1$, $J_2=9.0$ Hz, 1H, H-9' β), 5.96 (s, 2H, OCH ₂ O), 6.62 (d, $J=1.5$ Hz, 1H, H-7), 6.64 (d, $J=1.8$ Hz, 1H, H-2'), 6.68 (dd, $J_1=1.8$ Hz, $J_2=8.0$, 1H, H-6'), 6.77 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, H-5'), 6.84 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, H-5), 7.17 (dd, $J_1=2.0$ Hz, $J_2=8.0$ Hz, 1H, H-6), 8.09 (d, $J=2.0$ Hz, 1H, H-2).	
¹³ C-NMR (CDCl ₃) δ :	40.96 (t, C-7'), 44.55 (d, C-8'), 56.00 (q, OMe), 56.07 (q, OMe), 69.97 (t, C-9'), 101.21 (t, OCH ₂ O), 108.52 (d, C-5'), 109.44 (d, C-5+C-2'), 110.43 (d, C-2), 122.42 (d, C-6'), 124.85 (d, C-6), 125.86 (s, C-8), 127.01 (s, C-1), 131.64 (s, C-1'), 140.81 (d, C-7), 146.60 (s, C-3'), 148.00 (s, C-4), 148.08 (s, C-4'), 148.54 (s, C-3), 169.75 (s, C-9)	

Columna HPLC-1

Las fracciones Bha4, Bha5 y las aguas madres de Bha6 mostraron ser iguales en capa fina, por lo que fueron finalmente reunidas con el objeto de estudiarlas por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). Tras eliminar el disolvente a vacío se obtuvo un extracto de color ámbar y peso de 1.86 g que, después de ser disuelto en AcOEt/n-hexano 35/65, fue filtrado e inyectado en el cromatógrafo de HPLC empleando como mezcla eluyente la misma en la que fue disuelto el extracto. Mediante esta separación, a la que se denominó HPLC-1, se obtuvieron las fracciones

Bha4*2, Bha4*3 y Bha4*6, correspondiendo esta última con el lignano conocido como **kaerofilina** y que tiene un tiempo de retención (t_R) en esta columna y con esta mezcla eluyente de 16.06 minutos.



Producto-2. **Kaerofilina**

UV $\lambda_{\text{máx}}$ (EtOH) nm: 330, 293, 237

IR $\nu_{\text{máx}}$ (CHCl_3) cm^{-1} : 1750, 1652, 1600, 1520, 1258, 1205, 1185, 1140, 1040, 1020, 990, 935, 890

HR-MS: $[\text{M}]^+$ a m/z 368.1215 ($\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_6$ requiere 368.1260)

MS m/z (%): 368 $[\text{M}]^+$ (58), 233 (100), 177 (54), 151 (4), 135 (100)

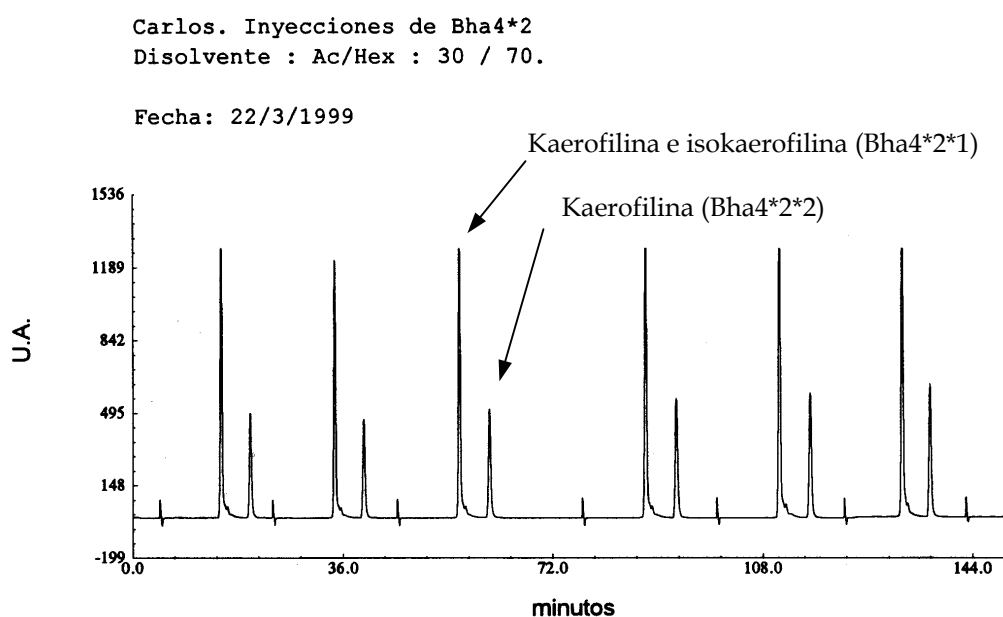
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 2.61 (dd, $J_1=4.4$ Hz, $J_2=14.3$ Hz, 1H, H-7' α), 3.04 (dd, $J_1=4.4$ Hz, $J_2=14.3$ Hz, 1H, H-7' β), 3.75-3.91 (m, 1H, H-8'), 3.91 (s, 3H, OMe), 3.94 (s, 3H, OMe), 4.26 (d, $J=4.6$ Hz, 2H, H-9'), 5.93 (s, 2H, OCH_2O), 6.62 (dd, $J_1=1.5$ Hz, $J_2=7.6$ Hz, 1H, H-6'), 6.64 (s, 1H, H-2'), 6.72 (d, $J=7.6$ Hz, 1H, H-5'), 6.93 (d, $J=8.3$ Hz, 1H, H-5), 7.04 (d, $J=1.9$ Hz, 1H, H-2), 7.21 (dd, $J_1=1.9$ Hz, $J_2=8.3$ Hz, 1H, H-6), 7.53 (d, $J=1.8$ Hz, 1H, H-7)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 37.59 (t, C-7'), 39.88 (d, C-8'), 56.15 (q, OMe), 69.65 (t, C-9'), 101.22 (t, OCH_2O), 108.62 (d, C-5'), 109.17 (d, C-2'), 111.50 (d, C-5), 113.15 (d, C-2), 122.08 (d, C-6'), 123.75 (d, C-6), 125.84 (d, C-8), 127.05 (s, C-1), 131.64 (s, C-1'), 137.58 (d, C-7), 146.73 (s, C-4'), 148.13 (s, C-3'), 149.30 (s, C-4), 150.90 (s, C-3), 172.71 (s, C-9)

Columna HPLC-2

El espectro de $^1\text{H-NMR}$ de Bha4*2 reveló que se trataba de la mezcla de dos productos, por lo que se decidió volver a inyectar esta fracción en el cromatógrafo de HPLC (HPLC-2) con la mezcla eluyente acetato de etilo/n-hexano 30/70. Se obtuvo un cromatograma con dos picos claramente diferenciados, que dieron lugar a las fracciones denominadas Bha4*2*1 y Bha4*2*2. Los datos espectroscópicos confirmaron que esta última se corresponde con la kaerofilina, mientras que la fracción Bha4*2*1

continuó siendo una mezcla de dos productos (kaerofilina e isokaerofilina). Pese a que, como puede observarse en el Cromatograma 1, los picos están perfectamente definidos y separados, el primero de ellos es una mezcla de isokaerofilina y kaerofilina similar al producto de partida que fue cromatografiado. Una posible explicación es que se trate de una isomerización del isómero *cis* al *trans* debido a trazas de ácido clorhídrico en el deuterocloroformo. Esto ya ha sido descrito para los lignanos salicifolina (*cis*) e isosalicifolina (*trans*), aislados de *Bupleurum salicifolium*³³⁶.

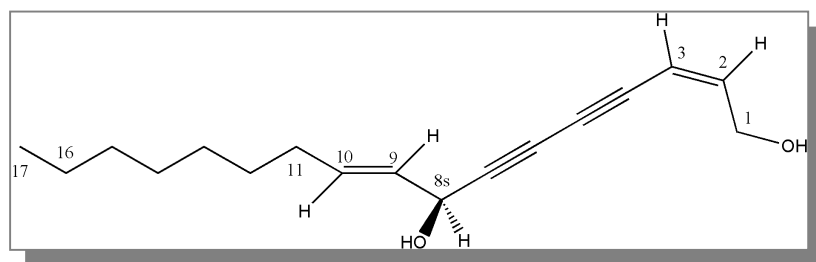


Cromatograma 1. Separación de las fracciones Bha4*2*1 y Bha4*2*2

Columna HPLC-3

La fracción Bha4*3 también resultó ser una mezcla de dos productos por lo que, una vez disuelta en el disolvente apropiado, fue cromatografiada (HPLC-3, Cromatograma 2) con la mezcla eluyente acetato de etilo/n-hexano 30/70, obteniéndose de esta manera dos productos: Bha4*3*1 ($t_R = 16.33$ minutos), cuyo nombre sistemático es **2,9-heptadecadien-4,6-diino-1,8-diol** y Bha4*3*2 ($t_R = 17.48$ minutos), con datos espectroscópicos idénticos a los del lignano conocido como **bursehernina**.

Producto-3. **2(z),9(z)-Heptadecadien-4,6-diino-1,8-diol (Bha4*3*1)**



$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ + 270° (CHCl₃)

UV $\lambda_{\text{máx}}$ (EtOH) nm: 316, 288, 270, 228

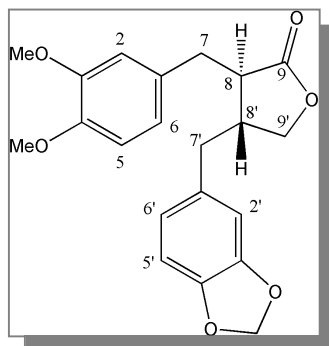
IR $\nu_{\text{máx}}$ (CHCl₃) cm⁻¹: 3468, 2931, 2860, 2373, 1634, 1454, 1326, 1268, 1023

HR-MS: [M]⁺ a m/z 260.1891 (C₁₇H₂₄O₂ requiere 260.1776)

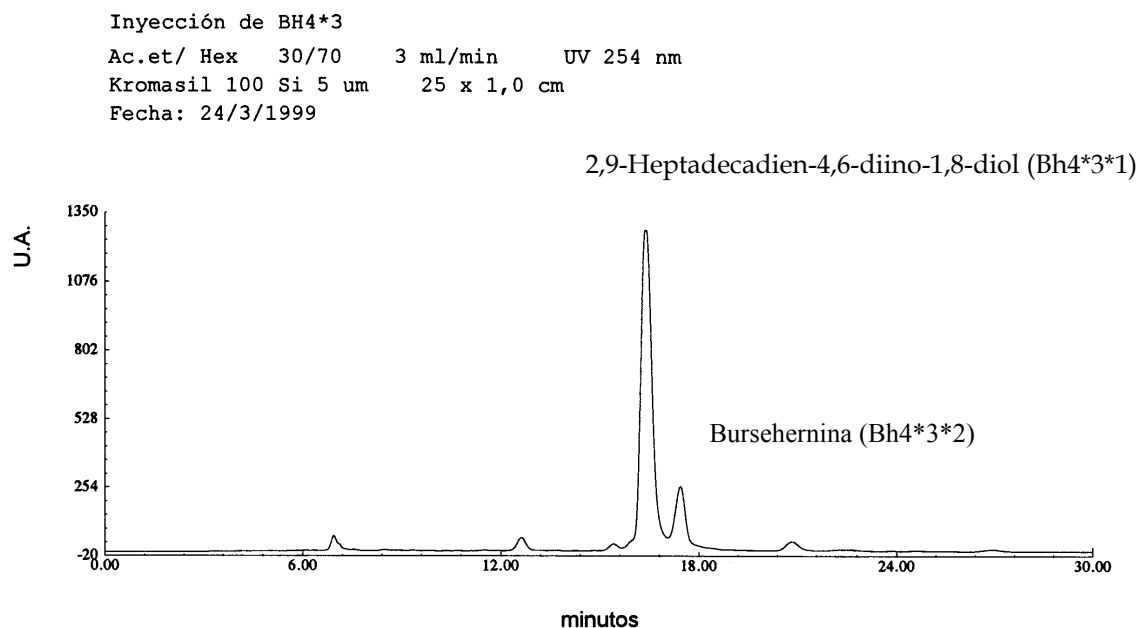
MS m/z (%): 260 [M]⁺(5), 242 (29), 171 (44), 157 (80), 129(100), 115 (65)

¹H-NMR (CDCl₃) δ : 0.88 (t, 3H, *J*=6.9 Hz, -CH₃-17), 1.2-1.4 (m, 10H, (-CH₂-)₁₂₋₁₆), 1.85 (d, 1H, *J*=5.4 Hz), 2.12 (q, 2H, *J*=7 Hz, H-11), 4.42 (dd, 2H, *J*₁=1.3 Hz, *J*₂=6.4 Hz, H-1a y H-1b), 5.25 (dd, 1H, *J*₁=5.4 Hz, *J*₂=8.2 Hz, H-8), 5.50 (m), 5.59-5.65 (m, 2H, H-10 y H-3), 6.26 (dt, 1H, *J*₁=1.6 Hz, *J*₂=6.4 Hz, *J*₃=11.0 Hz, H-2)

¹³C-NMR (CDCl₃) δ : 14.1 (q, C-17), 22.6 (t, C-16), 27.7 (t, C-11), 29.1 (t, C-12), 29.1 (t, C-13), 29.3 (t, C-14), 31.8 (t, C-15), 58.1 (d, C-8), 61.2 (t, C-1), 68.7 (s, C-7), 74.4 (s, C-4), 78.7 (s, C-5), 83.4 (s, C-6), 109.2 (d, C-3), 127.8 (d, C-10), 134.6 (d, C-9), 145.9 (d, C-2)

Producto-4. **Bursehernina**

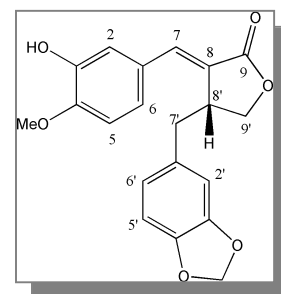
- UV $\lambda_{\text{m\acute{a}x}}$ (EtOH) nm: 284, 233.5
- IR $\nu_{\text{m\acute{a}x}}$ (CHCl₃) cm⁻¹: 2860, 1737, 1595, 1480, 1340, 1240, 1090, 960, 800
- HR-MS: [M⁺] a m/z 370.1398 (C₂₁H₂₂O₆ requiere 370.1416)
- MS m/z (%): 370 [M⁺] (44), 192 (4), 178 (11), 177 (16), 151 (82), 135 (100)
- ¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ : 2.48 (m, 1H, H-8'), 2.57 (m, 3H, H-8, H-7' α , H-7' β), 2.83 (m, 1H, H-7 β), 2.97 (m, 1H, H-7 α), 3.84 (s, 3H, -OCH₃), 3.85 (s, 3H, -OCH₃), 3.86 (m, 1H, H-9'), 4.12 (m, 1H, H-9'), 5.92 (d, 2H, J=0.8 Hz, OCH₂O), 6.44 (s, 1H, H-2'), 6.45 (dd, 1H, J₁=0.9 Hz, J₂=8 Hz, H-6'), 6.67 (d, 1H, J=2 Hz, H-2), 6.68 (d, 1H, J=8 Hz, H-5'), 6.68 (dd, 1H, J=8 Hz, H-6), 6.78 (d, 1H, J=8 Hz, H-5)
- ¹³C-NMR (CDCl₃) δ : 130.1 (C-1), 112.2 (C-2), 149.1 (C-3), 147.9 (C-4), 111.1 (C-5), 121.3 (C-6), 38.3 (C-7), 41.0 (C-8), 178.6 (C-9), 131.5 (C-1'), 108.8 (C-2'), 148.0 (C-3'), 146.3 (C-4'), 108.2 (C-5'), 121.6 (C-6'), 34.6 (C-7'), 46.5 (C-8'), 71.1 (C-9'), 101.1 (-OCH₂O-)



Cromatograma 2. Separación de las fracciones Bha4*3*1 y Bha4*3*2

Columna HPLC-4

La fracción Bha7 de peso 615 mg, obtenida a partir de la fracción IV de percolado mediante la columna *Bha* con mezcla AcOEt/n-hexano al 50%, fue disuelta en la mezcla apropiada e inyectada en el cromatógrafo de HPLC (HPLC-4), empleando como eluyente AcOEt/n-hexano 40/60. Se aislaron, de este modo, los siguientes productos: bursehernina (Bha7*3) (t_R = 11.50 minutos), kaerofilina (Bha7*4) (t_R = 12.50 minutos) y **guamarol** (Bha7*5) (t_R = 12.91 minutos). Con el objeto de obtenerlo con mayor pureza, este último fue inyectado de nuevo en el cromatógrafo con la misma mezcla eluyente obteniéndose el Cromatograma 3.

Producto-5. **Guamarol**

UV $\lambda_{\text{m\acute{a}x}}$ (EtOH) nm: 331, 291, 232

IR $\nu_{\text{m\acute{a}x}}$ (CHCl₃) cm⁻¹: 1748, 1642, 1609, 1442, 1185, 1097

HR-MS: [M]⁺ a m/z 354.1110 (C₂₀H₁₈O₆ requiere 354.1098)

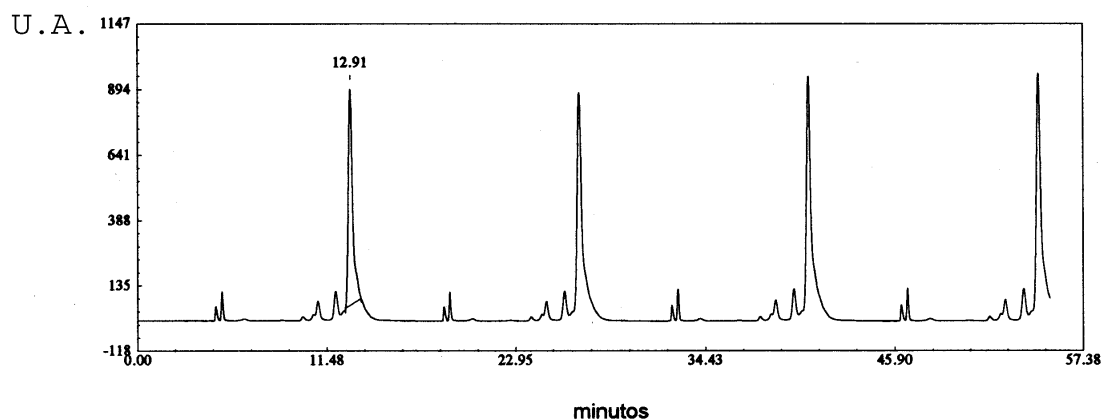
MS m/z (%): 354 [M]⁺ (13), 219 (35), 177 (2), 135 (100)

¹H-NMR (CDCl₃) δ : 2.61 (dd, $J_1=10.3$ Hz, $J_2=14.2$ Hz, 1H, H-7'a), 3.03 (dd, $J_1=4.2$ Hz, $J_2=14.2$ Hz, 1H, H-7'b), 3.79 (m, 1H, H-8'), 3.95 (s, 3H, -OMe), 4.25 (t, $J_1=2.6$ Hz, $J_2=6.1$ Hz, 2H, H-9'), 5.69 (s, 1H, -OH), 5.94 (s, 2H, OCH₂O), 6.66 (dd, $J_1=1.6$ Hz, $J_2=7.8$ Hz, 1H, H-6'), 6.71 (d, $J=1.5$ Hz, 1H, H-2'), 6.75 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, H-5'), 6.91 (d, $J=8.4$ Hz, 1H, H-5), 7.11 (dd, $J_1=2.1$ Hz, $J_2=8.4$ Hz, 1H, H-6), 7.21 (d, $J=2.1$ Hz, 1H, H-2), 7.50 (d, $J=1.9$ Hz, 1H, H-7)

¹³C-NMR (CDCl₃) δ : 37.56 (C-7'), 40.11 (C-8'), 56.22 (-OMe), 69.60 (C-9'), 101.19 (OCH₂O), 108.66 (C-2'), 110.90 (C-5 + C-5'), 115.21 (C-2), 122.28 (C-6'), 124.09 (C-6 + C-1'), 131.83 (C-1), 137.46 (C-7), 146.09 (C-4), 146.70 (C-3), 148.13 (C-4'), 148.30 (C-3'), 172.83 (C-9)

Inyección de Bha7*5 (Guamarol) para su purificación
100 MicroL, Ac/Hex : 40/60

Fecha: 15/4/1999



Cromatograma 3. Purificación de guamarol por HPLC

Fracción V del percolado (extraída con acetato de etilo/n-hexano 50/50).

Columna Bhb

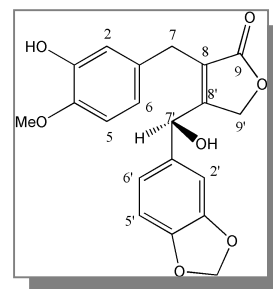
La fracción V de 6.75 g de peso, obtenida de la columna de percolado por el procedimiento descrito anteriormente, fue disuelta en metanol con la finalidad de preparar una cabeza cromatográfica con gel de 0.2-0.5 mm. Se montó una columna cromatográfica gravitatoria de gel de sílice de 0.063-0.2 mm que denominamos Bhb y que fue eluida con n-hexano y mezclas de acetato de etilo/n-hexano de polaridad creciente hasta acetato de etilo 100 %. Se obtuvieron de este modo 7 fracciones (Bhb1, Bhb2,Bhb7).

Columna Bhc

La fracción Bhb7 obtenida de la columna anterior y de 0.6 g de peso, fue cromatografiada en columna de gel de sílice a la que denominamos Bhc y que fue eluida con mezclas de acetato de etilo/n-hexano en proporciones desde el 30 al 50 %. Se obtuvieron así dos productos. En las fracciones 37-46 se aisló un producto con datos espectroscópicos idénticos a los del lignano conocido como **chasnarolido**.

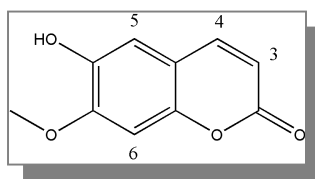
De las fracciones 48-70 cristalizó un producto con espectro de ¹H-NMR propio de una cumarina y que resultó finalmente ser la **isoescopoletina**.

Producto-6. Chasnarolido



- UV $\lambda_{\text{máx}}$ (EtOH) nm: 324, 286
- IR $\nu_{\text{máx}}$ (CHCl₃) cm⁻¹: 3540, 1743, 1667, 1608, 1595, 1443, 1271, 940, 926
- HR-MS: [M]⁺ a m/z 370.1012(C₂₀H₁₈O₇ requiere 370.1147)
- MS m/z (%): 370 [M]⁺ (4), 352(4), 247 (10), 219 (28), 151 (100), 137 (76), 123 (25), 121 (32)
- ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 3.71 (d, *J*=4.0 Hz, 2H, H-7a + H-7b), 3.89 (s, 3H, -OMe), 4.54 (s, 2H, H-9'), 5.66 (s, 1H, OH), 5.94 (m, 1H, H-7'), 5.94 (s, 2H, OCH₂O), 6.54 (d, *J*=8.3 Hz, 1H, H-2'), 6.55 (m, 1H, H-6'), 6.72 (d, *J*=8.3 Hz, 1H, H-5'), 6.84 (d, *J*=8.0 Hz, 1H, H-5), 6.96 (dd, *J*₁=2.1 Hz, *J*₂=8.0 Hz, 1H, H-6), 6.98 (d, *J*=2.1 Hz, 1H, H-2)
- ¹³C-NMR (CDCl₃) δ : 33.06 (C-7), 56.04 (-OMe), 68.71 (C-7'), 71.48 (C-9'), 101.17 (OCH₂O), 108.63 (C-5'), 109.01 (C-2'), 110.80 (C-5), 112.38 (C-2), 117.76 (C-6), 121.73 (C-6'), 127.96 (C-1), 129.30 (C-1'), 134.85 (C-8), 145.94 (C-3 + C-4), 146.93 (C-4'), 148.22 (C-3'), 160.26 (C-8'), 173.94 (C-9)

Producto-7. Isoescopoletina

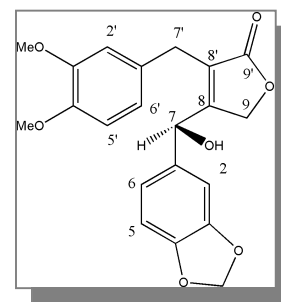


- UV $\lambda_{\text{máx}}$ (EtOH) nm: 227, 349
- ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 3.95 (s, 3H, -OCH₃), 4.30 (complejo, 1H, hidroxilo), 6.27 (d, 1H, *J*=10.0 Hz, H-3), 6.84 (s, 1H, H-8), 6.92 (s, 1H, H-5), 7.60 (d, 1H, *J*=10.0 Hz, H-4)

Columna HPLC-5

Parte de la fracción Bhb6 (25 mg) fue disuelta, filtrada e inyectada en el cromatógrafo de HPLC empleando acetato de etilo/n-hexano al 50% como mezcla eluyente. Se aisló de este modo un aceite cuyos datos espectroscópicos coinciden con los del lignano conocido como **metilchasnarolido** (Bhb6*3).

Producto-8. Metilchasnarolido



- UV $\lambda_{\text{máx}}$ (EtOH) nm: 324, 282
- IR $\nu_{\text{máx}}$ (CHCl₃) cm⁻¹: 3537, 1745, 1665, 1596, 1596, 1515, 1442, 1263, 1154, 940, 810
- HR-MS: [M]⁺ a m/z 384.1219 (C₂₁H₂₀O₇ requiere 384.1203)
- MS m/z (%): 384 [M]⁺ (67), 366 (42), 314 (20), 272 (19), 249 (14), 231 (48), 165 (100), 151 (95)
- ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 3.70 (d, *J*=3.7 Hz, 2H, H-7'), 3.87 (s, 6H, 2x-OMe), 4.56 (s, 2H, H-9), 5.71 (s, 1H, -OH), 5.93 (s, 2H, -OCH₂O-), 5.93 (m, 1H, H-7), 6.52 (d, *J*=1.9 Hz, 1H, H-2), 6.52 (dd, *J*₁=1.9 Hz, *J*₂=8.3 Hz, 1H, H-6), 6.76 (d, *J*=8.3 Hz, 1H, H-5), 6.83 (d, *J*=8.2 Hz, 1H, H-5'), 6.94 (dd, *J*₁=2.0 Hz, *J*₂=8.2 Hz, 1H, H-6'), 7.05 (d, *J*=2.0 Hz, 1H, H-2')
- ¹³C-NMR (CDCl₃) δ : 33.48 (C-7'), 69.25 (C-7), 56.36 (-OMe), 71.40 (C-9), 101.42 (OCH₂O), 108.88 (C-5), 109.29 (C-2), 110.43 (C-5'), 112.13 (C-2'), 118.66 (C-6'), 121.91 (C-6), 128.54 (C-1'), 129.61 (C-1), 134.00 (C-8'), 147.39 (C-4), 148.59 (C-3), 149.63 (C-4'), 150.01 (C-3'), 160.22 (C-8), 174.10 (C-9')

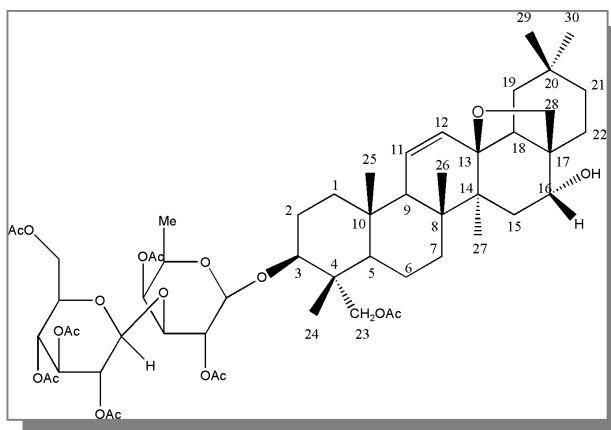
Fracción VI del percolado (extraída con acetato de etilo 100%)

La fracción VI del percolado de 3 g de peso fue disuelta en acetona, absorbida sobre gel de sílice de 0.2-0.5 mm y cromatografiada mediante una columna gravitatoria de gel de sílice de 0.2-0.063 mm a la que denominamos *Bhd*. Dicha columna, que fue eluida con n-hexano y mezclas de acetato de etilo/n-hexano de polaridad creciente hasta acetato de etilo 100%, rindió 84 fracciones que fueron recogidas con un colector. Tras comparar las cromatografías en capa fina (TLC), se hicieron las reuniones oportunas obteniéndose finalmente 4 fracciones (Bhd1, Bhd2, Bhd3 y Bhd4).

Columnas HPLC-6 y HPLC-7

Parte de las fracciones Bhd3 y Bhd4, de peso aproximado 600 mg y 400 mg respectivamente, fueron inyectadas en el cromatógrafo de HPLC (HPLC-6 y HPLC-7 respectivamente) obteniéndose un producto cuyos datos espectroscópicos coinciden con los de la **saikogenina F** que previamente había sido aislada de la parte aérea de la planta.

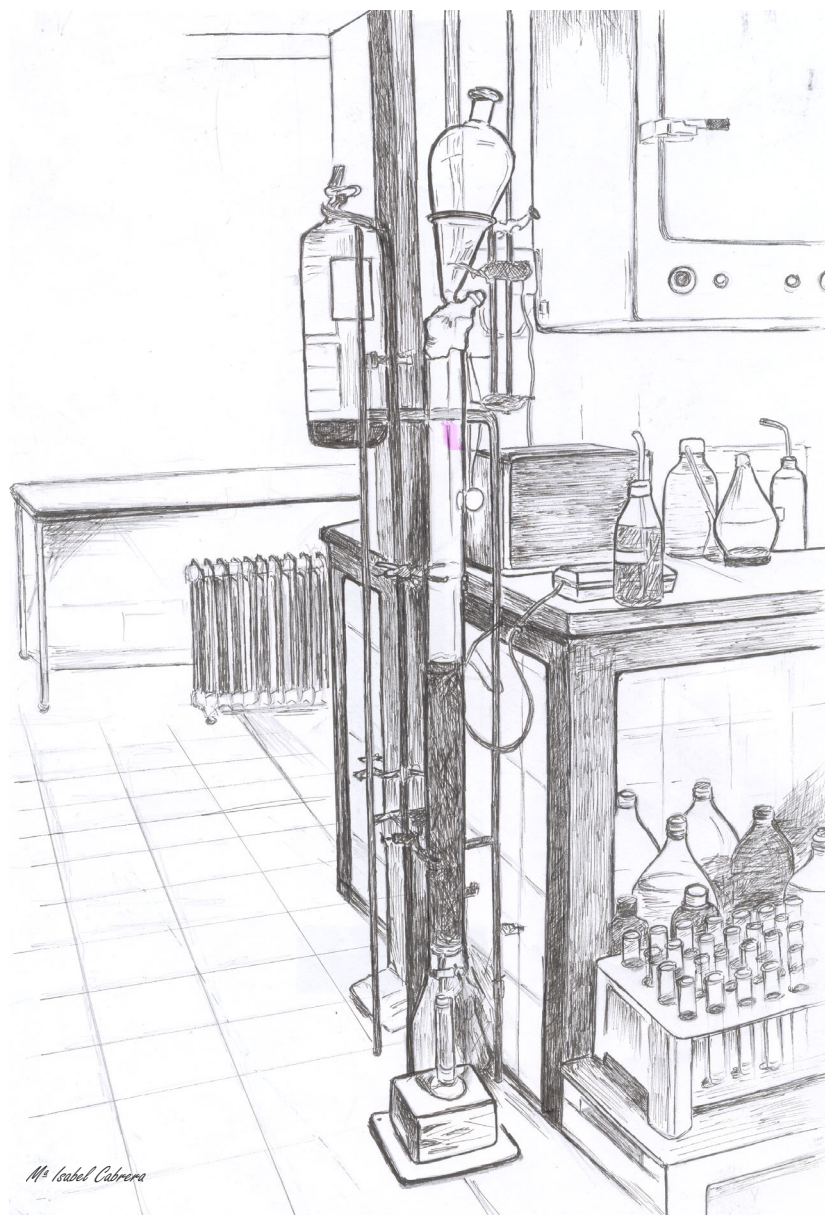
Producto-9. Saikogenina F



MS (FAB): 1074 [M]⁺

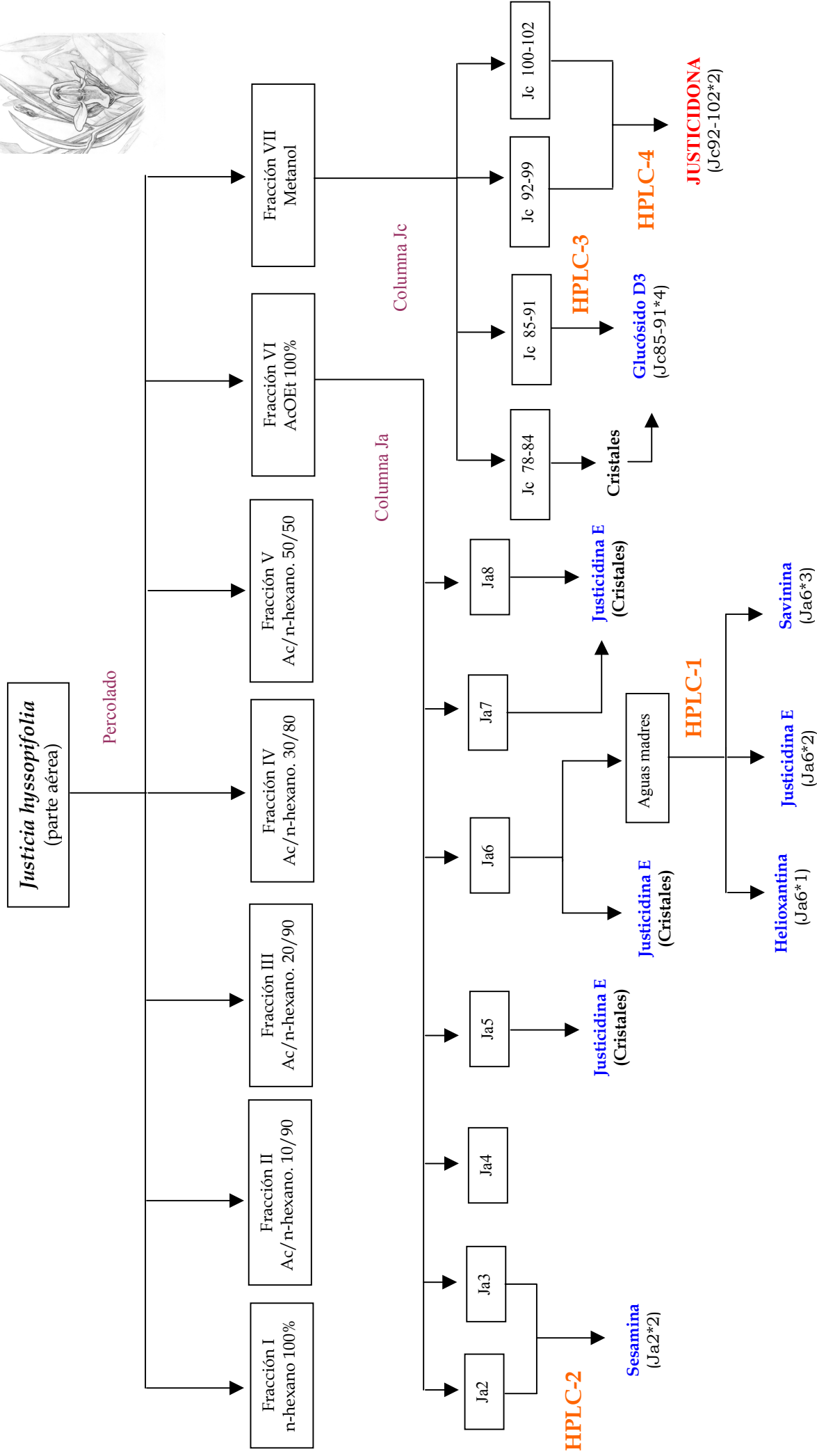
¹H-NMR (CDCl₃) δ: 3.17 (H-28), 3.45 (H-28), 3.40 (H-3), 3.87 (H-23), 3.98 (H-23), 4.01 (H-16), 5.42 (H-12), 5.87 (H-11), 4.59 (d, J=8 Hz, G-1), 4.88 (G-2), 5.12 (G-3), 5.12 (G-4), 3.66 (G-5), 4.125 (dd, J₁=3.2 Hz, J₂=7.2 Hz, G-6), 4.29 (d, J=8 Hz, F-1), 3.82 (F-2), 3.82 (F-3), 5.19 (F-4), 3.66 (F-5), 1.17 (d, J=3.0, CH₃-Fucosa)

¹³C-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ: 12.21 (C-24), 17.0 (C-6), 17.8 (C-27), 19.8 (C-25), 19.7 (C-26), 20.5 (2 x acetato), 24.15 (C-30), 25.0 (C-2), 29.15 (C-22), 30.35 (C-7), 31.1 (C-15), 31.6 (C-20), 33.4 (C-29), 36.6 (C-10), 35.7 (C-21), 38.0 (C-19, C-1), 41.6 (C-4), 41.7 (C-8), 42.6 (C-14), 44.8 (C-17), 47.6 (C-5), 50.3 (C-18), 52.5 (C-9), 65.5 (C-23), 77.1 (C-28), 78.04 (C-16), 82.74 (C-3), 84.5 (C-13), 130.7 (C-12), 132.0 (C-11)



Separación cromatográfica y datos espectroscópicos de los productos aislados del extracto etanólico de la parte aérea de *Justicia hyssopifolia* L.

Parte experimental



Aproximadamente 1500 g de hojas secas de *Justicia hyssopifolia*, recogidas en Punta Cangrejo (Adeje, Tenerife) en enero de 1999, se extrajeron de un modo exhaustivo con etanol a reflujo, obteniéndose un extracto que una vez seco pesó unos 200 g.

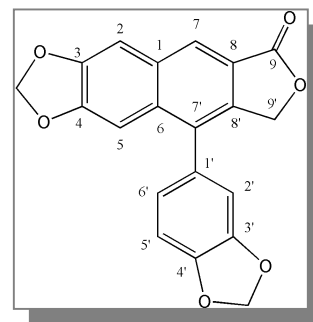
Columna de percolado

El extracto obtenido de la manera descrita se disolvió en la cantidad mínima necesaria de metanol, se absorbió sobre gel de sílice de 0.2-0.5 mm y fue cromatografiado mediante una columna de percolado a vacío. La elución se empezó con n-hexano 100% para eliminar las ceras y se elevó la polaridad de forma progresiva hasta 100% de metanol. Fueron obtenidas de este modo 7 fracciones (I, II, III, IV, V, VI y VII) de las cuales sólo fueron estudiadas las dos últimas (fracción VI, 100% AcOEt y fracción VII, 100% metanol), ya que nuestro interés se centraba principalmente en los productos más polares.

Fracción VI (100 % acetato de etilo)

Columnas Ja y HPLC-1

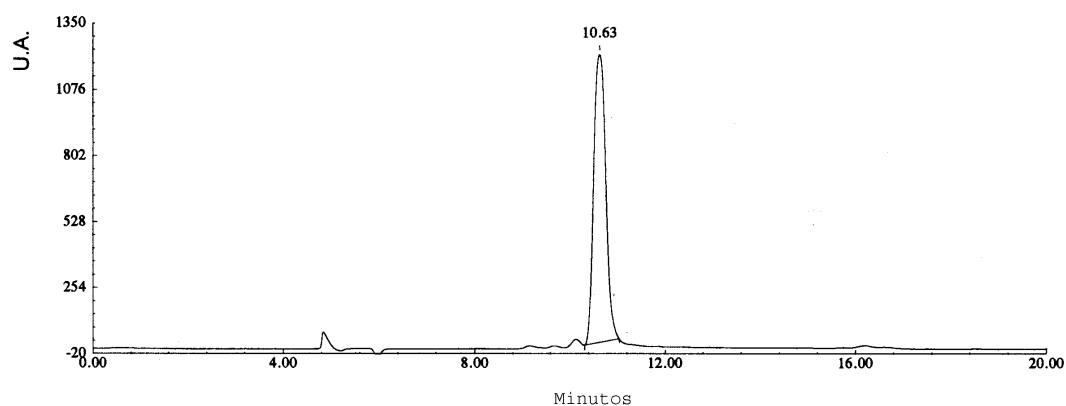
La fracción VI de la columna de percolado, de aproximadamente 20 g de peso seco, fue disuelta en metanol y absorbida sobre gel de sílice (0.2-0.5 mm). La cabeza resultante fue cromatografiada mediante una columna gravitatoria de gel de sílice de 0.063-0.2 mm a la que dimos el nombre de *Ja*. Dicha columna rindió 15 fracciones que fueron denominadas Ja1 hasta Ja15. En las fracciones Ja5, Ja6, Ja7 y Ja8 se formaron unos cristales pequeños de color blanquecino, difíciles de disolver y que una vez lavados con n-hexano y secados fueron sometidos a estudio espectroscópico, resultando ser un lignano abundante en la planta que posee una notable fluorescencia azul en disolución y que es conocido en la bibliografía como **justicidina E**.

Producto-10. **Justicidina E**

Punto de fusión:	263-266 °C
UV $\lambda_{\text{máx}}$ (EtOH) nm:	300 (3.97), 244 (4.53)
IR $\nu_{\text{máx}}$ (CHCl ₃) cm ⁻¹ :	2890, 1750, 1625, 1495, 1485, 1455, 1360, 1340, 1140, 1100
HR-MS:	[M] ⁺ a m/z 348.0631 (C ₂₀ H ₁₂ O ₆ requiere 348.0625)
MS m/z (%):	348 [M] ⁺ (100), 319 (73), 291 (5), 261 (9), 233 (17), 205 (3), 167 (7), 116 (6), 88 (9), 29 (11)
¹ H-NMR (CDCl ₃) δ :	5.20 (s, 2H, H-9'), 6.08 (s, 2H, -OCH ₂ O-), 6.09 (s, 2H, -OCH ₂ O-), 6.77-6.99 (m, 3H, H-2', H-5', H-6'), 7.10 (s, 1H, H-5), 7.31 (s, 1H, H-2), 8.26 (s, 1H, H-7)
¹³ C-NMR (75 MHz, CDCl ₃) δ :	69.3 (t), 100.9 (d), 101.4 (t), 102.3 (t), 105.2 (d), 108.9 (d), 109.7 (d), 121.2 (s), 123.0 (d), 124.1 (d), 129.1 (s), 131.0 (s), 132.1 (s), 132.6 (s), 138.7 (s), 147.3 (s), 147.9 (s), 148.0 (s), 150.4 (s), 170.8 (s)

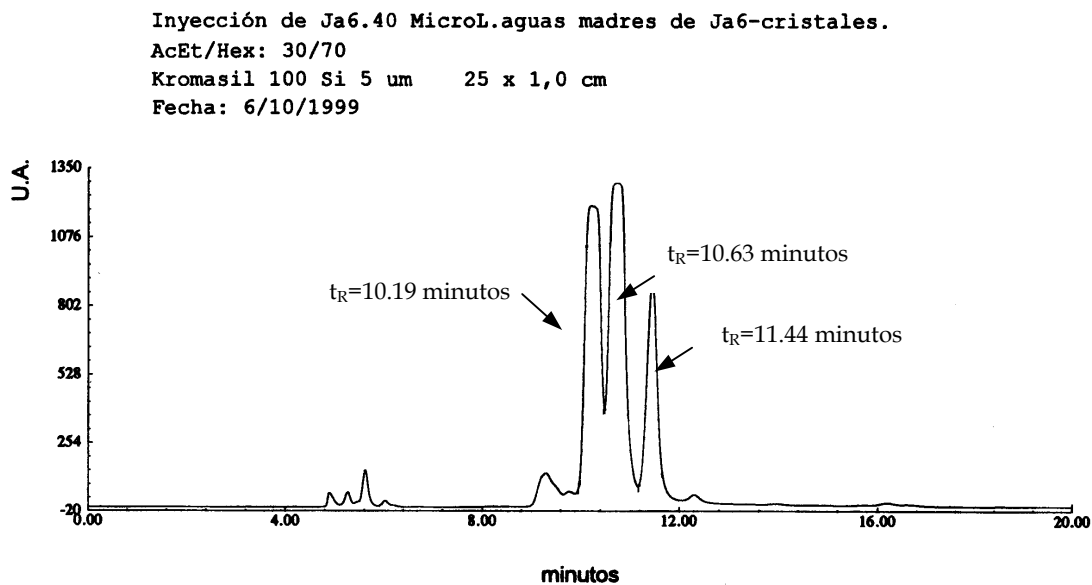
El Cromatograma 4 muestra la pureza de los cristales (justicidina E) de la fracción Ja6.

Inyección de Ja6c(CRISTALES) .40 MicroL.
 AcEt/Hex: 30/70
 Kromasil 100 Si 5 um 25 x 1,0 cm
 Fecha: 6/10/1999



Cromatograma 4. Inyección en el cromatógrafo de HPLC de los cristales (justicidina E) de la fracción Ja6.

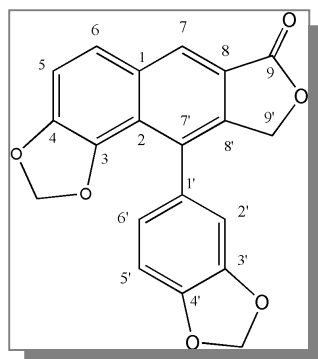
Las aguas madres de la fracción Ja6 fueron llevadas a sequedad, disueltas en AcOEt/n-hexano 30/70 y una vez filtradas, inyectadas en el cromatógrafo de HPLC (HPLC-1), lo que dio lugar al Cromatograma 5.



Cromatograma 5. Inyección en el cromatógrafo de HPLC de las aguas madres de la fracción Ja6.

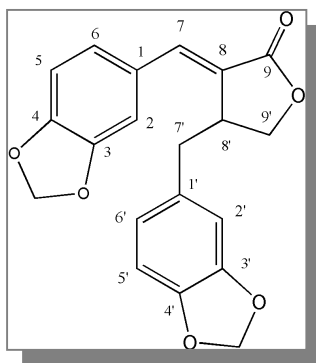
De este modo se obtuvieron 3 productos que denominamos Ja6*1, Ja6*2 y Ja6*3. El primero de ellos, con $t_R=10.19$ minutos (Ja6*1), mostró una intensa fluorescencia azul al ser irradiado con luz ultravioleta y su análisis espectroscópico confirmó que se trataba del lignano conocido con el nombre de **helioxantina**. Con $t_R=10.63$ minutos se obtuvo la justicidina E, mientras que el tercer producto (Ja6*3), con $t_R=11.44$ minutos, resultó ser otro lignano, conocido como **savinina**. Todos estos productos habían sido aislados en estudios anteriores de esta planta.

Producto-11. Helioxantina



- Punto de fusión: 235-236°C
- UV $\lambda_{\text{máx}}$ (EtOH) nm: 218, 265, 286, 356
- IR $\nu_{\text{máx}}$ (CHCl₃) cm⁻¹: 2880, 1750, 1625, 1500, 1490, 1460, 1440, 1370, 1340, 1320, 1295, 1270, 1150, 1070, 1040, 1020, 920
- HR-MS: [M]⁺ a m/z 348.0635 (C₂₀H₁₂O₆ requiere 348.0625)
- MS m/z (%): 348[M]⁺ (100), 319 (28), 291 (9), 261 (7), 233 (12), 205 (8), 176 (14), 116 (10), 88 (21)
- ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 5.18 (d, 1H, *J*=15.3 Hz, H-9'), 5.25 (d, 1H, *J*=5.3 Hz, H-9'), 5.96 (dd, 2H, *J*₁=1.4 Hz, *J*₂ = 4.83 Hz, -OCH₂O- anillo C), 6.06 (dd, 2H, *J*₁=1.4 Hz, *J*₂=5.87 Hz, -OCH₂O-, anillo A), 6.77-6.91 (m, 3H, H-2', H-5', H-6'), 7.31 (d, 1H, *J*=8.6 Hz, H-5), 7.70 (d, 1H, *J*=8.6 Hz, H-6), 8.42 (s, 1H, H-7)
- ¹³C-NMR (CDCl₃) δ : 69.51 (t, C-9'), 101.26 (t, -OCH₂O-(C-3', C-4')), 101.60 (t, -OCH₂O-(C-3, C-4)), 107.99 (d, C-5'), 109.67 (d, C-2'), 111.81 (d, C-5), 121.12 (s), 121.24 (s), 122.35 (d, C-6'), 125.46 (d, C-6), 127.43 (d, C-7), 128.69 (s), 130.44 (s), 130.76 (s), 139.78 (s), 141.48 (s), 146.92 (s), 147.38 (s), 148.28 (s), 170.71 (C-9)

Producto-12. Savinina

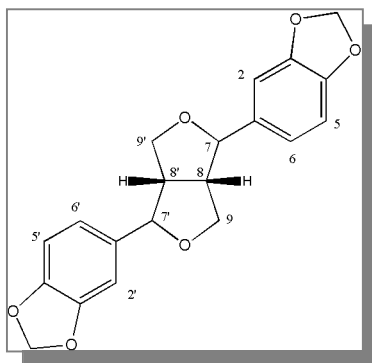


Punto de fusión:	145 °C (lit 146-148°C)
$[\alpha]_D^{25}$	-83.3 (CHCl ₃)
IR $\nu_{\text{máx}}$ (CHCl ₃) cm ⁻¹ :	3000, 2890, 1740, 1640, 1610, 1600, 1500, 1485, 1445, 1360, 1255, 1250, 1180, 1090, 1035, 925, 855, 805
MS m/z (%):	352 [M] ⁺ (30), 217 (58), 159 (44), 135 (100), 131 (60), 103 (61), 77 (100), 51 (95)
¹ H-NMR (CDCl ₃) δ :	2.58 (dd, 1H, $J_1=10.0$ Hz, $J_2=14.2$ Hz, H-7' axial), 2.99 (dd, 1H, $J_1=4.5$ Hz, $J_2=14.2$ Hz, H-7' ecuatorial), 3.73 (m, 1H, H-8'), 4.25 (s ancho, 2H, H-9), 5.93 (s, 2H, -OCH ₂ O-), 6.04 (s, 2H, -OCH ₂ O-), 6.63 (dd, 1H, $J_1=1.7$ Hz, $J_2=7.8$ Hz, H-6'), 6.64 (d, 1H, $J=1.7$ Hz, H-2'), 6.73 (d, 1H, $J=7.8$ Hz, H-5'), 6.87 (d, 1H, $J=8.0$ Hz, H-5), 7.04 (d, 1H, $J=1.7$ Hz, H-2), 7.08 (dd, 1H, $J_1=1.7$ Hz, $J_2=7.8$ Hz, H-6), 7.49 (d, $J=1.9$ Hz, H-7)

Columna HPLC-2

La cromatografía en capa fina de las fracciones Ja2 y Ja3 mostraron ser iguales, por lo que fueron reunidas y llevadas a sequedad, pesando 570 mg de los cuales 50 fueron disueltos en la mezcla acetato de etilo/n-hexano 25/75 e inyectados en el cromatógrafo de HPLC. Se obtuvo un producto (Ja2*2) con $t_R=11.06$ minutos en esta mezcla eluyente y cuyo análisis espectroscópico demostró que se trataba del lignano **sesamina** que también había sido aislado de la planta en estudios anteriores.

Producto-13. Sesamina



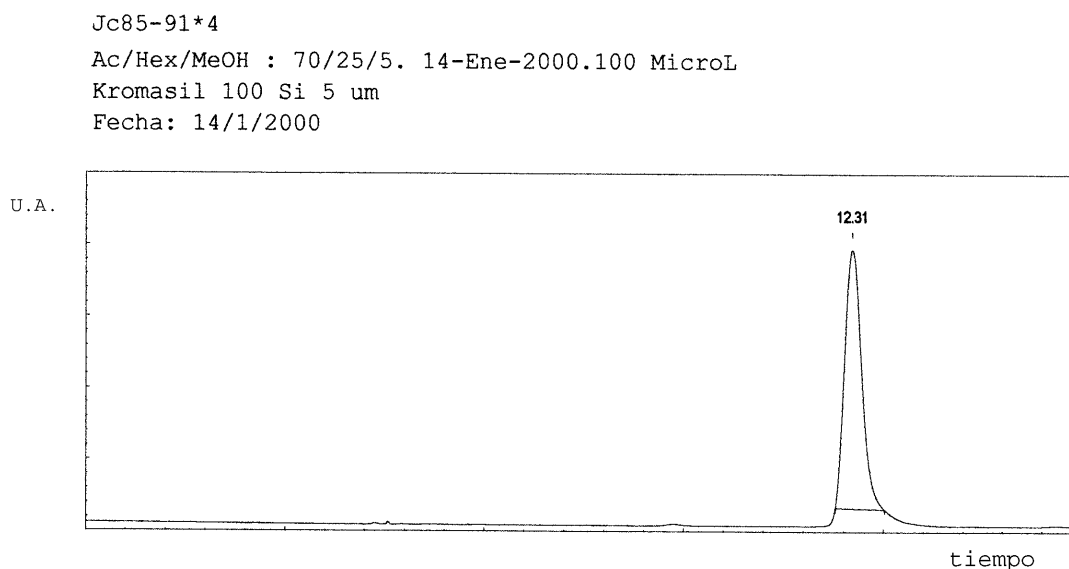
- $[\alpha]_D^{25}$ + 67.9 (CHCl₃)
- Punto de fusión: 123°C
- MS m/z (%): 354 [M]⁺ (28), 203 (19), 178 (13), 162 (10), 161 (47), 160 (9), 151 (10), 150 (56), 149 (100), 148 (36), 136 (11), 135 (69), 133 (10), 131 (49), 121 (39), 103 (25), 77 (34), 65 (35)
- ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 3.05 (m, 2H, H-8 y H-8'), 3.86 (dd, 2H, $J_1=6.9$ Hz, $J_2=9.2$ Hz, H-9a, H-9'a), 4.23 (dd, 2H, $J_1=6.9$ Hz, $J_2=9.1$ Hz, H-9e, H-9'e), 4.71 (d, 2H, $J=4.4$ Hz, H-7 y H-7'), 5.96 (s, 4H, 2x-OCH₂O-), 6.78-6.84 (m, 6H, aromáticos)
- ¹³C-NMR (CDCl₃) δ: 54.40 (d, C-8 y C-8'), 71.74 (t, C-9 y C-9'), 85.81 (d, C-7, C-7'), 101.02 (t, -OCH₂O-), 106.48 (d, C-2 y C-2'), 108.08 (d, C-5 y C-5'), 119.29 (d, C-6 y C-6'), 135.24 (s, C-1 y C-1'), 147.14 (s, C-3 y C-3'), 148.00 (s, C-4 y C-4')

Fracción VII (100 % metanol)

Columna Jc

La fracción VII, obtenida a partir de la columna de percolado con metanol 100%, pesó 15 g una vez se llevó a sequedad. Fue disuelta en metanol, absorbida sobre gel de sílice de 0.2-0.5 mm y cromatografiada en columna de gel de sílice de 0.2-0.063 mm a la que denominamos Jc. Se obtuvieron de esta manera 102 fracciones que fueron reunidas de la forma más conveniente tras compararlas por cromatografía en capa fina.

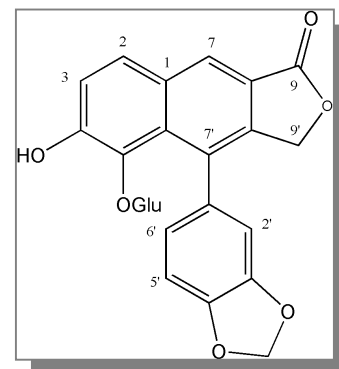
La fracción Jc 85-91 fue, una vez filtrada, disuelta en la mezcla AcOEt/n-hexano/MeOH: 70/25/5 e inyectada en el cromatógrafo de HPLC con idéntica mezcla eluyente. Se obtuvo un compuesto de aspecto siruposo y de intensa fluorescencia azulada con $t_R=12.31$ minutos. El análisis espectroscópico de este producto reveló que se trataba de un glucósido previamente aislado y muy abundante en la planta cuyo nombre sistemático es **3-hidroxi-metil-5- β -D-glucósido-6-hidroxi-4(3,4-metilendioxi-fenil)-2-lactona del ácido naftoico**.



Cromatograma 6. Inyección en el cromatógrafo de HPLC de Jc85-91*4 (glucósido D3) para ver su grado de pureza.

Producto-14. **Glucósido D3**

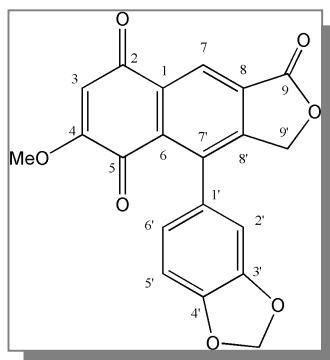
(Jc85-91*4)



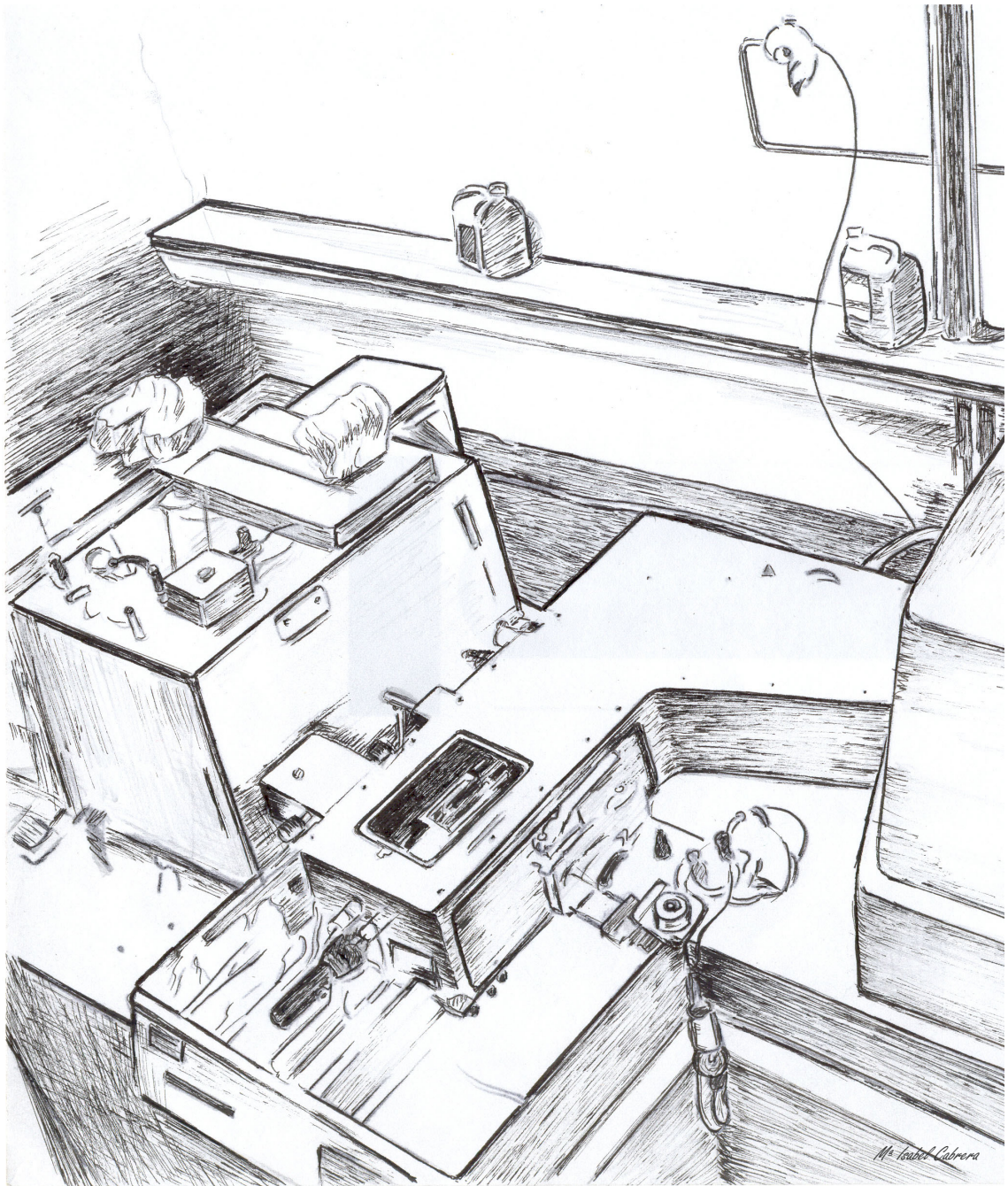
$[\alpha]_{D^{25}}$	+ 91.5 (MeOH)
Punto de fusión:	232-236 °C
UV $\lambda_{\text{máx}}$ (EtOH) nm:	220 sh, 234 sh, 262, 285 sh, 346
IR $\nu_{\text{máx}}$ (CHCl ₃) cm ⁻¹ :	3370, 2930, 2880, 1738, 1615, 1500, 1436, 1156, 1042, 927, 810
MS (FAB) : m/z	521 [M+Na] ⁺ , 499 [M+H] ⁺
MS m/z (%):	336 (100), 307 (20), 278 (14), 229 (27), 165 (26), 163 (20)
¹ H-NMR (CD ₃) ₂ CO δ :	2.86-3.76 (m, 6H, azúcar), 4.56 y 4.61 (2xd, 1H, J=8.0 Hz, anomérico), 4.90, 4.92, 5.42 y 5.49 (4xd, 1H, J=16.0 Hz, lactona), 5.99 (s, 2H, -OCH ₂ O-), 6.03 (dd, 2H, J ₁ =0.7 Hz, J ₂ =14.0 Hz, -OCH ₂ O-), 6.57-7.17 (m, 3H, H-2', H-5', H-6'), 7.32 y 7.33 (2xd, 1H, J=8.0 Hz, H-3), 7.93 y 7.94 (2xd, 1H, J=8.0 Hz, H-2), 8.33 (s, 1H, H-7)
¹³ C-NMR(CD ₃) ₂ CO δ :	62.75/62.63 (2xt, C-6''), 71.39 (t, metileno lactónico), 71.62/71.47 (2xd, C-4''), 75.18/74.98 (2xd, C-2''), 77.79 (d, C-3''), 78.06/77.83 (2xd, C-5''), 102.23 (t, -OCH ₂ O-), 104.12/103.68 (2xd, anomérico), 108.52/108.13 (2xd, C-5'), 112.45/111.55 (2xd, C-2'), 121.24/121.10 (2xd, C-3), 124.22/123.91 (2xd, C-6'), 127.21 (d, C-2), 129.17/129.01 (2xd, C-7), 173.8 (C-9)

El análisis por capa fina de las fracciones Jc 92-99 y Jc 100-102 mostró que ambas fracciones eran iguales y por tanto fueron reunidas, llevadas a sequedad y disueltas en la mezcla AcOEt/n-hexano/MeOH: 70/25/5 para ser inyectadas en el cromatógrafo de HPLC. Se obtuvieron unos pocos miligramos de un producto coloreado (Jc92-102*2) con $t_R=5.78$ minutos.

Producto-15. **Justicidona**



Punto de fusión:	114-115°C
(EtOH) UV $\lambda_{\text{máx}}$ nm (Log ϵ):	252 (4.92), 276 (4.69), 322 (4.29)
IR $\nu_{\text{máx}}$ (CHCl ₃) cm ⁻¹ :	2924, 2852, 1772, 1688, 1651, 1619, 1504, 1455, 1223, 1064, 1012
HR-MS:	[M] ⁺ a m/z 364.0557 (C ₂₀ H ₁₂ O ₇ requiere 364.0583)
MS m/z (%):	364 [M] ⁺ (100), 334 (41), 306 (31), 278 (12), 250 (12), 207 (8), 163 (10), 91 (21), 69 (26), 57 (55)
¹ H-NMR (CDCl ₃) δ :	3.86 (s, 3H, -OCH ₃), 5.06 (d, 1H, <i>J</i> =16.4 Hz, H-9 β), 5.17 (d, 1H, <i>J</i> =16.4 Hz, H-9 α), 6.05 (d, 2H, <i>J</i> =10.8 Hz, -OCH ₂ O-), 6.26 (s, 1H, H-3), 6.62 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ =1.6 Hz, <i>J</i> ₂ =8.4 Hz, H-6'), 6.63 (s, 1H, H-2'), 6.90 (d, 1H, <i>J</i> =8.4 Hz, H-5'), 8.72 (s, 1H, H-7)
¹³ C-NMR (CDCl ₃) δ :	56.7 (q, -OCH ₃), 69.7 (t, C-9'), 101.4 (t, -OCH ₂ O-), 107.9 (d, C-6'), 109.0 (d, C-5'), 109.2 (d, C-3), 120.3 (d, C-2'), 123.9 (d, C-7), 129.1 (s, C-6), 129.7 (s, C-1'), 131.7 (s, C-8), 135.0 (s, C-1), 138.6 (s, C-7'), 147.9 (s, C-3'), 148.3 (s, C-4'), 151.4 (s, C-8'), 161.0 (s, C-4), 169.1 (s, C-9), 179.3 (s, C-5), 182.9 (s, C-2)

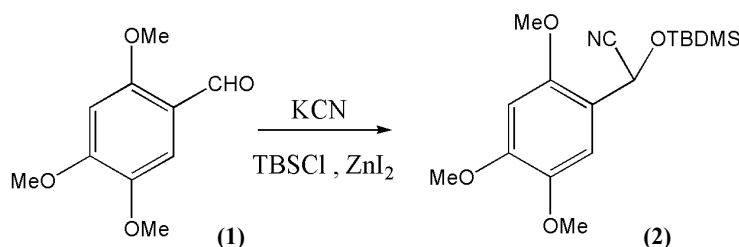


Aproximaciones y síntesis total de la justicidona

Parte experimental

➤ Obtención de 2

(t-Butil-dimetilsilaniloxi)-(2,4,5-trimetoxi-fenil)-acetonitrilo

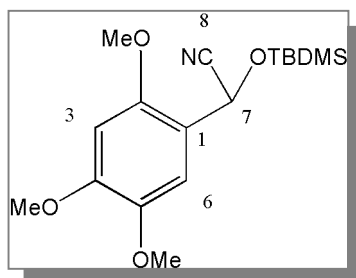


En un balón previamente secado en la estufa a 100°C y bajo presión positiva de nitrógeno seco, se disolvieron 3 g (15.3 mmoles) de 2,4,5-trimetoxibenzaldehído, en 88 ml de acetonitrilo secado sobre tamiz molecular. A continuación se añadieron sucesivamente KCN (5 g, 77 mmoles), ZnI₂* (76.5 mg, 0.24 mmoles) y TBSCl (3g). La mezcla de reacción se mantuvo con agitación entre 60 y 70°C, siguiéndose la desaparición del aldehído aromático mediante TLC, empleando como revelador una disolución de 2,4-dinitrofenilhidracina al 0.4% en HCl 2N. Tras 44 h de reacción el material de partida había desaparecido y sólo se observaba en TLC (elución con AcOEt/n-hex 40:60) la cianhidrina que se revela de color marrón.

Tras eliminar el disolvente a vacío, el residuo fue resuspendido en éter dietílico, filtrado para eliminar las sales y lavado varias veces con agua destilada para ser finalmente secado sobre sulfato sódico anhidro. El crudo fue cromatografiado en columna gravitatoria de gel de sílice, mediante el empleo de la mezcla eluyente AcOEt/n-hexano al 20%, obteniéndose de este modo 4.96 g de un producto aceitoso cuyos datos espectroscópicos confirmaron que se trataba de la cianhidrina 2. Rendimiento = 96%.

* Recién activado, para lo cual es necesario calentarlo a 300°C con vacío de 2x10⁻² mm Hg. Si no se activa, la reacción transcurre muy lentamente y el rendimiento disminuye considerablemente.

Compuesto 2



UV (EtOH) $\lambda_{\text{máx}}$ nm (log ϵ): 292 (3.81), 243 (3.97), 235 (3.97)

IR $\nu_{\text{máx}}$ (CHCl₃) cm⁻¹: 406, 456, 840, 1034, 1127, 1209, 1258, 1402, 1512, 1622, 2858, 2933, 2955

HR-MS: 337.169706 (C₁₇H₂₇NO₄Si requiere 337.170937)

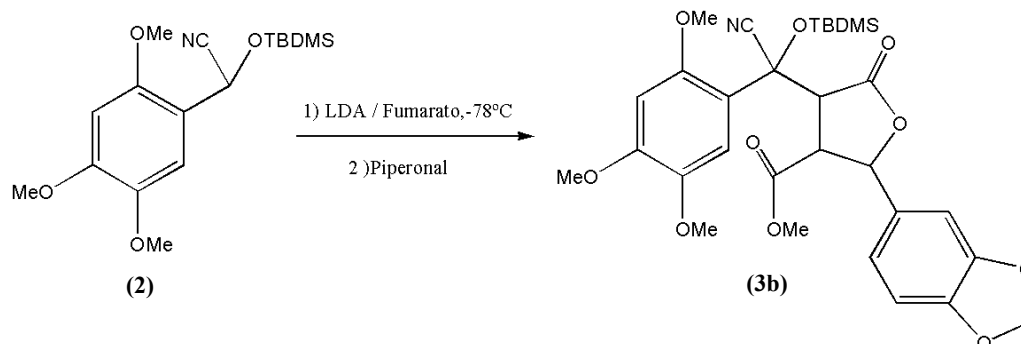
MS m/z (%): 337 [M]⁺ (70), 311 (89), 280 (94), 206 (100), 154 (16), 136 (14), 73 (41)

¹H-NMR (CDCl₃) δ : 0.10 (s, 3H, -OSi(Me)₂C(Me)₃), 0.21 (s, 3H, -OSi(Me)₂C(Me)₃), 0.92 (s, 9H, -OSi(Me)₂C(Me)₃), 3.85 (s, 3H, OMe), 3.86 (s, 3H, OMe), 3.90 (s, 3H, OMe), 5.76 (s, 1H, H-7), 7.12 (s, 1H, H-6), 6.50 (s, 1H, H-3)

¹³C-NMR (CDCl₃) δ : -5.3 (q, -OSi(Me)₂C(Me)₃), 18.1 (s, OSi(Me)₂C(Me)₃), 25.5 (q, OSi(Me)₂C(Me)₃), 56.2 (q, OMe), 56.5 (q, OMe), 58.2 (d, C-7), 96.8 (d), 110.6 (d), 116.1 (s), 117.4 (s), 119.5 (s), 143.3 (s), 150.1 (s), 150.4 (s)

➤ Obtención de **3b**

2-Benzo[1,3]dioxol-5-il-4-[(*tert*-butil-dimetil-silaniloxi)-ciano-(2,4,5-trimetoxi-fenil)-metil]-5-oxo-tetrahidro-furan-3-ácido carboxílico metil éster



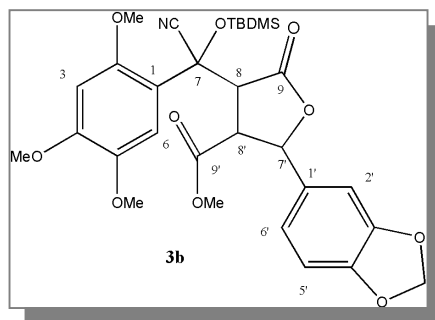
En un balón de 3 bocas con 8 ml de THF seco, se inyectó 1.2 ml (8.54 mmoles) de diisopropilamina recién destilada y almacenada sobre tamiz molecular.

Una vez enfriada la mezcla a -6°C , se añadieron 6 ml de una disolución de *n*-BuLi 1.3M (7.8 mmoles) empleando un embudo de presión compensada. A continuación se añadió 1.78 ml de HMPA (1.3 eq).

La mezcla fue enfriada hasta -78°C y tras 20 minutos se añadió gota a gota la cianhidrina (2.58 g, 7.64 mmoles) disuelta en 7 ml de THF seco tras lo cual la mezcla adquirió rápidamente un color oscuro. Pasados 5 minutos se añadió gota a gota 1.2 g (8 mmoles) de fumarato de dimetilo (144.13 g/mol, 97% de pureza) disuelto en 15 ml de THF. Inmediatamente y a la misma temperatura se añadió 1.2 g de piperonal disueltos en 10 ml de THF, tras lo cual la mezcla de reacción adquirió un tono más claro. La reacción, que fue seguida por TLC, fue detenida tras 10 minutos mediante la adición de 5 ml de ácido acético glacial.

La mezcla fue extraída con acetato de etilo y la fase orgánica fue secada sobre sulfato sódico anhidro. El crudo, que fue cromatografiado en una columna gravitatoria de gel de sílice y empleando como mezcla eluyente AcOEt/*n*-hexano entre el 20 y 30%, dio lugar a varias fracciones: R41-49, R50-59, R60-64 y R65-76. De la fracción 50-59 se obtuvieron 800 mg del compuesto **3b**. Rendimiento = 17.48%.

Compuesto 3b



UV $\lambda_{\text{máx}}$ (EtOH) nm: 290 (3.74), 238 (3.86)

IR $\nu_{\text{máx}}$ (CHCl₃) cm⁻¹: 756, 841, 932, 1036, 1140, 1256, 1440, 1509, 1712, 1791, 2858, 2935, 2955

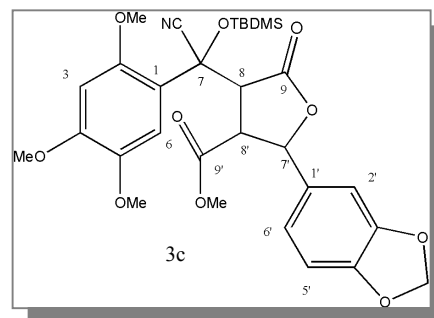
HR-MS: 599.217941 (C₃₀H₃₇NO₁₀Si requiere 599.218675)

MS m/z (%): 599 [M]⁺(10), 542 (13), 498 (7), 390 (14), 336 (53), 298 (22), 261 (11), 195 (100), 73 (19)

¹H-NMR (CDCl₃) δ : 0.16 (s, 3H, -OSi(Me)₂C(Me)₃), 0.36 (s, 3H, -OSi(Me)₂C(Me)₃), 1.04 (s, 9H, -OSi(Me)₂C(Me)₃), 3.52 (dd, 1H, $J_1=1.6$ Hz, $J_2=9.8$ Hz, H-8'), 3.75 (s, 3H, -OMe), 3.85 (s, 3H, -OMe), 3.90 (s, 3H, -OMe), 3.92 (s, 3H, -OMe), 4.38 (d, 1H, $J=11.2$ Hz, H-8), 5.16 (d, 1H, $J=9.5$ Hz, H-7'), 5.99 (s, 2H, -OCH₂O-), 6.54 (s, 1H, H-3), 6.78-6.82 (m, 3H, H-2', H-5', H-6'), 7.16 (s, 1H, H-6)

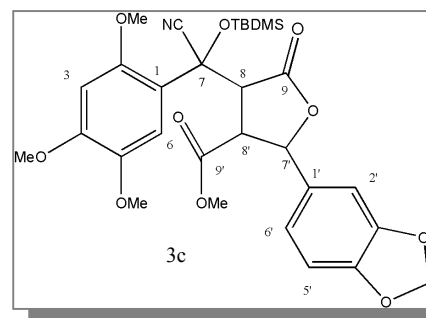
¹³C-NMR (CDCl₃) δ : 18.7 (s, -OSi(Me)₂C(Me)₃), 25.8 (q, -OSi(Me)₂C(Me)₃), 52.8 (d, C-8'), 53.2 (d, C-8), 56.1 (q, 2x -OMe), 56.8 (q, -OMe), 57.7 (q, -OMe), 70.4 (s, C-7), 79.9 (d, C-7'), 97.3 (d, C-3), 101.4 (t, -OCH₂O-), 106.0 (d, anillo C), 108.3 (d, anillo C), 111.8 (d, C-6), 116.2 (s, -CN), 118.3 (s, C-1), 119.8 (d, anillo C), 130.4 (s, C-1'), 142.7 (s, anillo A), 148.3 (s, anillo C), 148.4 (s, anillo C), 149.5 (s, anillo A), 150.6 (s, anillo A), 169.2 (s, C-9), 170.8 (s, C-9')

Compuesto 3c



- UV (EtOH) $\lambda_{\text{m\acute{a}x}}$ nm (log ϵ): 289 (3.42), 237 (3.60)
- IR $\nu_{\text{m\acute{a}x}}$ (CHCl₃) cm⁻¹: 756, 843, 1031, 1139, 1208, 1508, 1739, 1786, 2853, 2925
- HR-MS: 599.219995 (C₃₀H₃₇NO₁₀Si requiere 599.218675)
- MS m/z (%): 599 [M]⁺ (11), 542 (6), 498 (12), 390 (9), 336 (40), 298 (13), 195 (100), 149 (11), 75 (22)
- ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 0.20 (s, 3H, -OSi(Me)₂C(Me)₃), 0.45 (s, 3H, -OSi(Me)₂C(Me)₃), 1.05 (s, 9H, -OSi(Me)₂C(Me)₃), 3.63 (t, 1H, $J_1=9.34$, $J_2=9.1$ Hz) 3.04 (s, 3H, -OMe), 3.80 (s, 3H, -OMe), 3.83 (s, 3H, -OMe), 3.88 (s, 3H, -OMe), 4.40 (d, 1H, $J=8.9$ Hz), 5.57 (d, 1H, $J=9.5$ Hz), 5.93 (s, 2H, -OCH₂O-), 6.47(s, 1H), 6.54-6.73 (m, 3H), 7.02 (s, 1H)

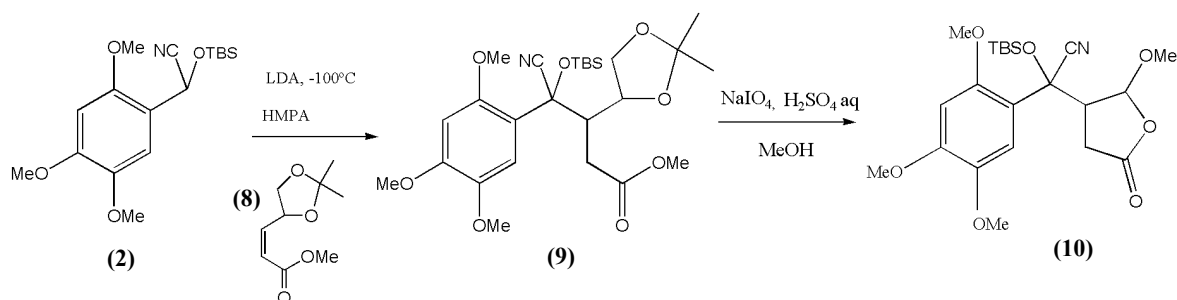
Compuesto 3d



- UV (EtOH) $\lambda_{\text{m\acute{a}x}}$ nm (log ϵ): 290 (3.77), 239 (3.89)
- IR $\nu_{\text{m\acute{a}x}}$ (CHCl₃) cm⁻¹: 786, 865, 1035, 1141, 1167, 1256, 1507, 1738, 1790, 2933, 2954
- HR-MS: 599.224197 (C₃₀H₃₇NO₁₀Si requiere 599.218675)
- MS m/z (%): 599 [M]⁺(7), 542 (5), 498 (9), 390 (8), 336 (39), 298 (19), 261 (9), 239 (90), 195 (100), 149 (99), 75 (10)
- ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 0.21 (s, 3H, -OSi(Me)₂C(Me)₃), 0.49 (s, 3H, -OSi(Me)₂C(Me)₃), 1.04 (s, 9H, -OSi(Me)₂C(Me)₃), 3.15 (s, 3H, -OMe), 3.20 (complejo, 1H), 3.80 (s, 3H, -OMe), 3.89 (s, 3H, -OMe), 3.94 (s, 3H, -OMe), 4.48 (d, 1H, $J=11.3$ Hz), 5.09 (d, 1H, $J=9.8$ Hz), 5.98 (s, 2H, -OCH₂O-), 6.51 (s, 1H), 6.66-6.76 (m, 3H), 7.01 (s, 1H)

➤ Obtención del compuesto **10**

(*tert*-Butil-dimetil-silaniloxi)-(2-metoxi-5-oxo-tetrahidrofuran-3-il)-
(2',4',5'-trimetoxi-fenil)-acetonitrilo



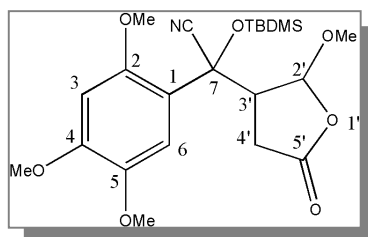
A una disolución de 5.5 ml de LDA 1.34 M (7.4 mmoles) en 40 ml de THF seco se añadió gota a gota, a -78°C y bajo atmósfera inerte de nitrógeno seco, 2.3 g (6,8 mmoles) de la cianhidrina **2** disuelta en 4 ml de THF. Tras 10 minutos de agitación se bajó la temperatura hasta -100°C y secuencialmente se añadió 2.4 ml de HMPA (13.6 mmoles) recién destilada en 4 ml de THF y 1.28 g (6.9 mmoles) de la mezcla isomérica del éster **8** en 4 ml de THF.

Tras 30 minutos, la reacción fue detenida mediante la adición de 20 ml de una disolución saturada de NH₄Cl, siendo la mezcla llevada lentamente a temperatura ambiente. La extracción se llevó a cabo con acetato de etilo y la fase orgánica se lavó con salmuera y se secó sobre Na₂SO₄. Una vez eliminado el disolvente a vacío, el crudo fue cromatografiado en una columna de gel de sílice, empleando como mezcla eluyente acetato de etilo/n-hexano (20:80). Se obtuvo de este modo 2.9 g (rendimiento = 81.6%) de un producto aceitoso que en TLC se revela de intenso color verde con vainillina sulfúrica y que resultó ser una mezcla inseparable de isómeros del compuesto **9**. La espectrometría de masas de alta resolución de la mezcla isomérica dio el valor de 523.259048 (C₂₆H₄₁NO₈Si requiere 523.260146).

Una disolución que contenía 2.88 g (14.2 mmoles) de NaIO₄ en 62 ml de ácido sulfúrico 1N, se añadió a otra que contenía 1.9 g (3.63 mmoles) de la mezcla de diasterómeros de **9** en 82 ml de metanol a 40°C. La mezcla resultante fue agitada a esta temperatura durante 24 horas tras las cuales el metanol fue eliminado a vacío. La

mezcla fue extraída con acetato de etilo, lavada con salmuera y secada sobre sulfato sódico anhidro. El análisis por capa fina del crudo mostró un único producto que se reveló con vainillina-ácido sulfúrico de color marrón. Posteriormente el crudo de reacción fue cromatografiado en columna de gel de sílice empleando una mezcla eluyente AcOEt/ n-hexano (30:70). Se obtiene de este modo, con un rendimiento del 80%, una mezcla de dos isómeros, **10a** (1.05 g) y **10b** (0.26 g).

Compuesto **10a**



UV (EtOH) $\lambda_{\text{máx}}$ nm (log ϵ): 290 (3.87), 238 (4.04)

IR $\nu_{\text{máx}}$ (CHCl₃) cm⁻¹: 423, 782, 844, 952, 1028, 1134, 1208, 1465, 1511, 1790, 2935, 2955

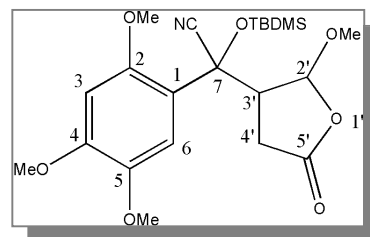
HR-MS: 451.200584 (C₂₂H₃₃NO₇Si requiere 451.202631)

MS m/z (%): 451 [M]⁺ (8), 362 (7), 336 (19), 310 (26), 232 (22), 195 (100), 173 (7)

¹H-NMR (CDCl₃) δ : 0.12 (s, 3H, -OSi(Me)₂C(Me)₃), 0.38 (s, 3H, -OSi(Me)₂C(Me)₃), 1.00 (s, 9H, -OSi(Me)₂C(Me)₃), 2.66 (dd, 1H, $J_1=3.4$ Hz, $J_2=18.4$ Hz), 2.92 (dd, 1H, $J_1=9.6$ Hz, $J_2=18.4$ Hz), 3.20 (s, 3H, -OMe), 3.35-3.36 (compleja, 1H), 3.82 (s, 3H, -OMe), 3.91 (s, 3H, -OMe), 3.92 (s, 3H, -OMe), 4.99 (s, 1H), 6.60 (s, 1H), 7.06 (s, 1H)

¹³C-NMR (CDCl₃) δ : -3.8 (q, -OSi(Me)₂C(Me)₃), -3.6 (q, -OSi(Me)₂C(Me)₃), 18.6 (s, -OSi(Me)₂C(Me)₃), 25.9 (q, -OSi(Me)₂C(Me)₃), 30.3 (t, C-4'), 49.4 (d), 56.1 (q, -OMe), 56.6 (q, -OMe), 56.7 (q, -OMe), 57.1 (q, -OMe), 72.0 (s), 98.5 (d), 104.6 (d), 110.4 (d), 116.3 (s), 119.1 (s), 143.0 (s), 150.2 (s), 150.8 (s), 174.9 (s)

Compuesto **10b**



UV (EtOH) $\lambda_{\text{máx}}$ nm (log ϵ): 290 (3.87), 238 (4.04)

IR $\nu_{\text{máx}}$ (CHCl₃) cm⁻¹: 423, 782, 844, 952, 1028, 1134, 1208, 1465, 1511, 1790, 2935, 2955.

HRMS: 451.202003 (C₂₂H₃₃NO₇Si requiere 451.202631)

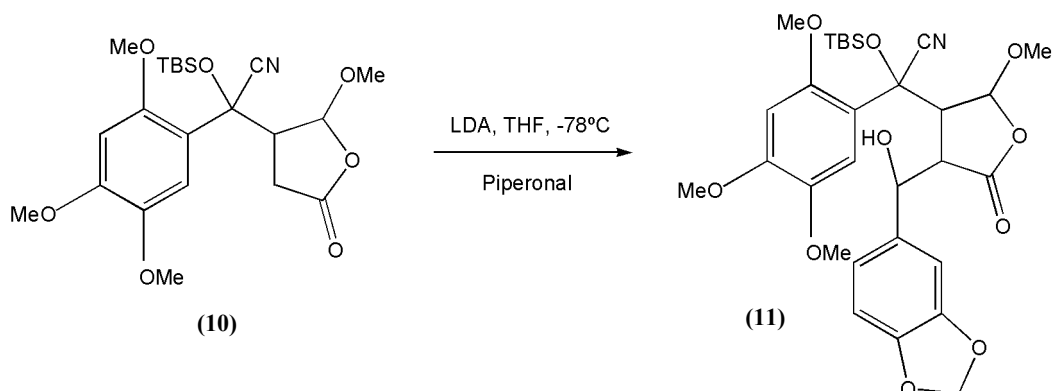
MS m/z (%): 451 [M]⁺ (4), 362 (5), 336 (15), 310 (21), 232 (21), 195 (100), 173 (8)

¹H-NMR (CDCl₃) δ : 0.14 (s, 3H, -OSi(Me)₂C(Me)₃), 0.39 (s, 3H, -OSi(Me)₂C(Me)₃), 1.01 (s, 9H, -OSi(Me)₂C(Me)₃), 2.21 (dd, 1H, $J_1=3.4$ Hz, $J_2=18.3$ Hz), 2.36 (dd, 1H, $J_1=9.6$ Hz, $J_2=18.4$ Hz), 3.31-3.32 (complejo, 1H), 3.54 (s, 3H, -OMe), 3.80 (s, 3H, -OMe), 3.90 (s, 3H, -OMe), 3.91 (s, 3H, -OMe), 5.54 (s, 1H), 6.55 (s, 1H), 6.97 (s, 1H)

¹³C-NMR (CDCl₃) δ : -3.5 (q, -OSi(Me)₃C(Me)₂), -3.4 (q, -OSi(Me)₃C(Me)₂), 18.6 (s, -OSi(Me)₃C(Me)₂), 25.9 (q, -OSi(Me)₃C(Me)₂), 28.0 (t, C-4'), 49.8 (d), 56.1 (q, -OMe), 56.5 (q, -OMe), 56.6 (q, -OMe), 56.9 (q, -OMe), 70.9 (s), 98.4 (d), 106.3 (d), 110.4 (d), 116.5 (s), 119.0 (s), 143.0 (s), 149.7 (s), 150.7 (s), 175.3 (s)

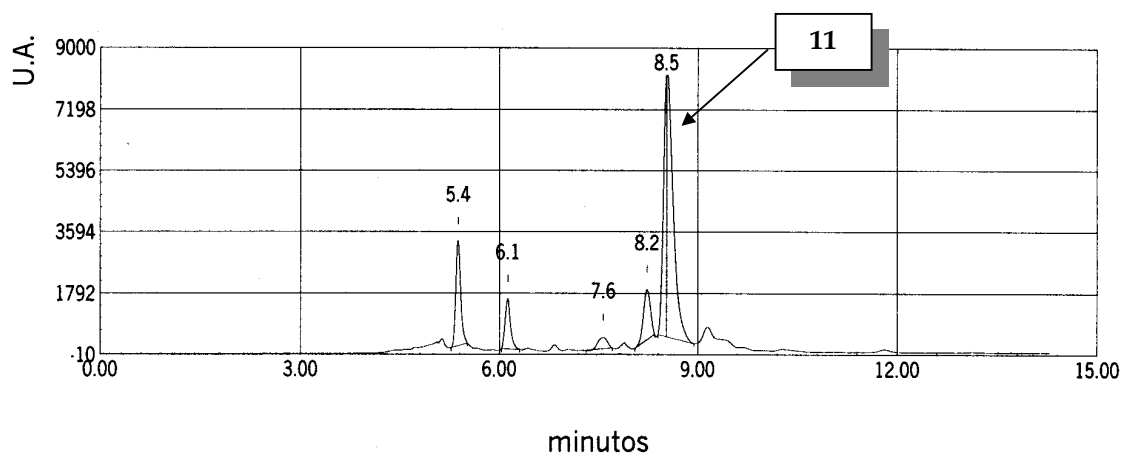
➤ Obtención de **11**

[4-(Benzo [1,3] dioxol-5-il-hidroxi-metil)-2-metoxi-5-oxo-tetrahidro-furan-3-il]-(*tert*-butil-dimetil-silaniloxi)-(2, 4, 5-trimetoxi-fenil)-acetonitrilo



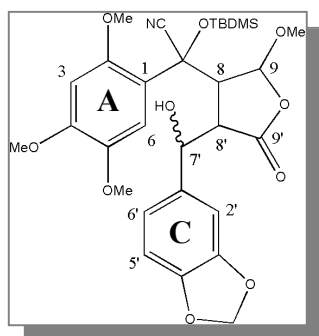
A una disolución de 1.21 mmoles de LDA (0.9 ml de disolución de LDA 1.34 M) en 9 ml de tetrahidrofurano seco, a -78°C y bajo atmósfera de nitrógeno seco, se añadió 0.5 g de **10a** (1.1 mmoles) disueltos en 3.3 ml de THF seco. La mezcla se mantuvo con agitación durante 10 minutos, transcurridos los cuales se añadió a la misma temperatura 0.18 g de piperonal (1.20 mmoles) disueltos en 2.5 ml de THF seco. La reacción fue detenida a los 30 minutos mediante la adición de 3 ml de una disolución saturada de NH_4Cl . La mezcla fue llevada a temperatura ambiente y extraída con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con salmuera y se secó sobre Na_2SO_4 . Tras ser llevado a sequedad, una parte del crudo fue disuelto, filtrado e inyectado en el cromatógrafo de HPLC empleando la mezcla acetato de etilo/n-hexano al 50%, obteniéndose así el Cromatograma 7. Los picos a 6.1 y 8.2 minutos corresponden al piperonal y al compuesto **10a** respectivamente. El pico de mayor relevancia corresponde a un producto con $t_{\text{R}}=8.5$ minutos cuyos datos espectroscópicos son coherentes con los esperados para el compuesto **11**.

La cromatografía en columna de gel de sílice del crudo, con la mezcla eluyente AcOEt/n-hexano (20:80), rindió 0.46 g (rendimiento=70%) de **11** que en TLC se reveló de color negro con óleum y mostró un R_{f} de 0.54 (AcOEt/n-hexano 50%).



Cromatograma 7. Inyección del crudo de reacción

Compuesto 11



UV (EtOH) $\lambda_{\text{máx}}$ nm (log ϵ): 289 (3.98), 236 (4.13)

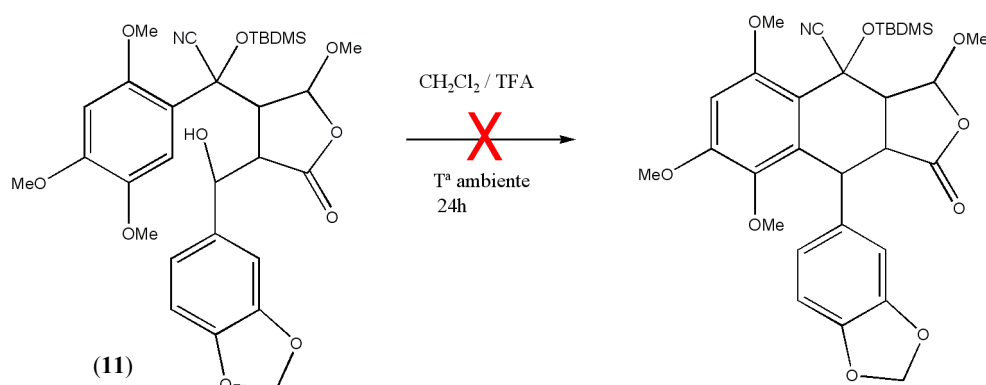
IR $\nu_{\text{máx}}$ (CHCl₃) cm⁻¹: 782, 934, 1034, 1208, 1397, 1489, 1509, 1774, 2855, 2928, 3510

HR-MS: 601.234802 (C₃₀H₃₉NO₁₀Si requiere 601.234325)

MS m/z (%): 601 [M]⁺ (1), 451 (6), 336 (19), 310 (23), 232 (19), 195 (100), 149 (26)

¹H-NMR (CDCl₃) δ : 0.07 (s, 3H, -OSi(Me)₂C(Me)₃), 0.38 (s, 3H, -OSi(Me)₂C(Me)₃), 1.01 (s, 9H, -OSi(Me)₂C(Me)₃), 2.47 (d, 1H, H-8'), 2.88 (s, 1H, H-8), 3.62 (s, 6H, 2x-OMe), 3.90 (s, 3H, -OMe), 3.92 (s, 3H, -OMe), 4.61 (d, 1H, J=9.9 Hz), 5.60 (s, 1H, H-9), 5.85 (s, 1H, -OCH₂O-), 5.92 (s, 1H, -OCH₂O-), 6.14 (s, 1H, H-3), 6.32 (s, 1H, H-2'), 6.41 (d, 1H, J=7.9 Hz, H-6'), 6.51 (d, 1H, J=7.9 Hz, H-5'), 6.86 (s, 1H, H-6)

¹³C-NMR (CDCl₃) δ : 18.6 (s, -OSi(Me)₂C(Me)₃), 25.9 (q, -OSi(Me)₂C(Me)₃), 47.7 (d, C-8'), 52.1 (d, C-8), 55.4 (q, -OMe), 55.9 (q, -OMe), 57.1 (q, -OMe), 57.3 (q, -OMe), 71.1 (s, C-7), 74.1 (d, C-7'), 97.5 (d, C-3), 100.9 (t, -OCH₂O-), 106.6 (d, C-9), 106.9 (d, C-2'), 107.5 (d, C-5'), 110.8 (d, C-6), 114.8 (s, C-1), 118.9 (s, -CN), 120.6 (d, C-6'), 133.3 (s, C-1'), 142.8 (s, anillo A), 147.0 (s, anillo C), 147.3 (s, anillo C), 149.2 (s, anillo A), 150.7 (s, anillo A), 177.7 (s, C-9')

➤ Intento de ciclación de **11**

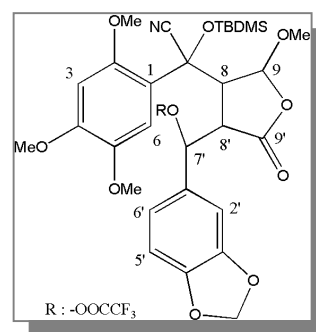
Se disolvieron 100 mg del compuesto **11** en 2 ml de diclorometano y se añadieron, gota a gota, 2 ml de ácido trifluoroacético (TFA). La reacción se mantuvo con agitación magnética y a temperatura ambiente durante 24 horas. La mezcla fue extraída con acetato de etilo, siendo lavada la fase orgánica con bicarbonato en dos ocasiones tras lo cual fue secada sobre sulfato sódico anhidro. Una vez filtrado, el crudo fue inyectado en el cromatógrafo de HPLC empleando la mezcla eluyente acetato de etilo/n-hexano (60:40). Se recuperó un 80% del producto de partida.

➤ Obtención de **15** (derivado trifluoroacetilado de 11)

1,3-benzodioxol-5-il{4-[[*tert*-butil(dimetil)silil]oxi}(ciano)(2,4,5-trimetoxifenil)metil]-5-metoxi-2-oxotetrahidro-3-furanil}metil trifluoroacetato

Se disolvieron 100 mg del compuesto **11** en 5 ml de ácido trifluoroacético y se mantuvo la mezcla de reacción a reflujo con agitación magnética. Transcurridas 12 horas la reacción fue extraída con acetato de etilo. La fase orgánica fue lavada con bicarbonato sódico en tres ocasiones y luego con agua destilada para ser finalmente secada sobre sulfato sódico anhidro. Una vez llevado a sequedad, el crudo fue disuelto en AcOEt/n-hexano (60:40) y una vez filtrado fue inyectado en el cromatógrafo de HPLC, obteniéndose el producto de partida y otro compuesto con $t_R=6.55$ minutos y con los siguientes datos espectroscópicos.

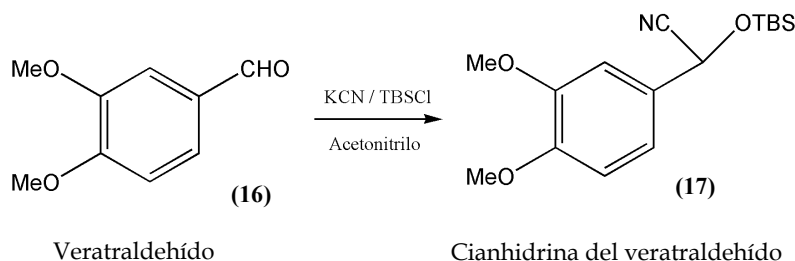
Compuesto 15



HR-MS: 697.219496 (C₃₂H₃₈NO₁₁F₃Si requiere 697.216625)
 MS m/z (%): 697 [M]⁺ (14), 392 (74), 336 (51), 310 (11), 195 (100), 73 (10)
¹H-NMR (CDCl₃) δ: 0.075 (s, 3H, -OSi(Me)₂C(Me)₃), 0.33 (s, 3H, -OSi(Me)₂C(Me)₃), 0.99 (s, 9H, -OSi(Me)₂C(Me)₃), 3.24 (s, 3H, -OMe), 3.39 (s, 1H), 3.82 (s, 3H, -OMe), 3.89 (s, 3H, -OMe), 3.92 (s, 3H, -OMe), 5.04 (s, 1H), 5.96 (s, 2H, -OCH₂O-), 6.26 (d, 1H, J=5.13 Hz), 6.54 (s, 1H), 6.83 (complejo, 3H, piperonilo), 6.97 (s, 1H)

➤ Obtención del compuesto 17

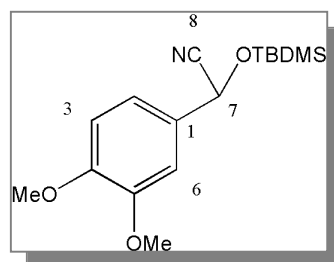
(*tert*-Butil-dimetil-silaniloxi)-(3,4-dimetoxi-fenil)-acetonitrilo



En un balón de 3 bocas previamente flameado y mantenido bajo presión positiva de nitrógeno se añadieron 0.83 g de veratraldehído (5.0 mmoles), 25 ml de acetonitrilo, 1.3 g de KCN (20.0 mmoles), 30 mg de ZnI₂ (0.094 mmoles) y 0.9 g de TBSCl (6 mmoles). La mezcla se agitó vigorosamente y se mantuvo a 70°C con agitación durante 4 horas y 30 minutos. Tras haber desaparecido el aldehído de partida, el disolvente fue eliminado a vacío y el residuo resuspendido en éter dietílico (60 ml), tras lo cual se filtró la mezcla para eliminar las sales. El material filtrado fue lavado con agua y

secado sobre sulfato sódico anhidro. El residuo resultante tras la eliminación del disolvente fue cromatografiado en una columna de gel de sílice en la que se empleó una mezcla eluyente de AcOEt/n-hexano (20:80). Se obtuvo así 1.42 g de un residuo sólido cuyos datos espectroscópicos se muestran a continuación. Rendimiento = 92%.

Compuesto 17



UV $\lambda_{\text{máx}}$ (EtOH) nm: 345 (3.07), 286 (3.70), 256 (3.90)

IR $\nu_{\text{máx}}$ (CHCl₃) cm⁻¹: 631, 840, 1026, 1144, 1273, 1426, 1517, 1673, 2858, 2956

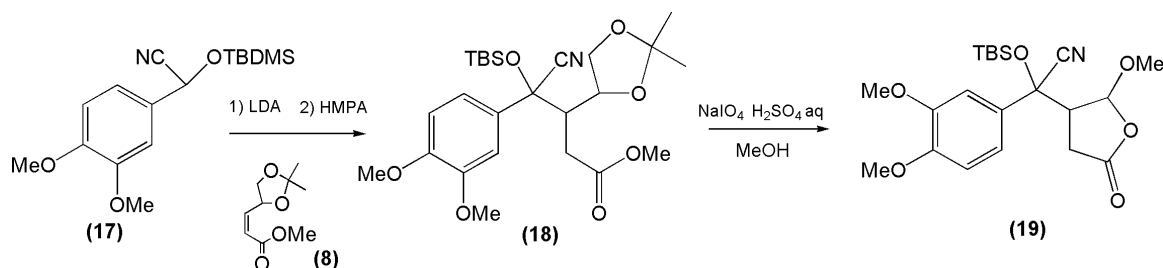
MS m/z (%): 307 [M]⁺ (9), 292 (3), 250 (80), 176 (100)

¹H-NMR (CDCl₃) δ : 0.13 (s, 3H, -OSi(Me)₂C(Me)₃), 0.21 (s, 3H, -OSi(Me)₂C(Me)₃), 0.93 (s, 9H, -OSi(Me)₂C(Me)₃), 3.89 (s, 3H, -OMe), 3.90 (s, 3H, -OMe), 5.45 (s, 1H, H-7), 6.86 (d, 1H, J=8.19 Hz, H-4), 6.98 (m, 2H, H-2 y H-6)

¹³C-NMR (CDCl₃) δ : -5.3 (q, -OSi(Me)₂C(Me)₃), 18.1 (s, -OSi(Me)₂C(Me)₃), 25.4 (q, -OSi(Me)₂C(Me)₃), 55.8 (q, -OMe), 55.8 (q, -OMe), 63.7 (d), 109.1 (d), 111.0 (d), 118.6 (d), 119.3 (s), 129.0 (s), 149.3 (s), 149.7 (s)

➤ Obtención de **19**

(*tert*-Butil-dimetil-silaniloxi)-(3,4-dimetoxi-fenil)-(2-metoxi-5-oxo-tetrahidro-furan-3-il)-
acetonitrilo



A una solución de 5.9 mmoles de diisopropilamiduro de litio (LDA) en 30 ml de THF seco se añadió, gota a gota, la cianhidrina **17** (1.62 g, 5.23 mmoles) disuelta en 3 ml de THF seco a -78°C y bajo atmósfera de nitrógeno seco. La mezcla de reacción fue mantenida bajo estas condiciones durante 10 minutos, tras los cuales se bajó la temperatura a -100°C y se añadió sucesivamente HMPA recién destilada (1.8 ml) en 3 ml de THF y 0.98 g (5.27 mmoles) del éster **8** en 3 ml de THF.

A los 30 minutos de reacción se realizó una TLC que mostró la existencia de un solo producto, que se reveló de color verde con vainillina-ácido sulfúrico y que corresponde con la mezcla de isómeros de **18**.

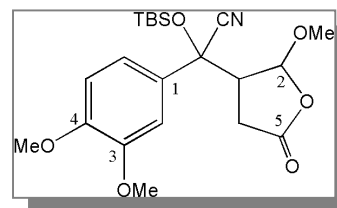
La reacción se detuvo adicionando 12 ml de una disolución saturada de NH₄Cl y se dejó que la mezcla alcanzase lentamente la temperatura ambiente. La extracción se llevó a cabo con acetato de etilo y la fase orgánica se lavó con salmuera tras lo cual fue secada sobre sulfato sódico anhidro. El crudo de reacción fue cromatografiado en columna de gel de sílice empleando la mezcla eluyente acetato de etilo/n-hexano al 25:75 obteniéndose de las fracciones 21-36, 2.12 g (rendimiento=82%) de una mezcla inseparable de isómeros que en espectrometría de masas de alta resolución dio un ión molecular a 493.251541 (C₂₅H₃₉NO₇Si requiere 493.249581).

Una disolución que contenía 2 g de NaIO₄ y 1.18 ml de H₂SO₄ (98% de riqueza) en 42 ml de agua se añadió a otra que contenía 1.37 g de la mezcla isomérica de **18** en 56 ml de metanol y se agitó bien la mezcla durante 24 h a 50°C.

El metanol fue eliminado a vacío, llevándose a cabo la extracción con acetato de etilo. La fase orgánica fue lavada con salmuera y secada sobre sulfato sódico anhidro tras lo cual fue concentrada a vacío. El residuo resultante fue cromatografiado en columna de gel de sílice que se eluyó con una mezcla AcOEt/n-hexano al 30%. Se obtuvo así una mezcla de isómeros del compuesto **19** que se reveló de color marrón con vainillina-ácido sulfúrico.

Compuesto **19**

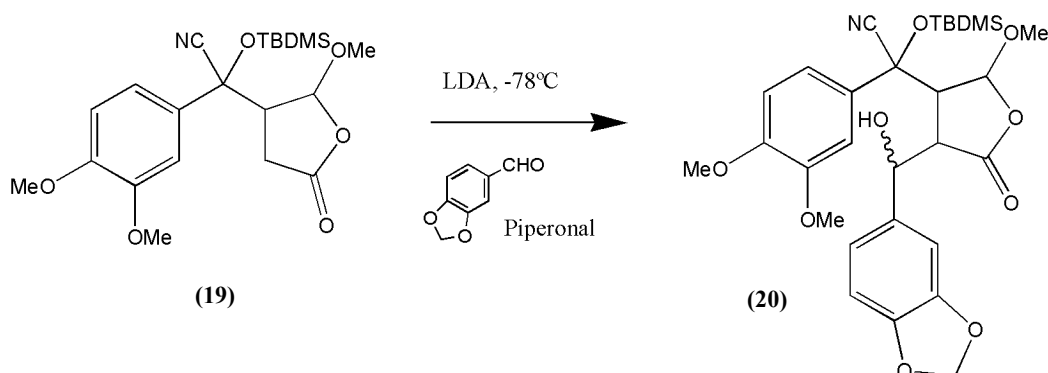
Mezcla de diasterómeros



UV $\lambda_{\text{máx}}$ (EtOH) nm: 280 (3.44), 237 (3.83)
 IR $\nu_{\text{máx}}$ (CHCl₃) cm⁻¹: 422, 766, 836, 952, 1165, 1263, 1415, 1518, 1795, 2859, 2934, 2955
 HR-MS: 421.193893 (C₂₁H₃₁NO₆Si requiere 421.192066)
 MS m/z (%): 421 [M]⁺ (1), 364 (2), 337 (12), 306 (10), 280 (12), 202 (16), 173 (27), 165 (100)

➤ Obtención de **20**

[4-(Benzo[1,3]dioxol-5-il-hidroxi-metil)-2-metoxi-5-oxo-tetrahidro-furan-3-il]-(*tert*-butil-dimetil-silaniloxi)-(3,4-dimetoxi-fenil)-acetonitrilo

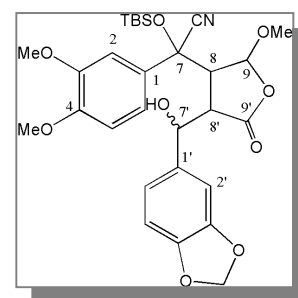


A una solución de 1.87 mmoles de LDA (1.4 ml, 1.34 M) en 13.6 ml de tetrahidrofurano seco y a -78°C se añade gota a gota 0.7 g (1.7 mmoles) de la mezcla diastereomérica de **19** disuelta en 5 ml de THF seco bajo presión positiva de nitrógeno. Tras 10 minutos de reacción se añadieron 0.28 g de piperonal (1.87 mmoles) disueltos en 3 ml de THF seco.

Tras 45 minutos de reacción y a esa temperatura, se añadieron 5 ml de una disolución saturada de cloruro amónico con el objeto de detener la reacción. Se dejó que la mezcla alcanzase lentamente la temperatura ambiente tras lo cual se llevó a cabo una extracción del modo habitual con acetato de etilo. La fase orgánica fue lavada con una disolución saturada de cloruro sódico y secada sobre sulfato sódico anhidro.

El residuo obtenido tras la evaporación a vacío del disolvente fue cromatografiado mediante una columna de gel de sílice y eluida con una mezcla de acetato de etilo/n-hexano al 25%. Se obtuvieron 0.81 g del compuesto **20** (Rendimiento= 83.5%).

Compuesto **20**



IR $\nu_{\text{máx}}$ (CHCl_3) cm^{-1} : 414, 757, 838, 934, 1027, 1117, 1262, 1464, 1517, 1770, 2934, 2956

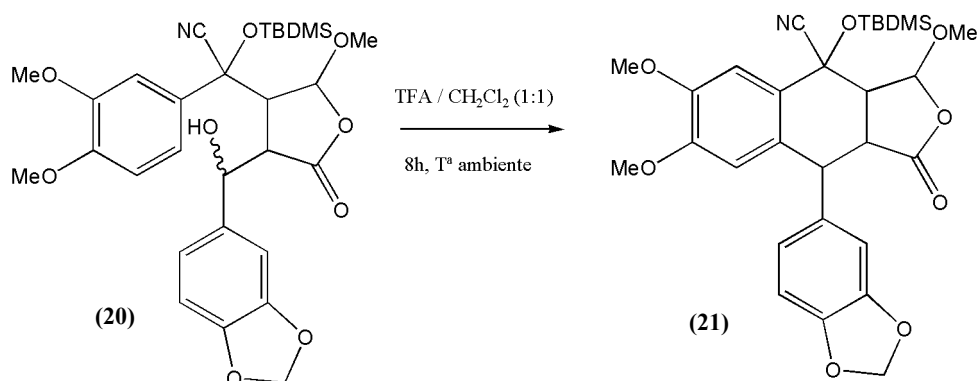
HR-MS: 571.224152 ($\text{C}_{29}\text{H}_{37}\text{NO}_9\text{Si}$ requiere 571.223761)

MS m/z (%): 571 [M]⁺ (1), 410 (2), 346 (5), 306 (11), 280 (19), 202 (10), 173 (24), 165 (100), 149 (21), 64 (61)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 0.02 (s, 3H, $-\text{OSiC}(\underline{\text{Me}})_2\text{C}(\text{Me})_3$), 0.30 (s, 3H, $-\text{OSiC}(\underline{\text{Me}})_2\text{C}(\text{Me})_3$), 0.98 (s, 9H, $-\text{OSiC}(\text{Me})_2\text{C}(\underline{\text{Me}})_3$), 2.35 (s, 1H), 2.59 (d, 1H, $J=8.9$ Hz), 3.43 (s, 1H), 3.64 (s, 3H, $-\text{OMe}$), 3.69 (s, 3H, $-\text{OMe}$), 3.91 (s, 3H, $-\text{OMe}$), 4.62 (d, 1H, $J=10.0$ Hz), 5.57 (s, 1H), 5.90 (s, 1H), 6.02 (s, 1H), 6.15 (s, 1H), 6.30 (s, 1H), 6.42 (d, 1H, $J=7.9$ Hz), 6.53 (d, 1H, $J=7.8$ Hz), 6.77 (d, 1H, $J=8.4$ Hz), 6.80 (d, 1H, $J=7.9$ Hz)

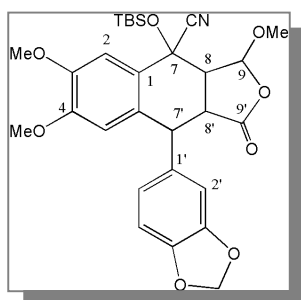
➤ Obtención de **21**

9-Benzo[1,3]dioxol-5-il-4-(*tert*-butil-dimetil-silaniloxi)-3,6,7-trimetoxi-1-oxo-1,3,3a,4,9,9a-hexahidro-nafto[2,3-c]furan-4-carbonitrilo



500 mg (0.87 mmoles) del compuesto **20** fueron disueltos en 4 ml de diclorometano, tras lo cual se añadió gota a gota 4 ml de TFA. Tras mantener la mezcla de reacción con agitación durante 8 horas, fue diluida con diclorometano (30 ml) y lavada consecutivamente con agua destilada, con una disolución saturada de NaHCO_3 y con salmuera. La fase orgánica fue secada sobre Na_2SO_4 anhidro y una vez llevada a sequedad, fue cromatografiada en columna de gel de sílice obteniéndose como producto mayoritario el compuesto **21** (380 mg, rendimiento=78.8 %)

Compuesto 21



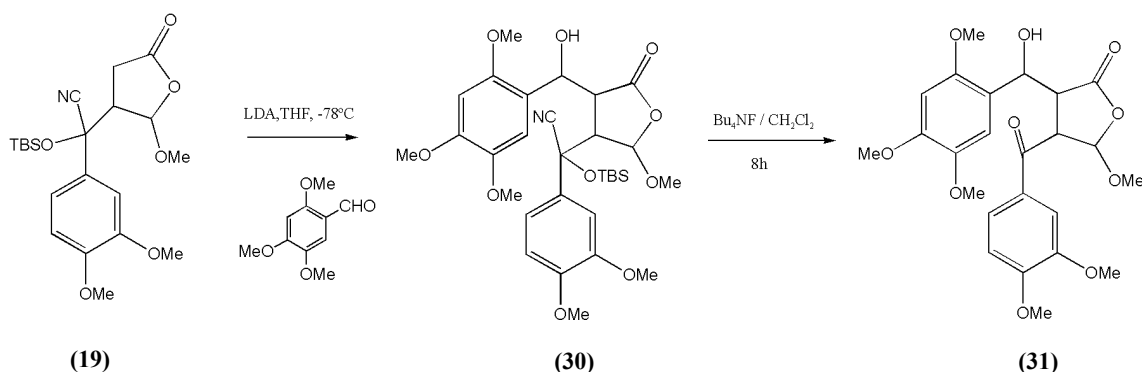
HR-MS: 553.214462 ($C_{29}H_{35}NO_8Si$ requiere 553.213196)

MS m/z (%): 553[M]⁺ (100), 496 (12), 464 (54), 390 (33), 362 (75), 334 (55), 248 (23)

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 0.35 (s, 3H, -OSi(Me)₂C(Me)₃), 0.54 (s, 3H, -OSi(Me)₂C(Me)), 0.95 (s, 9H, -OSi(Me)₂C(Me)₃), 2.75 (dd, 1H, $J_1=6.15$ Hz, $J_2=7.41$ Hz), 3.13 (dd, 1H, $J_1=3.3$ Hz, $J_2=11.1$ Hz), 3.64 (s, 6H, 2 x -OMe), 3.89 (s, 3H, -OMe), 4.19 (d, 1H, $J=11.1$ Hz), 5.61 (d, 1H, $J=6.12$ Hz), 5.95 (s, 2H, -OCH₂O-), 6.28 (s, 1H), 6.60 (s, 1H), 6.76 (dd, 2H, $J_1=7.8$ Hz, $J_2=8.16$ Hz), 7.03 (s, 1H)

➤ Obtención de **31**

4(3,4-Dimetoxi-benzoil)-3-[hidroxi-(2, 4, 5-trimetoxi-fenil)-metil]-5-metoxi-dihidro-furan-2-ona



A una disolución de LDA (2.40 mmoles) en 18 ml de THF seco enfriada a -78°C y bajo presión positiva de nitrógeno seco, se añadió gota a gota 1 g del compuesto **19** (2.38 mmoles) disuelto en THF. Tras 10 minutos se añadieron 0.47 g (2.4 mmoles) de 2,4,5-trimetoxibenzaldehído disuelto en 5 ml de THF. Tras 45 minutos la reacción fue detenida mediante la adición de 5 ml de una disolución saturada de cloruro amónico, dejando que la mezcla alcanzase la temperatura ambiente. La extracción se llevó a cabo con acetato de etilo y la fase orgánica fue lavada con una disolución saturada de cloruro sódico y secada sobre sulfato sódico anhidro. La cromatografía en capa fina de la mezcla de reacción mostró un producto que se reveló de color negro con vainillina-ácido sulfúrico.

El crudo fue cromatografiado en columna de gel de sílice empleando como mezcla eluyente acetato de etilo/n-hexano entre el 20 y el 50%. El espectro de $^1\text{H-NMR}$ mostró que, como era de esperar, se trataba de una mezcla de isómeros. El espectro de masas de la mezcla dio un valor para el ión molecular de 617 uma, igual al valor esperado.

Compuesto 30

Mezcla de isómeros

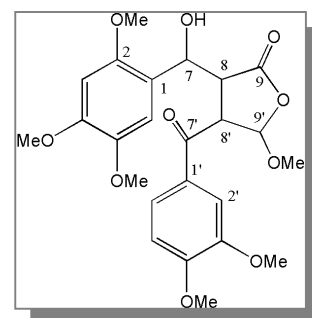
MS m/z (%): 617 [M]⁺ (9), 337 (13), 304 (8), 280 (13), 197 (66), 165 (100), 150 (8)

La mezcla isomérica de **30** se disolvió en diclorometano (20 ml) y se añadió a temperatura ambiente 4.4 ml de fluoruro de tetrabutilamonio (TBAF) 1M (4.4 mmoles) en THF con 0.3 ml de ácido acético glacial. Transcurridas dos horas, la disolución fue lavada con agua (10 ml), con salmuera (10 ml) y secada sobre sulfato sódico anhidro. Una vez eliminado el disolvente a vacío, el crudo fue cromatografiado en columna de gel de sílice con la mezcla eluyente acetato de etilo/n-hexano del 20% al 50%.

Se obtuvo de este modo 0.90 g de un producto aceitoso de color amarillo cuyo peso molecular coincidió con el valor esperado (476 uma). Rendimiento = 79.4 % desde **19**.

Compuesto 31

Mezcla de isómeros

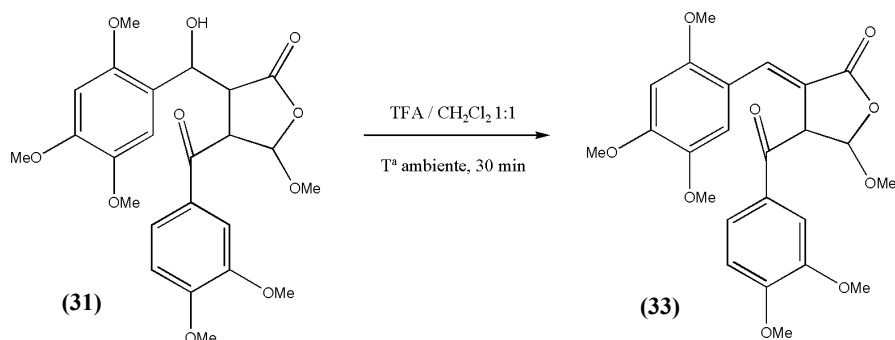


HR-MS: 476.146835 (C₂₄H₂₈O₁₀ requiere 476.147118)

MS m/z (%): [M]⁺ 476(4), 458 (10), 426 (13), 398 (5), 196 (14), 165 (100), 142 (18)

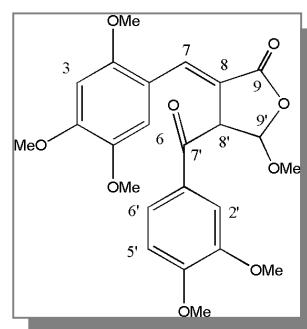
➤ Obtención de **33**

4-(3,4-Dimetoxi-benzoil)-5-metoxi-3-(2, 4, 5-trimetoxi-bencilideno)-dihidro-furan-2-ona



Se disolvieron 800 mg de la mezcla isomérica de **31** en 25 ml de CH_2Cl_2 tras lo cual se añadieron a temperatura ambiente y gota a gota 25 ml de TFA. La mezcla de reacción, que se oscureció rápidamente, se mantuvo con agitación durante 30 minutos. Una vez extraída con AcOEt, la fase orgánica fue lavada con una solución saturada de NaHCO_3 , con agua destilada, secada sobre Na_2SO_4 anhidro y cromatografiada en una columna de gel de sílice con la mezcla eluyente AcOEt/n-hexano (60:40). Se obtuvo así un producto que en capa fina mostró fluorescencia azul a la luz ultravioleta. Rendimiento=92%.

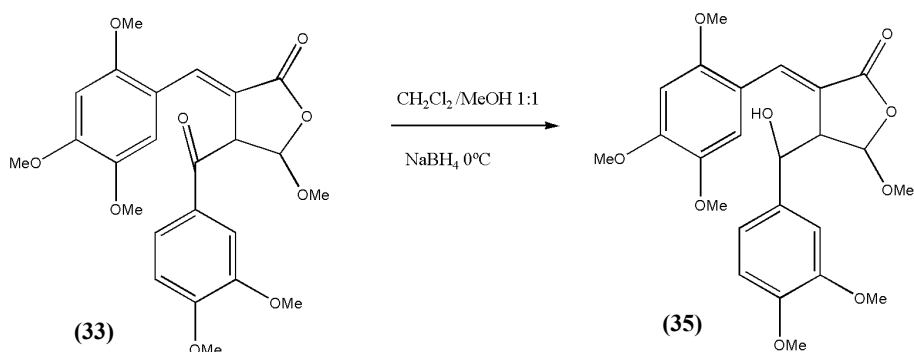
Compuesto **33**



- UV $\lambda_{\text{máx}}$ (EtOH) nm: 364 (3.48), 286 (3.64), 235 (3.81)
- IR $\nu_{\text{máx}}$ (CHCl_3) cm^{-1} : 1024, 1114, 1211, 1262, 1465, 1515, 1755, 2360, 2842, 2937
- HR-MS: 458.159302 ($\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{O}_9$ requiere 458.157683)
- MS m/z (%): 458 $[\text{M}]^+$ (5), 426 (35), 395 (5), 242 (31), 195 (27), 165 (100), 142 (55), 100 (19)
- $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 3.28 (s, 3H, -OMe), 3.58 (s, 3H, -OMe), 3.76 (s, 3H, -OMe), 3.87 (s, 3H, -OMe), 3.90 (s, 3H, -OMe), 3.98 (s, 3H, -OMe), 5.04 (d, 1H, $J=1.7$ Hz, H-8'), 5.36 (d, 1H, $J=1.7$ Hz, H-9'), 6.42 (s, 1H, H-3), 6.56 (s, 1H, H-6), 6.95 (d, 1H, $J=8.5$ Hz, H-5'), 7.56 (s, 1H, H-2'), 7.75 (d, 1H, $J=8.5$ Hz, H-6'), 8.17 (s, 1H, H-7)
- $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 54.9 (d, C-8'), 55.0-56.08 (6x q, -OMe), 96.59 (d, C-3), 102.85 (d, C-9'), 110.28 (d, C-2'), 110.56 (d, C-5'), 114.24 (s, C-1), 114.45 (d, C-6), 118.38 (s, C-8'), 123.39 (d, C-6'), 128.43 (s, C-1'), 135.57 (d, C-7), 142.81 (s, C-5), 149.54 (s, C-3'), 152.24 (s, C-4), 154.26 (s, C-4'), 154.36 (s, C-2), 170.74 (s, C-9), 192.19 (s, C-7')

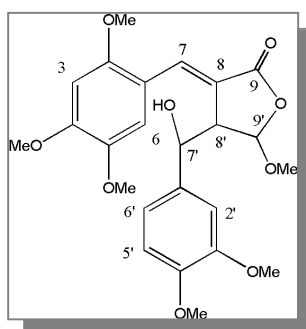
➤ Obtención de **35**

4-[(3,4-Dimetoxi-fenil)-hidroxi-metil]-5-metoxi-3-(2, 4, 5-trimetoxi-bencilideno)-
dihidro-furan-2-ona



Se disolvieron 600 mg de **33** (1.31 mmoles) en una mezcla de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:1) y tras enfriar la mezcla a 0°C se añadieron 3 equivalentes (149.3 mg) de NaBH_4 . Tras 30 minutos y a la misma temperatura se añadió lentamente agua destilada. La mezcla de reacción fue extraída con CH_2Cl_2 , siendo secada la fase orgánica con Na_2SO_4 anhidro. Tras eliminar el disolvente a vacío se obtuvieron 542 mg de **35** (rendimiento=90%) un producto de color amarillo que en capa fina mostró un R_f menor que **33** y al igual que éste mostró fluorescencia azul al ser irradiado con luz ultravioleta.

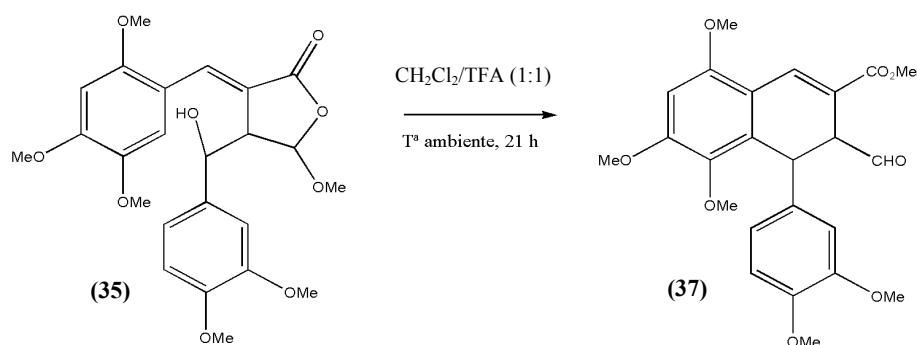
Compuesto 35



- UV $\lambda_{\text{máx}}$ (EtOH) nm: 355 (3.76), 288 (3.97), 227 (4.19)
- IR $\nu_{\text{máx}}$ (CHCl₃) cm⁻¹: 1027, 1127, 1269, 1465, 1515, 1692, 1746, 2360, 2876, 2936, 2962
- HR-MS: 460.177231 (C₂₄H₂₈O₉ requiere 460.173333)
- MS m/z (%): 460 [M]⁺ (3), 442 (9), 382 (6), 339 (6), 294 (100), 262 (16), 165 (17), 142 (65), 100 (15)
- ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 3.46 (s, 3H, -OMe), 3.79 (s, 3H, -OMe), 3.81 (s, 3H, -OMe), 3.87 (s, 6H, 2x-OMe), 3.94 (s, 3H, -OMe), 3.78-3.94 (1H, H-8'), 4.96 (d, 1H, J=5.6 Hz), 5.32 (s, 1H), 6.48 (s, 1H), 6.71-6.82 (m, 3H), 7.29 (s, 1H), 8.06 (s, 1H)
- ¹³C-NMR (CDCl₃) δ : 52.3(d), 55.7-56.6 (6xq, -OMe), 72.5 (d), 96.4 (d), 103.4 (d), 109.4 (d), 110.8 (d), 111.8 (d), 114.3 (s), 118.2 (d), 120.7 (s), 133.5 (s), 134.7(d), 142.8 (s), 148.8 (s), 148.8 (s), 152.1 (s), 154.3 (s), 171.6 (s)

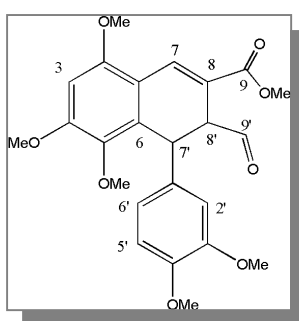
➤ Obtención de 37

4(3,4-Dimetoxi-fenil)-3-formil-4-hidroxi-2-(2, 4, 5-trimetoxi-bencilideno)-ácido butírico metil éster



500 mg de **35** (1.09 mmoles) fueron disueltos en 20 ml de la mezcla CH₂Cl₂ / TFA (1:1) y mantenidos a temperatura ambiente con agitación durante 21 horas. La mezcla de reacción fue extraída con AcOEt y lavada en tres ocasiones con una disolución saturada de NaHCO₃. Tras ser lavada con agua destilada, la fase orgánica fue secada sobre Na₂SO₄ anhidro y una vez filtrada fue llevada a sequedad obteniéndose 416 mg del compuesto **37**, un sólido de color marrón oscuro (rendimiento=86.4%).

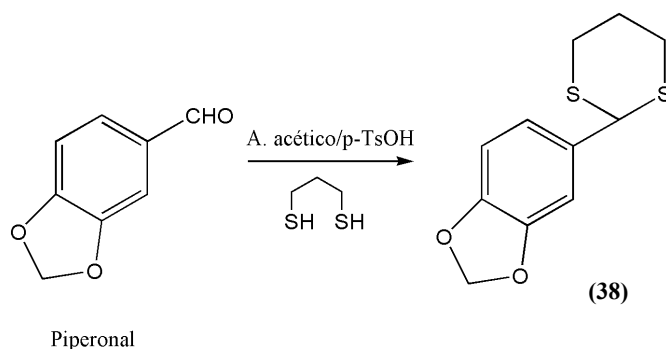
Compuesto **37**



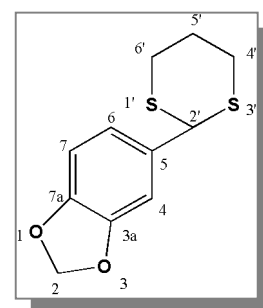
UV $\lambda_{\text{m\acute{a}x}}$ (EtOH) nm:	346 (3.62), 255 (3.96), 231 (4.05)
IR $\nu_{\text{m\acute{a}x}}$ (CHCl ₃) cm ⁻¹ :	756, 1026, 1139, 1235, 1458, 1516, 1592, 1716, 2341, 2360, 2853, 2929
HR-MS:	442.162895 (C ₂₄ H ₂₆ O ₈ requiere 442.162768)
MS m/z (%):	442 [M] ⁺ (13), 428 (50), 410 (100), 399 (62), 364 (59), 349 (24), 324 (33), 273 (17), 165 (13)
¹ H-NMR (CDCl ₃) δ (400 MHz):	3.56 (s, 3H, -OMe), 3.77 (s, 3H, -OMe), 3.79 (s, 3H, -OMe), 3.84 (s, 1H, H-8'), 3.90 (s, 9H, 3x-OMe), 5.06 (s, 1H, H-7'), 6.40 (s, 1H, H-3), 6.46 (d, 1H, J=7.3 Hz, H-5'), 6.66 (d, 1H, J=7.8 Hz, H-6'), 6.70 (s, 1H, H-2'), 8.37 (s, 1H, H-7), 9.55 (s, 1H, C-9')
¹³ C-NMR (CDCl ₃) δ :	36.3 (d, C-7'), 53.4 (d, C-8'), 55.7 (q, -OMe), 55.8 (q, -OMe), 55.9 (q, -OMe), 55.9 (q, -OMe), 56.0 (q, -OMe), 60.8 (q, -OMe), 95.0 (d, C-3), 111.0 (d, C-2'), 111.3 (d, C-6'), 112.6 (s, C-1), 115.9 (s, C-8), 119.7 (d, C-5'), 132.3 (s, C-6), 134.3 (s, C-1'), 137.6 (d, C-7), 139.8 (s, C-5), 147.7 (s, C-4'), 148.6 (s, C-3'), 155.3 (s, C-2), 157.0 (s, C-4), 172.4 (s, C-9), 199.1 (d, C-9')

➤ Obtención de **38**

5-(1,3-ditian-2-il)-1,3-benzodioxol



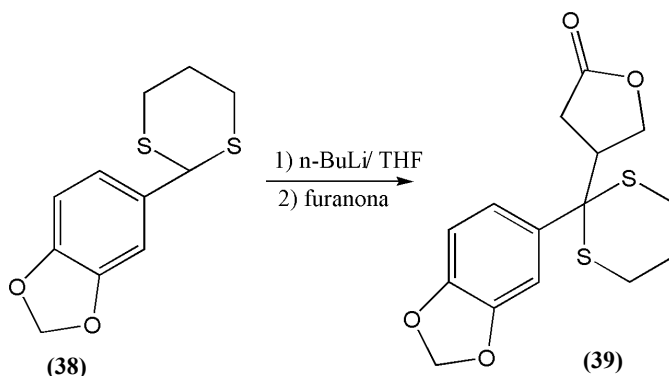
A una disolución de 1 g de piperonal (6.66 mmoles) en 100 ml de ácido acético glacial, se añadieron 0.67 ml (6.67 mmoles) de 1,3-propanoditiol y 40 mg (0.21 mmoles) de ácido *p*-toluensulfónico monohidratado. La mezcla se mantuvo con agitación magnética y a temperatura ambiente durante 1 hora tras lo cual se extrajo la mezcla con AcOEt. La fase orgánica fue lavada en tres ocasiones con una disolución saturada de NaHCO₃ y secada sobre Na₂SO₄ anhidro. El producto fue purificado mediante cromatografía en columna con la mezcla eluyente AcOEt/n-hexano (20:80). Se obtuvo de este modo 1.6 g de un sólido que cristaliza fácilmente en láminas incoloras. Rendimiento=100 %

Compuesto **38**

Punto de fusión:	84°C
UV $\lambda_{\text{máx}}$ (EtOH) nm:	290 (3.48), 243 (3.62), 204 (4.54)
IR $\nu_{\text{máx}}$ (CHCl ₃) cm ⁻¹ :	2937, 2891, 1502, 1480, 1440, 1362, 1245, 1174, 1040, 932, 811, 761
HR-MS:	240.025318 (C ₁₁ H ₁₂ O ₂ S ₂ requiere 240.027873)
MS m/z (%):	240[M] ⁺ (81), 167 (12), 166 (100), 135 (11)
¹ H-NMR (CDCl ₃) δ :	1.82-2.17 (complejo, 2H, 2H-5'), 2.85-3.08 (complejo, 4H, 2H-4' y 2H-6'), 5.08 (s, 1H, H-2'), 5.94 (s, 2H, 2H-2), 6.75 (d, <i>J</i> =6.84 Hz, 1H, H-7), 6.93 (d, <i>J</i> =6.84 Hz, 1H, H-6), 6.98 (s, 1H, H-4)
¹³ C-NMR (CDCl ₃) δ :	25.0 (t, C-5'), 32.1 (d, C-4'+C-6'), 51.1 (s, C-2'), 101.2 (t, C-2), 108.3 (d, C-7), 108.4 (d, C-4), 121.3 (d, C-6), 132.9 (s, C-5), 147.6 (s, C-7a), 147.7 (s, C-3a)

➤ Obtención de **39**

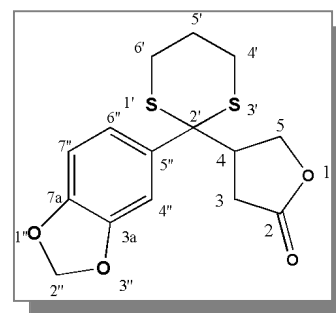
4-[2-(1,3-benzodioxol-5-il)-1,3-ditian-2-il]
dihidro-2(3H)-furanona



En un balón de tres bocas de 250 ml, previamente secado en la estufa a 100°C durante 24 horas, se disolvió 1 g (4.16 mmoles) del ditiano (**38**) en 50 ml de THF seco. La disolución fue enfriada hasta -78°C y mantenida con agitación, bajo atmósfera de nitrógeno seco, tras lo cual se añadió gota a gota 1 equivalente de *n*-BuLi (2.6 ml de *n*-BuLi 1.6 M en disolución de hexano). La mezcla, que adquirió de inmediato un intenso color amarillo, se mantuvo en estas condiciones durante 1 hora, tras lo cual se añadió lentamente 1 equivalente (295 µl) de 2-furanona disuelta en 12 ml de THF seco. La mezcla de reacción se mantuvo a la misma temperatura durante 2 horas, transcurridas las cuales se añadieron 3 ml de ácido acético concentrado, llevándose la mezcla a temperatura ambiente.

La extracción se llevó a cabo con AcOEt, siendo secada la fase orgánica con Na₂SO₄ anhidro. El producto fue purificado por cromatografía en columna, usando como disolvente una mezcla AcOEt/*n*-hexano (20:80). Se obtuvo así 1.21 g del compuesto **39**, lo que supone un rendimiento del 89.6%.

Compuesto 39



UV $\lambda_{\text{máx}}$ (EtOH) nm: 290 (3.46), 248 (3.51), 207 (4.23)

IR $\nu_{\text{máx}}$ (CHCl₃) cm⁻¹: 2907, 1777, 1662, 1602, 1482, 1238, 1175, 1037, 930, 800, 755

HR-MS: 324.050575 (C₁₅H₁₆O₄S₂ requiere 324.049003)

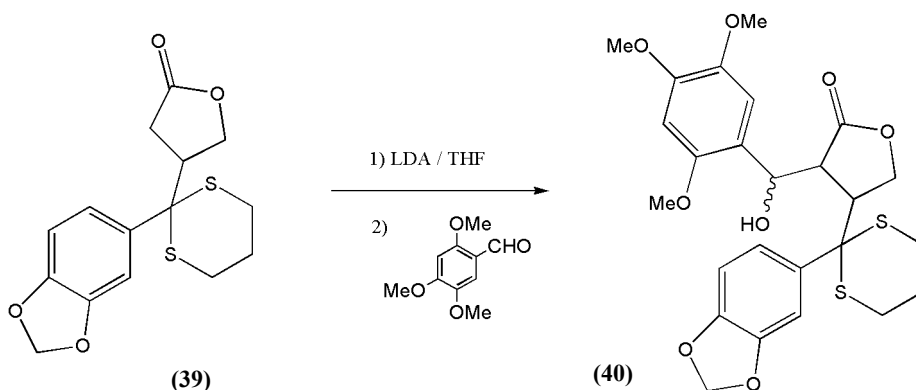
MS m/z (%): 324 [M]⁺ (8), 250 (4), 239 (100), 208 (5), 165 (23), 159 (4)

¹H-NMR (CDCl₃) δ : 1.81-2.01 (complejo, 2H, 2H-5'), 2.43 (dd, $J_1=J_2=8.0$ Hz, 1H, H-3b), 2.68-2.73 (complejo, 4H, 2H-4' + 2H-6'), 2.84 (dd, $J_1=J_2=8.0$ Hz, 1H, H-3a), 3.01 (q, $J=8.0$ Hz, 1H, H-4), 4.19 (dd, $J_1=J_2=8.0$ Hz, 1H, H-5b), 4.41 (dd, $J_1=J_2=8.0$ Hz, 1H, H-5a), 6.01 (s, 2H, 2H-2'), 6.88 (d, $J=8.8$ Hz, 1H, H-7''), 7.46 (m, 2H, H-4'' + H-6'')

¹³C-NMR (CDCl₃) δ : 24.7 (t, C-5'), 27.1 (t, C-4'), 27.1 (t, C-6'), 30.1 (t, C-3), 48.1 (d, C-4), 60.6 (s, C-2'), 68.5 (t, C-5), 101.5 (t, C-2''), 108.3 (d, C-7''), 123.1 (d, C-4''), 127.9 (d, C-6''), 132.9 (s, C-5''), 147.1 (s, C-7a), 148.6 (s, C-3a), 175.7 (s, C-2)

➤ Obtención de 40

4-[2-(1,3-benzodioxol-5-il)-1,3-ditian-2-il]-3-[hidroxi(2,4,5-trimetoxifenil)metil] dihidro-2(3H)-furanona



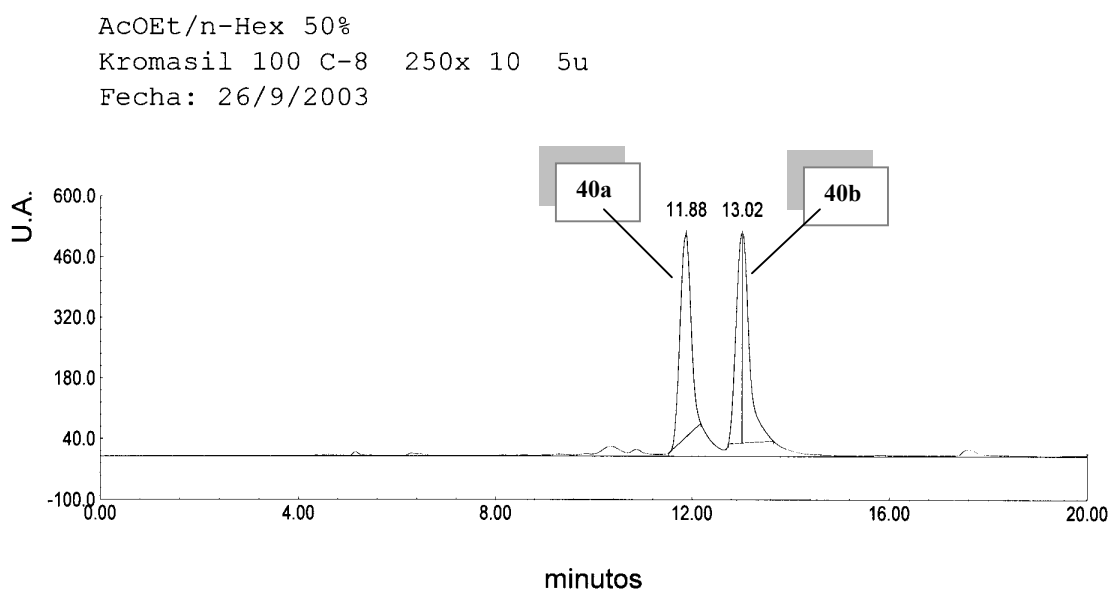
En un balón de tres bocas de 25 ml, previamente secado a la estufa, bajo presión positiva de nitrógeno y con agitación magnética, se añadieron 0.25 ml de diisopropilamina en 4.5 ml de THF seco y se enfrió la mezcla a -78°C , tras lo cual se añadió gota a gota 1 ml de *n*-BuLi 1.6 M en hexano.

Tras 30 minutos y a la misma temperatura fue añadida una disolución de 500 mg (1.54 mmoles) del aducto **39** disuelto en 12 ml de THF, manteniéndose la reacción durante una hora más. Entonces fueron añadidos 1.1 equivalentes de 2,4,5-trimetoxibenzaldehído (325.7 mg) disueltos en 5 ml de THF seco.

Transcurrida una hora se añadieron 0.4 ml de ácido acético y se dejó que la mezcla alcanzara la temperatura ambiente.

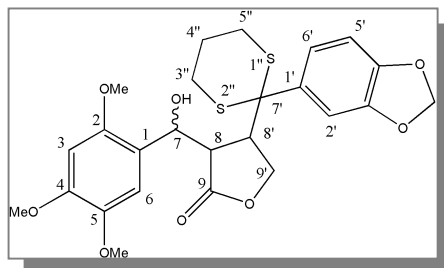
La extracción se llevó a cabo con AcOEt y se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice, usando como eluyente mezclas AcOEt /*n*-hexano (30:70) y (40:60). Se obtuvo así 0.76 g de una mezcla isomérica del compuesto **40**. Rendimiento = 94.81%.

Con el objeto de estudiar individualmente estos diasterómeros se decidió separarlos mediante cromatografía HPLC. La inyección de la mezcla de isómeros en el cromatógrafo dio lugar a un cromatograma con dos picos claramente diferenciados con tiempos de retención de 11.8 y 13.02 minutos en la mezcla AcOEt/*n*-hexano (1:1).



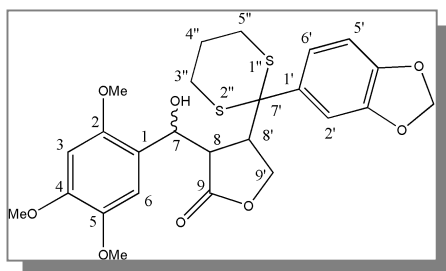
Cromatograma 8. Separación de los diasterómeros del compuesto **40**

Compuesto 40a



- UV $\lambda_{\text{m\acute{a}x}}$ (EtOH) nm: 289 (4.24), 237 (4.33)
- IR $\nu_{\text{m\acute{a}x}}$ (CHCl_3) cm^{-1} : 2937, 1753, 1612, 1514, 1466, 1402, 1207, 1124, 1035, 907, 828, 757
- HR-MS: 520.118881 ($\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{O}_8\text{S}_2$ requiere 520.122562)
- MS m/z (%): 520[M]⁺(6), 324 (8), 239 (100), 197 (44), 181 (13), 165 (31), 125 (7)
- ¹H-NMR (CDCl_3) δ : 1.80-1.90 (complejo, 2H, 2H-4''), 2.44-2.67 (complejo, 4H, 2H-3''+2H-5''), 2.83 (d, $J=7.9$ Hz, 1H, H-8'), 3.11 (s, 1H, H-8), 3.86 (s, 3H, -OMe), 3.89 (s, 3H, -OMe), 3.72 (s, 3H, -OMe), 4.31 (t, $J=9.5$ Hz, 1H, H-9'b), 4.87 (d, $J=9.5$ Hz, 1H, H-9'a), 5.34 (s ancho, 1H, H-7), 5.95 (d, $J=6.8$ Hz, 2H, -OCH₂O-), 6.27 (s, 1H, H-3), 6.55 (d, $J=8.2$ Hz, 1H, H-5'), 6.84 (s, 1H, H-6), 7.10 (s, 1H, H-2'), 7.17 (d, $J=8.2$ Hz, 1H, H-6')
- ¹³C-NMR (CDCl_3) δ : 24.5 (t), 26.6 (t), 27.1 (t), 47.3 (d), 48.2 (d), 55.4 (q), 56.1 (q), 56.9 (q), 63.0 (s), 69.8 (d), 70.0 (t), 96.7 (d), 101.4 (t), 107.3 (d), 109.3 (d), 111.0 (d), 119.6 (s), 123.1 (d), 132.8 (s), 142.9 (s), 146.5 (s), 147.8 (s), 149.1 (s), 149.7 (s), 178.5 (s)

Compuesto 40b



UV $\lambda_{\text{m\acute{a}x}}$ (EtOH) nm: 289 (4.24), 237 (4.33)

IR $\nu_{\text{m\acute{a}x}}$ (CHCl₃) cm⁻¹: 2937, 1753, 1612, 1514, 1466, 1402, 1207, 1124, 1035, 907, 828, 757

HR-MS: 520.126022 (C₂₅H₂₈O₈S₂ requiere 520.122562)

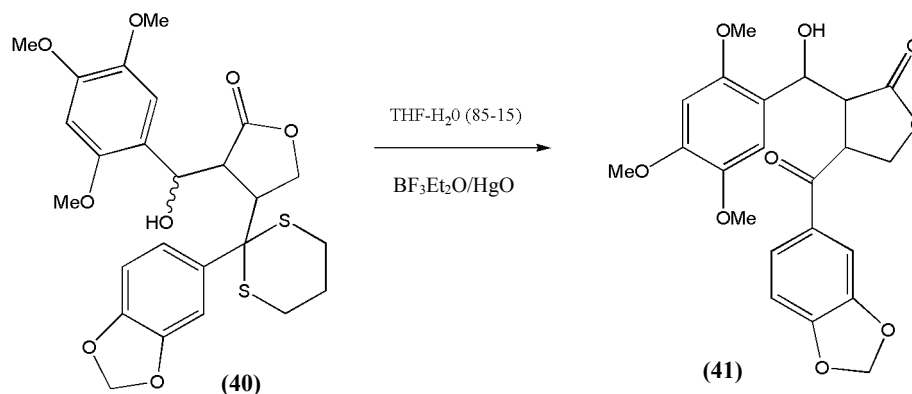
MS m/z (%): 520[M]⁺(4), 324 (7), 239 (100), 197 (37), 181(13), 165 (30), 125 (6)

¹H-NMR (CDCl₃) δ : 1.82-1.86 (complejo, 2H, 2H-4''), 2.52-2.69 (complejo, 4H, 2H-3''+2H-5''+H-8'), 2.86 (d, *J*=5.4 Hz, 1H, H-8), 3.74 (s, 3H, -OMe), 3.79 (s, 3H, -OMe), 3.89 (s, 3H, -OMe), 4.30 (t, *J*=7.1 Hz, 1H, H-9'a), 4.87 (d, *J*=7.1 Hz, 1H, H-9'b), 5.05 (d, *J*=6.0 Hz, 1H, H-7), 6.00 (d, *J*=27 Hz, 2H, -OCH₂O-), 6.44 (s, 1H, H-3), 6.61 (s, 1H, H-6), 6.68 (d, *J*=6.0 Hz, 1H, H-5'), 6.94 (s, 1H, H-2'), 7.31 (d, *J*=6.0 Hz, 1H, H-6')

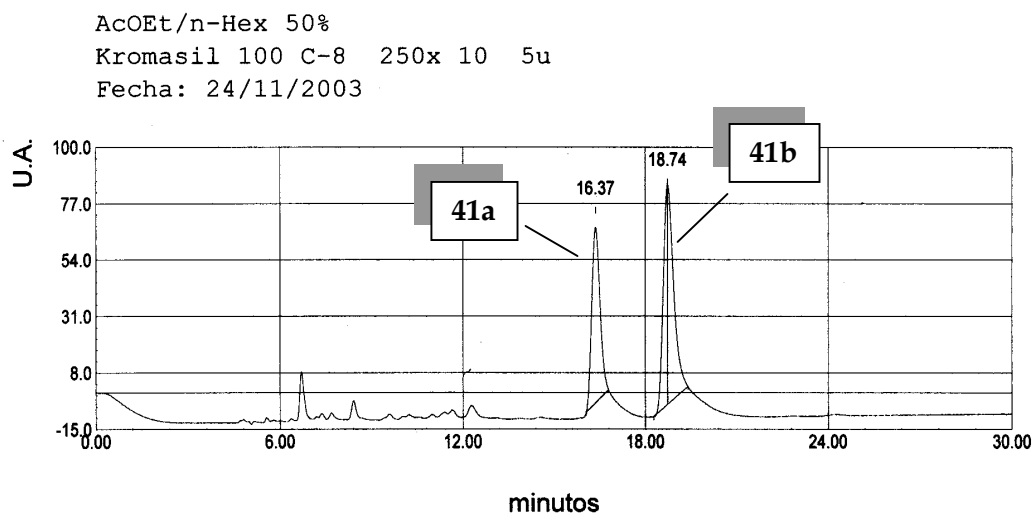
¹³C-NMR (CDCl₃) δ : 24.4 (t), 26.8 (t), 27.1 (t), 49.2 (d), 50.6 (d), 55.9 (q), 55.9 (q), 56.3 (q), 62.5 (s), 68.1 (d), 69.0 (t), 96.7(d), 101.8(t), 107.1(d), 108.8 (d), 109.9 (d), 119.2 (s), 123.4 (d), 132.4 (s), 143.4 (s), 147.0 (s), 148.5 (s), 149.2 (s), 150.3 (s), 177.6 (s).

➤ Obtención de **41**

4-(Benzo[1,3]dioxol-5-carbonil)-3-[hidroxi-(2,4,5-trimetoxi-fenil)-metil]-dihidro-furan-2-ona

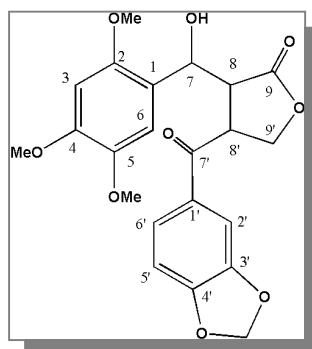


0.6 ml de $\text{BF}_3\text{Et}_2\text{O}$ y HgO (1.0 g) se añadieron a una disolución de 0.76 g de la mezcla isomérica del compuesto **40** en 32 ml de $\text{THF-H}_2\text{O}$ (85:15). Tras 2 horas y 30 minutos de agitación a temperatura ambiente se detuvo la reacción mediante la adición de 76 ml de diclorometano y la suspensión fue filtrada a través de celita, lavando con porciones de CH_2Cl_2 . La fase orgánica se lavó dos veces con una disolución saturada de NaHCO_3 y dos veces con salmuera, para ser finalmente secada sobre Na_2SO_4 anhidro. Tras la eliminación del disolvente a vacío se obtuvieron 0.53 g (1.23 mmoles) de la mezcla diastereomérica de **41**. Rendimiento = 84.25%. La inyección del crudo de reacción en el cromatógrafo de HPLC, con la mezcla eluyente AcOEt/n-hexano al 50%, permitió separar dos productos con t_R de 16.37 y 18.74 minutos.

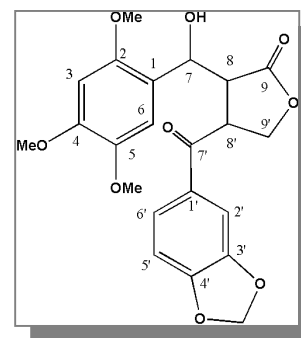


Cromatograma 9. Separación de diastereómeros de **41**

Compuesto 41a



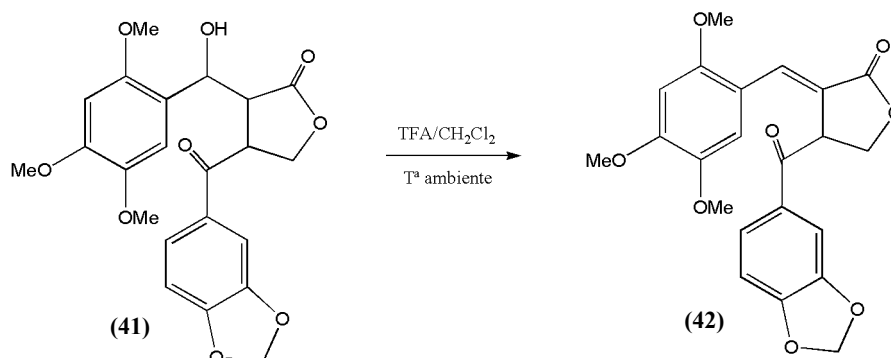
- UV $\lambda_{\text{máx}}$ (EtOH) nm: 294 (4.07), 239 (4.19)
- IR $\nu_{\text{máx}}$ (CHCl₃) cm⁻¹: 1767, 1672, 1605, 1506, 1443, 1253, 1205, 1032, 929, 869, 752
- HR-MS: 430.124199 (C₂₂H₂₂O₉ requiere 430.126383)
- MS m/z (%): 430 [M]⁺ (20), 412 (14), 263 (50), 197 (100), 149 (99), 121 (16), 65 (14)
- ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 2.68 (d, 1H, C₇-OH), 3.63 (s, 3H, C₂-OMe), 3.75 (s, 3H, C₄-OMe), 3.80 (s, 3H, C₅-OMe), 3.92 (dd, $J_1=8.7$ Hz, $J_2=3.0$ Hz, 1H, H-8), 4.12 (t, $J=8.0$ Hz, 1H, H-9'a), 4.40 (q, $J=8.5$ Hz, 1H, H-8'), 4.51 (t, $J=8.5$ Hz, 1H, H-9'b), 5.56 (s ancho, 1H, H-7), 6.03 (s, 2H, -OCH₂O-), 6.34 (s, 1H, H-3), 6.75 (d, $J=8.2$ Hz, 1H, H-5'), 6.90 (s, 1H, H-6), 7.04 (s, 1H, H-2'), 7.20 (d, $J=8.2$ Hz, 1H, H-6')
- ¹³C-NMR (CDCl₃) δ : 42.4 (d, C-8'), 49.6 (d, C-8), 55.8 (q, C₅-OCH₃), 56.0 (q, C₄-OCH₃), 56.2 (q, C₂-OCH₃), 66.4 (d, C-7), 68.9 (t, C-9'), 96.8 (d, C-3), 102.0 (t, -OCH₂O-), 107.7 (d, C-5'), 107.7 (d, C-2'), 110.0 (d, C-6), 119.7 (s, C-1), 124.4 (d, C-6'), 130.4 (s, C-1'), 142.8 (s, C-5), 148.3 (s, C-3'), 149.0 (s, C-2), 149.7 (s, C-4), 152.3 (s, C-4'), 176.8 (s, C-9), 194.8 (s, C-7')

Compuesto **41b**

- UV $\lambda_{\text{máx}}$ (EtOH) nm: 294 (4.07), 239 (4.19)
- IR $\nu_{\text{máx}}$ (CHCl₃) cm⁻¹: 1767, 1672, 1605, 1506, 1443, 1253, 1205, 1032, 929, 869, 752
- HR-MS: 430.123238 (C₂₂H₂₂O₉, requiere 430.126383)
- MS m/z (%): 430 [M]⁺ (9), 412 (25), 263 (52), 197 (52), 149 (100), 121 (15), 65(11)
- ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 3.59 (t, *J*=8.8 Hz, 1H, H-8), 3.71 (s, 3H, -OMe), 3.75 (s, 3H, -OMe), 3.81 (s, 3H, -OMe), 4.10-4.25 (complejo, 2H, H-9'a + H-8'), 4.48 (t, *J*=7.5 Hz, 1H, H-9'b), 5.32 (d, *J*=8.7 Hz, 1H, H-7), 6.03 (s, 2H, -OCH₂O-), 6.07 (s, 1H, H-3), 6.75 (d, *J*=8.2 Hz, 1H, H-5'), 6.86 (s, 1H, H-6), 7.05 (s, 1H, H-2'), 7.16 (d, *J*=8.2 Hz, 1H, H-6')
- ¹³C-NMR (CDCl₃) δ : 44.7 (d, C-8'), 50.9 (d, C-8), 55.9 (q, -OCH₃), 56.2 (q, -OCH₃), 56.4 (q, -OCH₃), 67.4 (d, C-7), 69.0 (t, C-9'), 96.8 (d, C-3), 102.0 (t, -OCH₂O), 107.6 (d, C-5'), 107.8 (d, C-2'), 111.2 (d, C-6), 118.8 (s, C-1), 124.4 (d, C-6'), 130.5 (s, C-1'), 143.7 (s, C-5), 150.2 (s, C-2), 167.9 (s, C-4'), 170.7 (s, C-4), 172.1 (s, C-3'), 178.0 (s, C-9), 194.0 (s, C-7')

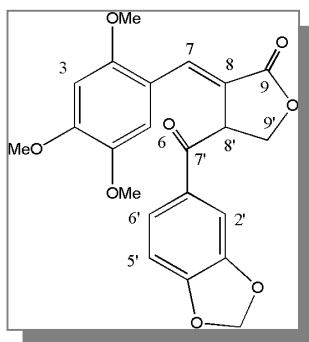
➤ Obtención de **42**

4-(benzo[1,3]dioxol-5-carbonil)-3-(2,4,5-trimetoxibenciliden)-dihidro-furan-2-ona

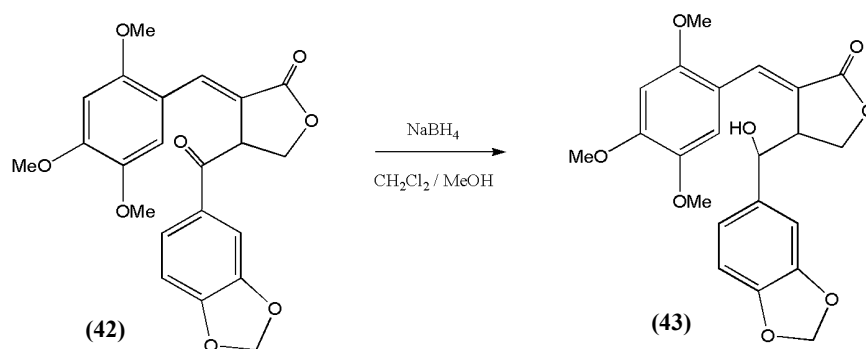


Se añadió gota a gota 2.5 ml de ácido trifluoroacético (TFA) a la suspensión de la mezcla isomérica del compuesto **41** (530 mg) en 40 ml de CH₂Cl₂, tras lo cual el producto se disolvió de inmediato. Se mantuvo la mezcla con agitación y a temperatura ambiente durante 30 minutos, trascurridos los cuales se extrajo del modo habitual con AcOEt, se lavó 3 veces con una disolución saturada de NaHCO₃ y se secó sobre Na₂SO₄ anhidro. Después de que el disolvente fuera eliminado a vacío, se obtuvieron 500 mg de **42** (rendimiento=98.66 %), un compuesto de color amarillo y fluorescente a la luz ultravioleta.

Compuesto **42**

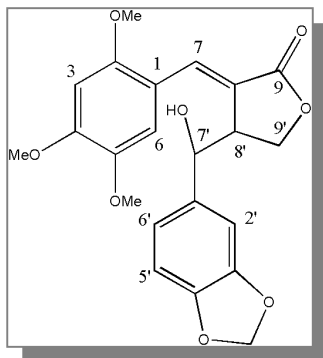


- UV $\lambda_{\text{m\acute{a}x}}$ (EtOH) nm: 301 (4.75), 236 (4.81)
- IR $\nu_{\text{m\acute{a}x}}$ (CHCl₃) cm⁻¹: 1747, 1674, 1606, 1510, 1442, 1284, 1248, 1035, 755
- HR-MS: 412.118057 (C₂₂H₂₀O₈ requiere 412.115818)
- MS m/z (%): 412[M]⁺ (37), 363 (7), 263 (47), 197 (12), 168 (8), 149 (100), 121 (13)
- ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 3.42 (s, 3H, -OMe), 3.80 (s, 3H, -OMe), 3.88 (s, 3H, -OMe), 4.32 (dd, $J_1=4.1$ Hz, $J_2=9.2$ Hz, 1H, H-9'a), 4.68 (t, $J=9.4$ Hz, 1H, H-9'b), 5.05-5.10 (m, 1H, H-8'), 6.07 (s, 2H, -OCH₂O-), 6.43 (s, 1H, H-3), 6.62 (s, 1H, H-6), 6.88 (d, $J=8.2$ Hz, 1H, H-5'), 7.38 (d, $J=1.5$ Hz, 1H, H-2'), 7.49 (dd, $J_1=1.5$ Hz, $J_2=8.2$ Hz, 1H, H-6'), 8.10 (d, $J=2.1$ Hz, 1H, H-7)
- ¹³C-NMR (CDCl₃) δ : 47.4 (d), 55.8 (q, -OCH₃), 56.0 (q, -OCH₃), 56.3 (q, -OCH₃), 67.5 (t, C-9), 102.2 (t, -OCH₂O-), 96.8 (d), 108.2 (d), 108.2 (d), 111.9 (d), 114.4 (s), 119.7 (s), 124.7 (d), 129.8 (s), 135.2 (d), 142.9 (s), 148.8 (s), 152.1 (s), 152.6 (s), 154.1 (s), 171.9 (s, C-9), 193.7 (s, C-7')

➤ Obtención de **43**4-(Benzo[1,3]dioxol-5-il-hidroxi-metil)-3-(2,4,5-trimetoxi-benciliden)-
dihidro-furan-2-ona

En un balón de 50 ml se disolvieron 450 mg del compuesto **42** en 14 ml de CH₂Cl₂/MeOH (1:1) y se enfrió la mezcla a 0°C. A continuación se añadieron 3 equivalentes de NaBH₄ (0.12 g) y se mantuvo la reacción durante 30 minutos, tras los cuales y manteniendo dicha temperatura, se añadió lentamente agua destilada. La mezcla de reacción se extrajo con CH₂Cl₂ secándose la fase orgánica con Na₂SO₄ anhidro. Tras eliminar el disolvente se obtuvieron 452 mg (rendimiento 100%) de un sólido de color amarillo (**43**).

Compuesto 43



UV $\lambda_{\text{m\acute{a}x}}$ (EtOH) nm: 291 (5.38), 237 (5.39), 229 (5.40)

IR $\nu_{\text{m\acute{a}x}}$ (CHCl₃) cm⁻¹: 3012, 2909, 1741, 1608, 1507, 1407, 1209, 1035, 930, 753

HR-MS: 414.133110 (C₂₂H₂₂O₈ requiere 414.131468)

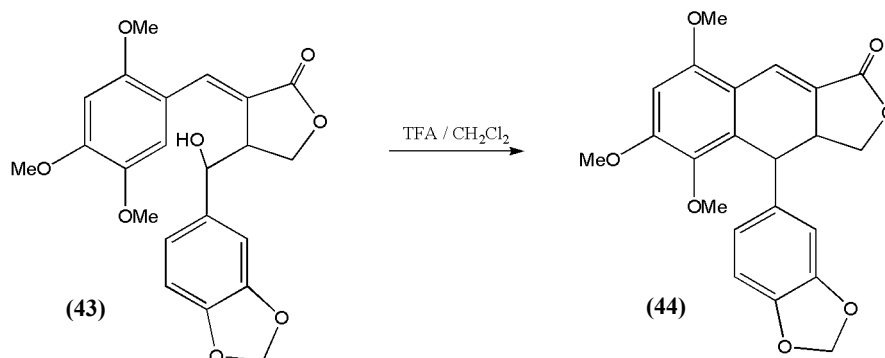
MS m/z (%): 414 [M]⁺ (99), 396 (17), 383 (56), 355 (12), 264 (65), 236 (32), 205 (21), 189 (31), 168 (43), 151 (47), 149 (100), 135 (20), 93 (26)

¹H-NMR (CDCl₃) δ : 3.84 (m, 1H, H-8'), 3.91 (s, 3H, -OCH₃), 3.93 (s, 3H, -OMe), 3.96 (s, 3H, -OCH₃), 4.20 (t, *J*=8.1 Hz, 1H, H-9'a), 4.36 (d, *J*=9.5 Hz, 1H, H-9'b), 4.88 (d, *J*=6.2 Hz, 1H, H-7'), 5.93 (s, 2H, -OCH₂O-), 6.52 (s, 1H, H-3), 6.71 (s, 2H, H-6'+H-2'), 6.76 (s, 1H, H-5'), 7.44 (s, 1H, H-6), 8.05 (s, 1H, H-7)

¹³C-NMR (CDCl₃) δ : 45.6 (d), 56.0 (q), 56.4 (q), 56.7 (q), 66.8 (t), 74.0 (d), 96.8 (d), 101.1 (t), 106.7 (d), 108.1 (d), 112.2 (d), 114.5 (s), 116.4 (s), 120.0 (d), 122.1 (s), 134.0 (d), 143.0 (s), 147.6 (s), 147.9 (s), 152.2 (s), 154.4 (s), 172.6 (s)

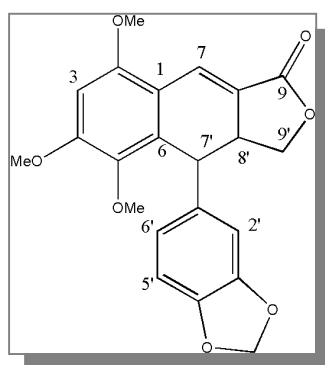
➤ Obtención de 44

4-Benzo[1,3]dioxol-5-il-5,6,8-trimetoxi-3a,4-dihidro-3H-naftol[2,3-c]furan-1-ona



600 mg (1.45 mmoles) del producto **43** fueron disueltos en 25 ml de benceno y a continuación se añadió gota a gota 1.6 ml de TFA. La mezcla fue mantenida a reflujo durante 1 hora y luego se extrajo con AcOEt. La fase orgánica se lavó 3 veces con NaHCO₃ y se secó sobre Na₂SO₄ anhidro. Se obtuvieron 0.534 g (1.35 mmoles, rendimiento 93%) del compuesto **44**, que tras ser inyectado en el cromatógrafo de HPLC y eluído con la mezcla AcOEt/*n*-hexano 1:1, dio lugar a un cromatograma con un solo pico y *t*_R=8.30 minutos.

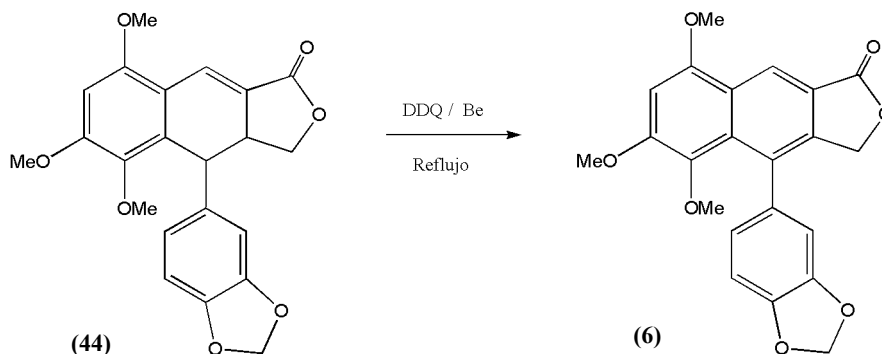
Compuesto **44**



- UV $\lambda_{\text{m\acute{a}x}}$ (EtOH) nm: 358 (3.87), 293 (3.81)
- IR $\nu_{\text{m\acute{a}x}}$ (CHCl₃) cm⁻¹: 2938, 1749, 1588, 1486, 1465, 1206, 1179, 1037, 753
- HR-MS: 396.120209 (C₂₂H₂₀O₇ requiere 296.120903)
- MS m/z (%): 396 [M]⁺ (100), 365 (25), 335 (9), 289 (6)
- ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 3.14 (s, 3H, -OMe), 3.85 (s, 3H, -OMe), 3.88 (s, 3H, -OMe), 3.63-3.96 (complejo, 3H, H-9'a + H-7' + H-8'), 4.31 (t, *J*=8.8 Hz, 1H, H-9'b), 5.92 (s ancho, 2H, -OCH₂O-), 6.50 (s, 1H, H-3), 6.71 (s, 3H, H-2'+H-5'+H-6'), 7.81 (s, 1H, H-7)
- ¹³C-NMR (CDCl₃) δ : 43.2 (d), 49.0 (d), 55.8 (q), 56.2 (q), 59.8 (q), 72.2 (t), 95.6 (d), 100.9 (t), 107.5 (d), 108.0 (d), 115.8 (s), 119.9 (d), 121.7 (s), 127.7 (d), 132.2 (s), 137.8 (s), 141.8 (s), 146.1 (s), 147.9 (s), 155.0 (s), 156.9 (s), 170.2 (s)

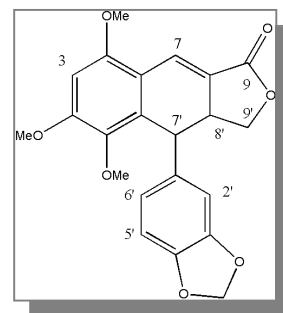
➤ Obtención de 6

4-Benzo[1,3]dioxol-5-il-5,6,8-trimetoxi-3H-nafto[2,3-c]-furan-1-ona



Una mezcla de **44** (10 mg) y 2,3-dicloro-5,6-dicianobenzoquinona (DDQ) (25 mg) en benceno seco (10 ml) se mantuvo a reflujo durante 2 horas. Tras enfriar la mezcla se eliminó el disolvente a vacío. El crudo se extrajo con AcOEt y se secó sobre Na₂SO₄ anhidro. Tras ser purificado por HPLC, el compuesto **6** fue aislado con un rendimiento aproximado del 44%, junto a trazas de justicidona.

Compuesto 6

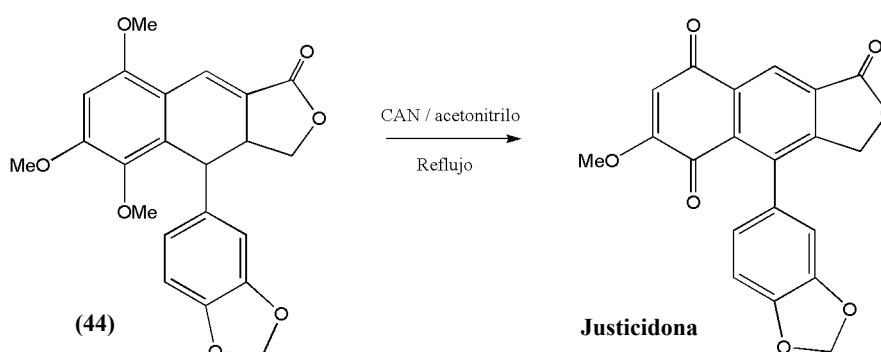


HR-MS: 394.098274 (C₂₂H₁₈O₇ requiere 394.105253)

MS m/z (%): 394[M]⁺ (92), 379 (24), 367 (60), 349 (68), 333 (8), 321 (18), 158 (30), 102 (100)

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 3.22 (s, 3H, -OMe), 4.04 (s, 3H, -OMe), 4.06 (s, 3H, -OMe), 5.09 (q, J=15.2 Hz, 2H, H-9'a+H-9'b), 6.02 (s ancho, 2H, -OCH₂O-), 6.74-6.87 (4H, H-2'+H-5'+H-6'+H-3), 8.91 (s, 1H, H-7)

➤ Obtención de la justicidona



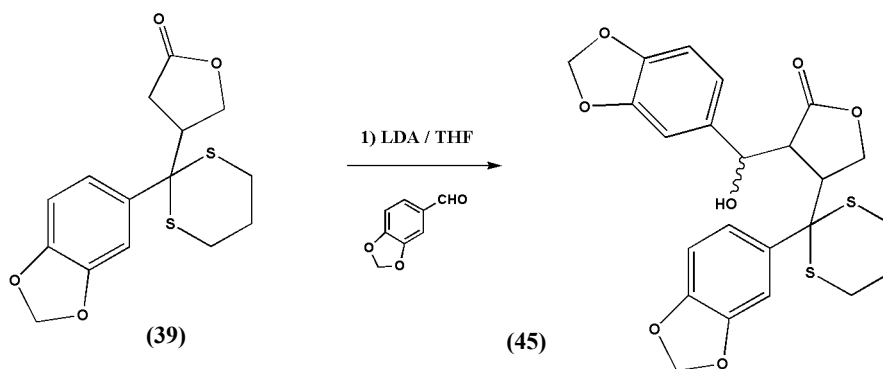
Se disolvieron 200 mg del compuesto **44** en 150 ml de acetonitrilo y una vez calentada la mezcla hasta llegar cerca del punto de ebullición del disolvente (80°C) se añadió 3 equivalentes (0.91g) de $(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{NO}_3)_6$ disuelto en la mínima cantidad de agua (2 ml) y se mantuvo la mezcla a reflujo durante 30 minutos.

Una vez enfriada, el crudo de reacción fue vertido sobre AcOEt/agua. La fase orgánica fue lavada 5 veces con agua destilada con el objeto de eliminar bien el CAN y una vez concentrada, se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se llevó a sequedad.

El crudo fue cromatografiado en una columna de gel de sílice que fue eluída con acetato de etilo/n-hexano (40:60). Se obtuvieron de este modo 100 mg de un compuesto cuyos datos espectroscópicos fueron idénticos a los de la justicidona (rendimiento= 54.4%).

➤ Obtención de **45**

4-[2-(1,3-benzodioxol-5-il)-1,3-ditian-2-il]-3-[1,3-benzodioxol-5-il(hidroxi)metil] dihidro-2(3H)-furanona



En un balón previamente flameado, bajo presión positiva de nitrógeno y con agitación magnética, fueron añadidos 0.22 ml de diisopropilamina en 4.0 ml de THF seco y se enfrió la mezcla a -78°C tras lo cual, se añadió gota a gota 0.9 ml de *n*-BuLi 1.6 M en hexano. Tras 30 minutos y a la misma temperatura se añadió una disolución de 450 mg (1.39 mmoles) del aducto **39** disuelto en 10 ml de THF.

Tras una hora se añadieron 210 mg de piperonal disueltos en 5 ml de THF seco y se mantuvo la reacción durante una hora, añadiéndose entonces 0.4 ml de ácido acético glacial y dejando que la mezcla alcanzase la temperatura ambiente. La extracción se llevó a cabo con acetato de etilo, purificándose el crudo de reacción mediante cromatografía en columna de gel de sílice y empleando como eluyente la mezcla AcOEt/*n*-hexano al 25%. Se obtuvo de este modo 510 mg (rendimiento=77.4%) de la mezcla diastereomérica de **45**.

Compuesto **45**

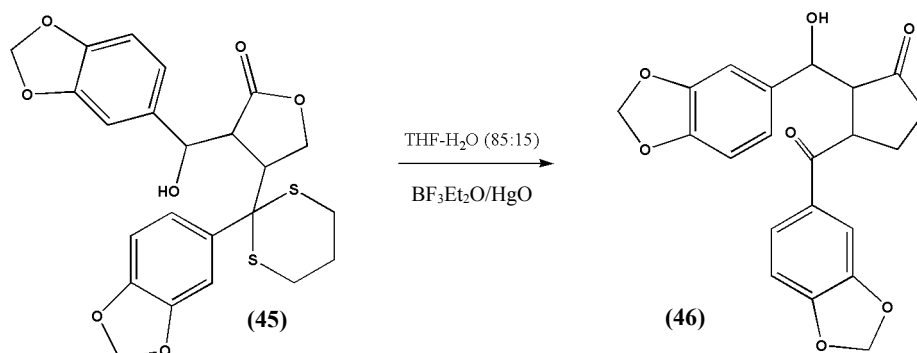
IR $\nu_{\text{máx}}$ (CHCl_3) cm^{-1} : 418, 755, 868, 932, 1039, 1239, 1444, 1483, 1764, 2905, 3477

HR-MS: 474.080697 ($\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{O}_7\text{S}_2$ requiere 474.080697)

MS m/z (%): 474 $[\text{M}]^+$ (1), 456 (1), 381 (1), 324 (7), 239 (100), 165 (25), 149 (39)

➤ Obtención de **46**

4-(1,3-benzodioxol-5-ilcarbonil)-3-[1,3-benzodioxol-5-il(hidroxi)metil]
dihidro-2(3H)-furanona



A una disolución de 500 mg de la mezcla diastereomérica de **45** en 22 ml de THF-H₂O (85:15), se añadieron 0.43 ml de BF₃Et₂O y 0.72 g de HgO. Tras 2 horas y 30 minutos de agitación a temperatura ambiente se añadieron 55 ml de CH₂Cl₂ con el objeto de detener la reacción. La suspensión resultante fue filtrada a través de celita, lavando con porciones de CH₂Cl₂. La fase orgánica se lavó dos veces con una disolución saturada de NaHCO₃, dos veces con una disolución saturada de NaCl y finalmente se secó sobre Na₂SO₄ anhidro. Tras la eliminación del disolvente a vacío se obtuvieron 332 mg de la mezcla diastereomérica de **46**. Rendimiento= 82%.

Compuesto **46**

UV λ_{máx} (EtOH) nm: 289 (4.24), 237 (4.33)

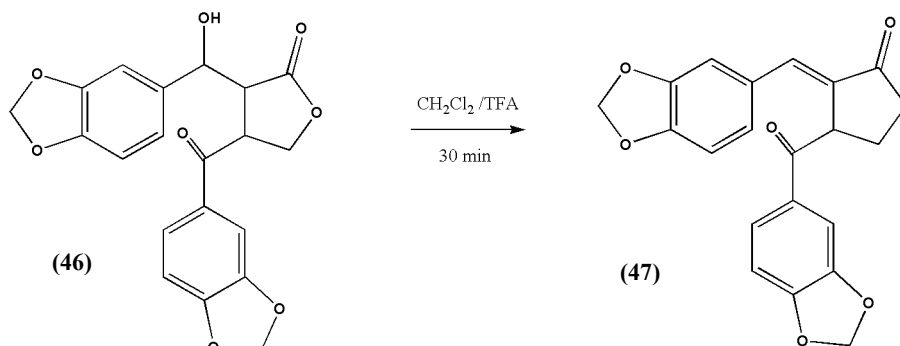
IR ν_{máx} (CHCl₃) cm⁻¹: 407, 750, 812, 931, 1254, 1503, 1604, 1764, 2905

HR-MS: 384.084518 (C₂₀H₁₆O₈ requiere 384.084518)

MS m/z (%): 384 [M]⁺ (6), 234 (6), 208 (12), 190 (5), 149 (100), 121 (17), 93 (12)

➤ Obtención de **47**

(3E)-4-(1,3-benzodioxol-5-ilcarbonil)-3-(1,3-benzodioxol-5-ilmetilén)
dihidro-2(3H)-furanona



2 ml de TFA fueron añadidos gota a gota a 260 mg de la mezcla isomérica del compuesto **46** en 30 ml de CH₂Cl₂. Se mantuvo la mezcla con agitación y temperatura ambiente durante 30 minutos, transcurridos los cuales se extrajo de modo ordinario con acetato de etilo, se lavó 3 veces con una disolución saturada de NaHCO₃ anhidro y se secó sobre Na₂SO₄ anhidro. El crudo fue cromatografiado en columna de gel de sílice obteniéndose 200 mg del compuesto **47** (rendimiento = 81%).

UV λ_{máx} (EtOH) nm: 319 (4.71), 280 (4.68)

IR ν_{máx} (CHCl₃) cm⁻¹: 414, 755, 929, 1036, 1182, 1251, 1444, 1602, 1750, 2909

HR-MS (FAB) 389.062647 (C₂₀H₁₄O₇Na requiere 389.063723)

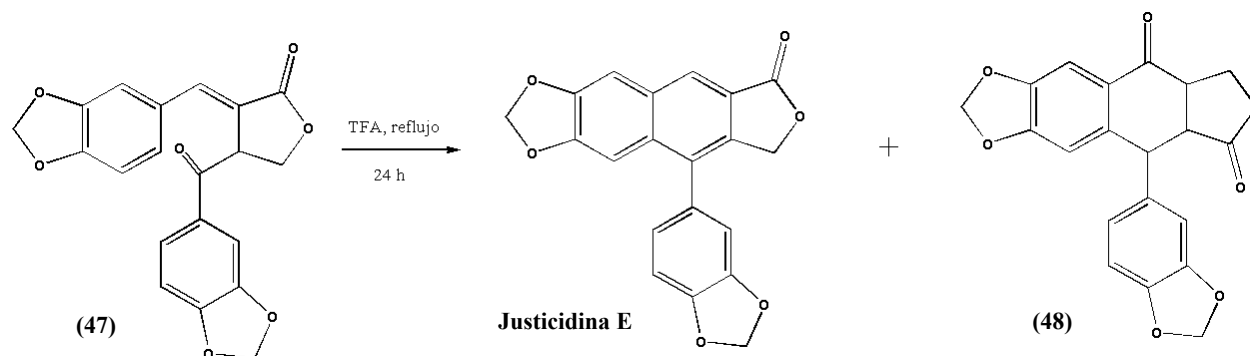
MS m/z (%): 366 [M]⁺ (11), 149 (100), 121 (28), 91 (6), 65 (16)

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 4.37 (dd, J₁=5.6 Hz, J₂=3.6 Hz, 1H, H-9'a), 4.70 (t, J=9.3 Hz, 1H, H-9'b), 5.08 (complejo, 1H, H-8'), 5.94 (s, 2H, -OCH₂O-), 6.09 (s, 2H, -OCH₂O-), 6.74 (complejo, 2H, H-2 + H-5), 6.88 (d, J=10.0 Hz, 1H, H-5'), 6.91 (d, J=8.3 Hz, 1H, H-6), 7.39 (s, 1H, H-2'), 7.51 (d, J=10.0 Hz, 1H, H-6'), 7.72 (s, 1H, H-7)

¹³C-NMR (CDCl₃) δ: 46.6 (d, C-8'), 67.6 (t, C-9'), 101.6 (t, -OCH₂O-), 102.3 (t, -OCH₂O-), 108.3 (d, C-5'), 108.3 (d, C-2), 108.7 (d, C-2'), 108.9 (d, C-5), 120.4 (s, C-1'), 124.8 (d, C-6'), 126.0 (d, C-6), 128.0 (s, C-8), 129.7 (s, C-1), 140.0 (d, C-7), 148.2 (s, C-3'), 148.9 (s, C-4'), 149.5 (s, C-4), 152.8 (s, C-3), 171.5 (s, C-9), 194.4 (s, C-7')

➤ Obtención de **Justicidina E** y compuesto **48**

(9-(1,3-benzodioxol-5-il)-5a,6,8a,9-tetrahidrofuro[3',4':6,7]nafto[2,3-d]
[1,3]dioxol-5,8-diona)

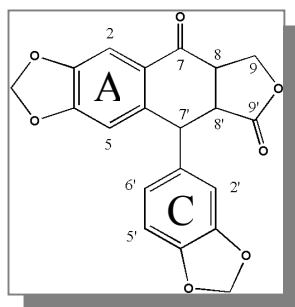


200 mg (0.55 mmoles) del compuesto **47** se disolvieron en TFA y se mantuvo la mezcla a refluxo durante 24 horas. La extracción se llevó a cabo con acetato de etilo, lavándose la fase orgánica con agua destilada, tres veces con una disolución saturada de NaHCO_3 y finalmente de nuevo con agua destilada para luego ser secada sobre Na_2SO_4 anhidro. Una vez llevado a sequedad el crudo fue cromatografiado en columna de gel de sílice obteniéndose 144 mg (0.41 mmoles) de Justicidina E (rendimiento=75.2%).

También se obtuvieron trazas de los compuestos **48** (9-(1,3-benzodioxol-5-il)-5a,6,8a,9-tetrahidrofuro[3',4':6,7]nafto[2,3-d][1,3]dioxol-5,8-diona) y **49** (9-(3,4-dihidroxifenil)-5a,6,8a,9-tetrahidrofuro[3',4':6,7]nafto[2,3-d][1,3]dioxol-5,8-diona).

Al compuesto **49**, disuelto en la mínima cantidad de piridina, le fueron añadidas unas gotas de anhídrido acético. Tras 2 horas, se adicionó metanol y se eliminaron los disolventes a vacío. Se obtuvo así el compuesto **50**, derivado acetilado de **49**.

Compuesto 48

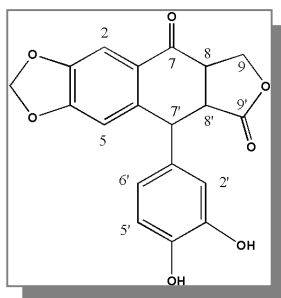


- UV $\lambda_{\text{máx}}$ (EtOH) nm: 285 (3.64), 325 (3.54)
- IR $\nu_{\text{máx}}$ (CHCl₃) cm⁻¹: 757, 1037, 1262, 1480, 1615, 1667, 1772, 2852, 2922
- HR-MS: 366.074043 (C₂₀H₁₄O₇ requiere 366.073953)
- MS m/z (%): 366 [M]⁺ (46), 321 (100), 293 (6), 281 (11), 196 (11), 149 (13)
- ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 3.27 (d, $J=3.30$ Hz, 2H, H-8 + H-8'), 4.34 (m, 1H, H-9a), 4.68 (s, 1H, H-7'), 4.76 (d, $J=9.18$ Hz, 1H, H-9b), 5.93 (s, 2H, -OCH₂O- anillo C), 6.03 (s, 2H, -OCH₂O- anillo A), 6.50 (complejo, 2H, H-2' + H-5'), 6.65 (s, 1H, H-5), 6.72 (d, $J=8.49$ Hz, 1H, H-6'), 7.49 (s, 1H, H-2)
- ¹³C-NMR (CDCl₃) δ : 42.7 (d, C-7'), 43.3 (d, C-8'), 46.7 (d, C-8), 70.5 (t, C-9), 101.3 (t, -OCH₂O- anillo C), 102.2 (t, -OCH₂O- anillo A), 106.1 (d, C-2), 107.9 (d, C-2'), 108.7 (d, C-6'), 109.4 (d, C-5), 120.8 (d, C-5'), 127.2 (s, C-1) 136.3 (s, C-1'), 139.9 (s, C-6), 146.9 (s, C-3'*), 148.3 (s, C-3*), 148.4 (s, C-4), 153.8 (s, C-4'), 175.5 (s, C-9'), 193.4 (s, C-7)

* C-3' y C-4' pueden ser intercambiables.

* C-3 y C-4 pueden ser intercambiables.

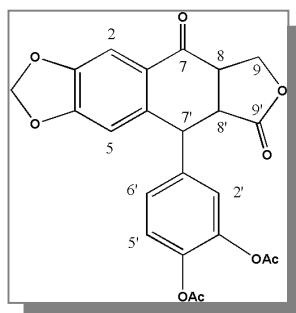
Compuesto 49



MS m/z (%): 354 [M]⁺ (37), 336 (7), 309 (100), 269 (17), 241 (5)

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 3.27 (d, J=2.90 Hz, 2H, H-8 + H-8'), 4.33 (m, 1H, H-9a), 4.65 (s, 1H, H-7'), 4.75 (d, J=9.19 Hz, 1H, H-9b), 6.03 (s, 2H, -OCH₂O-), 6.48-6.52 (m, 2H, H-2' + H-5'), 6.65 (s, 1H, H-5), 6.78 (d, J=7.98 Hz, 1H, H-6'), 7.48 (s, 1H, H-2)

Compuesto 50

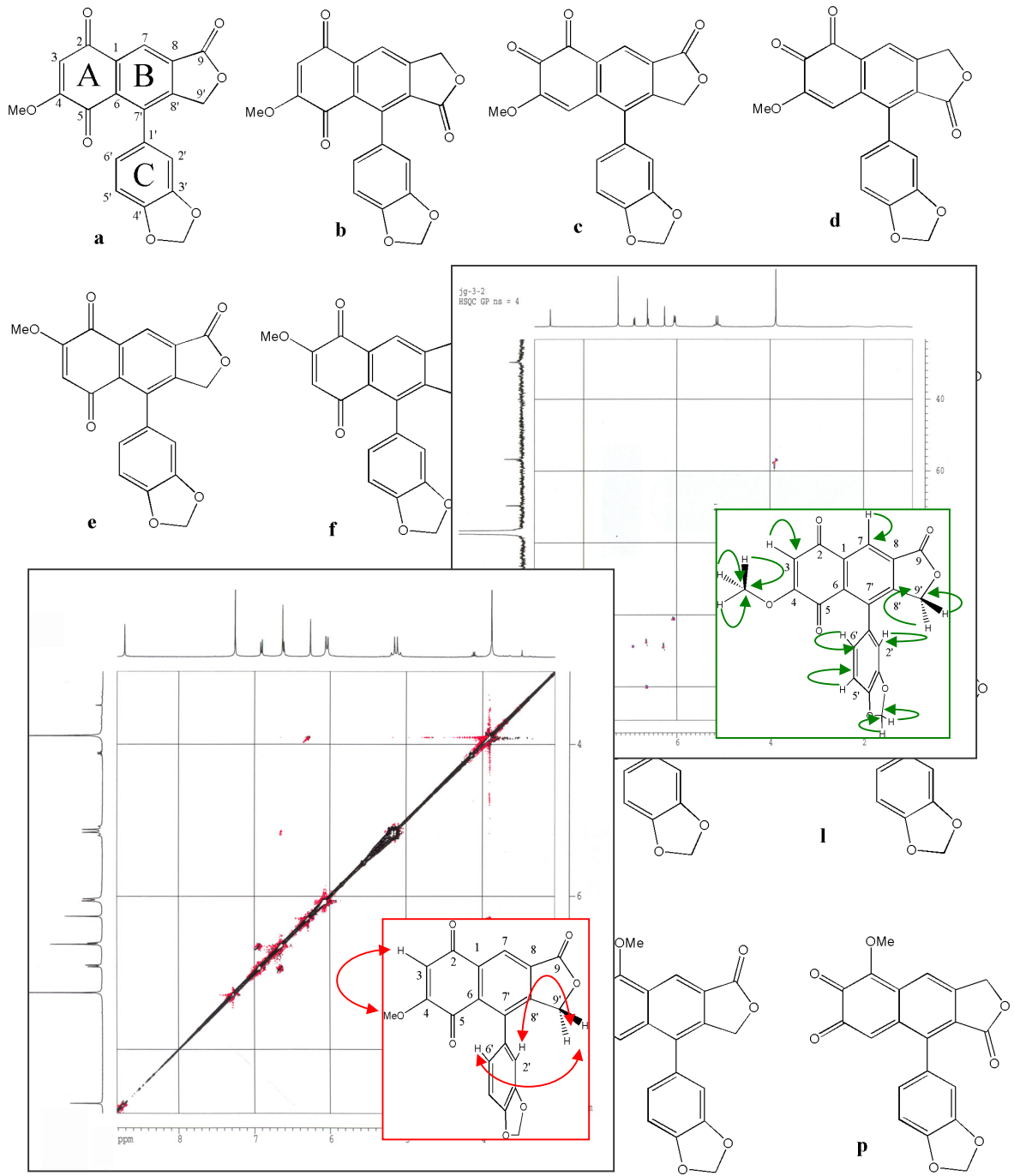


UV λ_{máx} (EtOH) nm: 322 (5.50), 281 (5.57), 241 (5.97)

HR-MS: 438.095065 (C₂₃H₁₈O₉ requiere 438.095082)

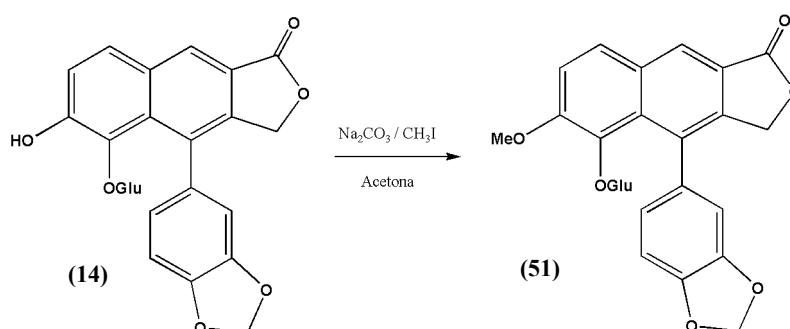
MS m/z (%): 438 (10), 396 (36), 354 (100), 336 (10), 309 (86), 269 (18)

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 2.26 (s, 3H, -OAc), 2.27 (s, 3H, -OAc), 3.29 (s, 2H, H-8 + H-8'), 4.33 (compleja, 1H, H-9a), 4.77 (compleja, 2H, H-9b + H-7'), 6.04 (s, 2H, -OCH₂O-), 6.66 (s, 1H, H-5), 6.85 (d, J=1.9 Hz, 1H, H-2'), 6.94 (d, J=8.36 Hz, 1H, H-5'), 7.13 (d, J=8.36 Hz, 1H, H-6'), 7.50 (s, 1H, H-2)



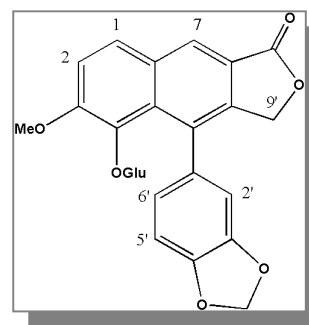
Semisíntesis de la justicidona

Parte experimental

Obtención de **51**4-(1,3-benzodioxol-5-il)-6-metoxi-1-oxo-1,3-dihidronafto[2,3-c]furan-5-il α -D-glucosa

Se disolvieron 223.6 mg (0.45 mmoles) del glucósido D3 (**14**) en 60 ml de acetona seca y se añadieron 700 mg de carbonato sódico y 1 ml de yoduro de metilo. La mezcla se mantuvo con agitación y a reflujo durante 10 horas, tras las cuales fue filtrada y concentrada a vacío obteniéndose un crudo de reacción de 650 mg que, tras ser disuelto en acetona, fue cromatografiado en columna de gel de sílice húmeda con la mezcla AcOEt/MeOH/H₂O 80:5:5. Se obtuvieron 183.9 mg (0.36 mmoles) de **51** (rendimiento = 80 %).

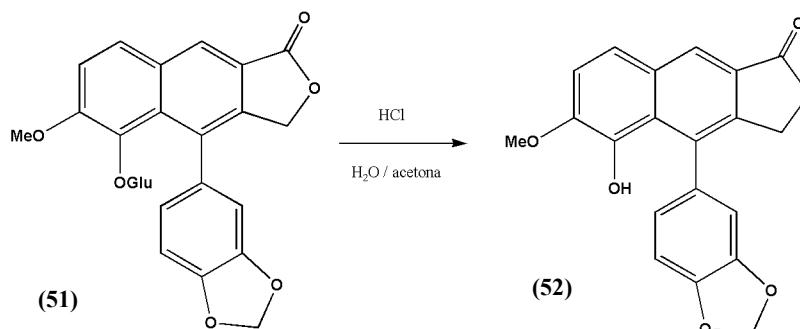
Compuesto 51



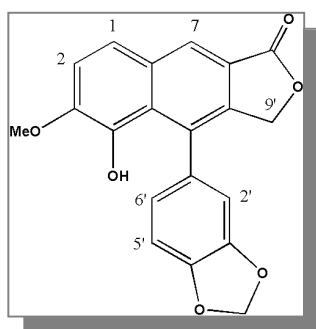
Punto de fusión =	197-204°C
UV $\lambda_{\text{máx}}$ (EtOH) nm:	215 SH, 259, 287, 340
IR $\nu_{\text{máx}}$ (CHCl ₃) cm ⁻¹ :	1020, 1073, 1086, 1150, 1272, 1438, 1487, 1608, 1620, 1750, 2920
HR-MS:	364.0944 (C ₂₁ H ₁₂ O ₆ requiere 364.0947)
MS m/z (%):	364 [M] ⁺ (100), 319 (52), 303 (20), 291 (22), 220 (10), 163 (18), 131 (8)
¹ H-NMR ((CD ₃)CO) δ :	2.36 (m, H _{G-2}), 3.0-3.65 (m, H _{G-3} , G-4, H-5 ^{glu} , 2xH _{G-6}), 3.99/4.01 (2xs, -OMe), 4.93 (t, J=15.0 Hz, H-9'a), 5.08/5.17 (2xd, J=7.6 Hz, anomérico), 5.24/5.30 (2xd, J=15.0 Hz, H-9'b), 6.00/6.05 (2xdd, 2H, J ₁ =18.7 y 1.0 Hz, J ₂ =11.3 y 1.0 Hz, -OCH ₂ O-), 6.64/6.66 (d, 1H, J=8.0 Hz, anillo C), 6.84/6.86 (d, 1H, J=8.0 Hz, anillo C), 7.01-7.07 (m, 1H, anillo C), 7.60/7.61 (d, J=9.0 Hz, H-3), 8.03/8.04 (d, J=9 Hz, H-2), 8.40 (s, H-7)
¹³ C-NMR (CDCl ₃ , 200 MHz) δ :	57.38/57.43 (2xq, -OMe), 62.40/62.57(2xt, G _{G-6}), 70.30/70.37 (2xt, C-9'), 77.42/77.59 (2xd, C _{G-5}), 101.70/101.77 (2xt, -OCH ₂ O-), 102.35/102.77 (2xd, anomérico), 107.99/108.30 (2xd, C-5'), 110.93/111.87 (2xd, C-2'), 117.19 (d, C-2), 123.11/123.59 (2xd, C-6'), 126.76/126.81 (2xd, C-1), 128.13/128.23 (2xd, C-7), 173.97 (s, C-9)

Obtención del compuesto 52

4-(1,3-benzodioxol-5-il)-5-hidroxi-6-metoxinafto[2,3-c]furan-1(3H)-ona

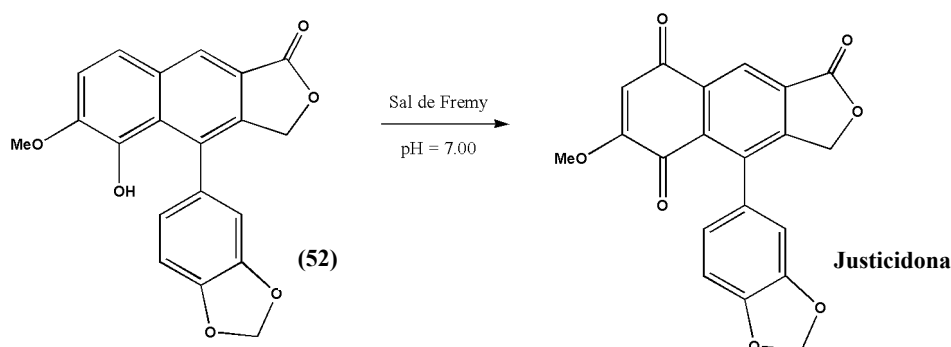


60 mg (0.12 moles) de compuesto **51** se disolvieron en 4 ml de acetona y se trató con 4 ml de HCl 0.5 M. La mezcla de reacción se mantuvo con agitación y a 60°C durante 12 horas, transcurridas las cuales, la mezcla fue extraída con acetato de etilo varias veces hasta que la fase acuosa perdió por completo la fluorescencia a la luz ultravioleta. Se obtuvo de este modo 40 mg (rendimiento=97.5 %) del compuesto **52**.

Compuesto **52**

Punto de fusión =	285°C
IR $\nu_{\text{máx}}$ (CHCl ₃) cm ⁻¹ :	1150, 1240, 1269, 1447, 1458, 1485, 1610, 1750, 2870, 3380
MS m/z (%):	350[M] ⁺ (100), 305 (47), 277 (24), 220 (9), 171 (10), 163 (12), 97 (10)
¹ H-NMR (CD ₃ Cl) δ :	4.00 (s, 3H, -OMe), 5.09 (d, 1H, <i>J</i> =15.6 Hz, H-9a), 5.18 (d, 1H, <i>J</i> =15.6 Hz, H-9b), 6.02 (d, 2H, <i>J</i> =14.8 Hz, -OCH ₂ O-), 6.78-6.82 (complejo, 2H, H-2' + H-6'), 6.89 (d, 1H, <i>J</i> =7.5 Hz, H-5'), 7.38 (d, 1H, <i>J</i> =8.9Hz, H-3), 7.68 (d, 1H, <i>J</i> =8.9 Hz, H-2), 8.40 (s, 1H, H-7)

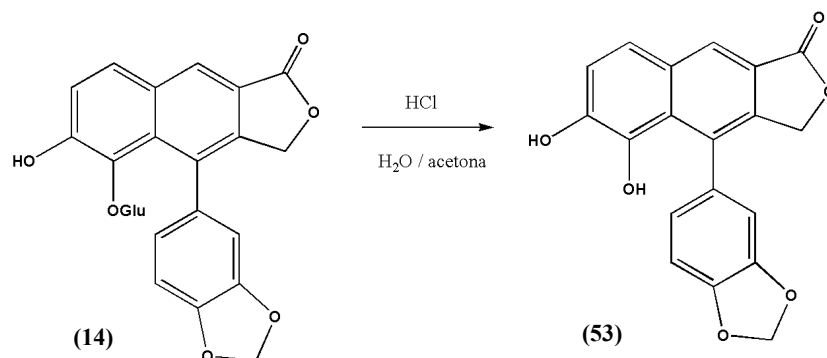
Obtención de justicidona



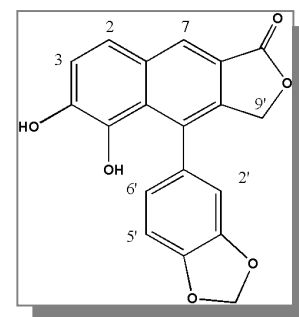
18 mg (0.051 mmoles) del compuesto **52** disueltos en 4 ml de diclorometano fueron añadidos a 16 ml de una disolución tampón ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaHPO}_4$) a pH 7.00 y que contenía 30 μl de Alicuat 336 (1.25 eq, 0.064 mmoles). A esta mezcla se añadió 34 mg (2.5 eq, 0.1275 mmoles) de la sal de Fremy ($(\text{KSO}_3)_2\text{NO}$) y se agitó vigorosamente durante 25 minutos. Transcurridos unos 5 minutos se observó un cambio de color en la mezcla de reacción que viró del amarillo al rojo. La mezcla fue extraída con acetato de etilo y la fase orgánica secada sobre sulfato sódico anhidro. El crudo fue cromatografiado en columna de gel de sílice húmeda con la mezcla AcOEt/n-hexano (50%), obteniéndose un producto de color rojo con datos espectroscópicos iguales a los de la justicidona (rendimiento=76.39 %).

Obtención del compuesto **53**

4-(1,3-benzodioxol-5-il)-5,6-dihidroinafto[2,3-c]furan-1(3H)-ona



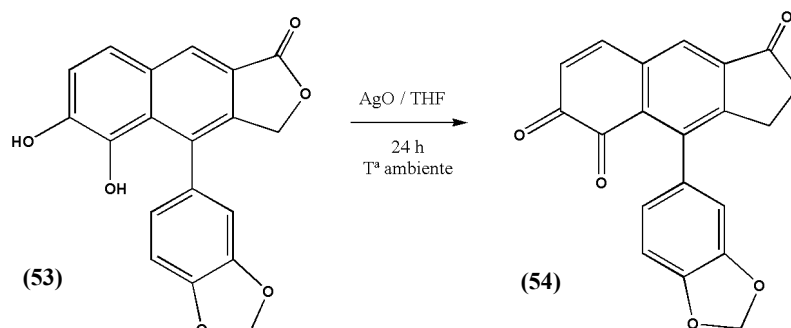
Se disolvieron 211 mg (0.42 mmoles) del glucósido D3 (**14**) en 5 ml de acetona, añadiéndose a la mezcla 5 ml de HCl 1N. La reacción fue mantenida a 70°C durante 6 horas, tras las cuales se añadió agua y se centrifugó, obteniéndose 128.13 g (0.38 mmoles) de la genina **53**. Rendimiento = 90%.

Compuesto **53**

Punto de fusión:	123-125°C
UV $\lambda_{\text{máx}}$ (EtOH) nm:	362 (3.63), 265 (4.41)
IR $\nu_{\text{máx}}$ (CHCl ₃) cm ⁻¹ :	810, 1014, 1103, 1231, 1437, 1619, 1727, 2917, 3421
HR-MS:	336.061348 (C ₁₉ H ₁₂ O ₆ requiere 336.063388)
MS m/z (%):	336 [M] ⁺ (100), 307 (23), 278 (11), 249 (7), 221 (11), 165 (8)
¹ H-NMR ((CD ₃) ₂ CO) δ :	5.09 (d, 1H, J=14.9 Hz, H-9a), 5.16 (d, 1H, J=14.9 Hz, H-9b), 6.04 (s, 2H, -OCH ₂ O-), 6.94-6.91 (complejo, 3H, H-2'+H-5'+H-6'), 7.36 (d, 1H, J=8.79 Hz, H-3), 7.66 (d, 1H, J=8,79 Hz, H-2), 8.32 (s, 1H, H-7)
¹³ C-NMR ((CD ₃) ₂ CO) δ :	70.9, 102.05, 108.49, 110.43, 119.29, 121.15, 122.74, 123.41, 126.57, 127.09, 131.13, 131.52, 133.94, 140.42, 141.03, 144.68, 147.81, 148.19, 171.42

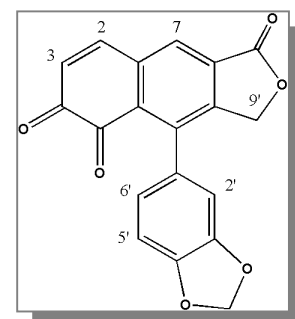
Obtención de **54**

4-(1,3-benzodioxol-5-il)nafto[2,3-c]furan-1,5,6(3H)-triona

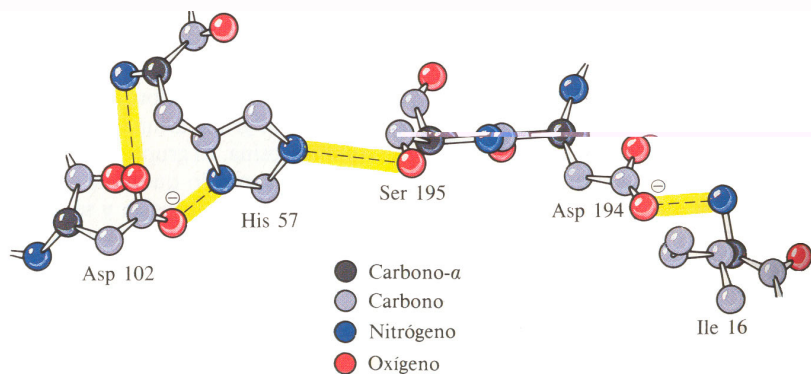
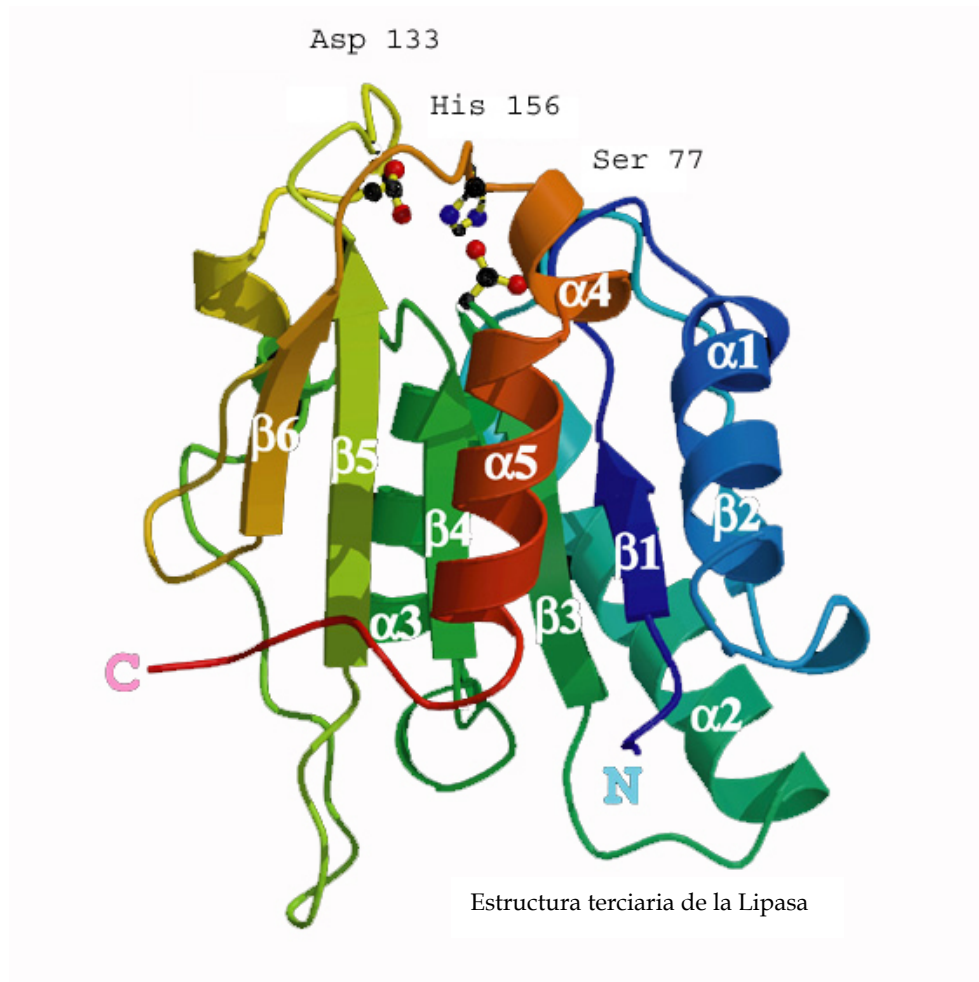


A 25 mg (0.074 mmoles) del compuesto **53** en THF le fue añadido AgO en exceso, manteniéndose la mezcla de reacción a temperatura ambiente y con agitación magnética durante 24 horas. Tras ser extraído con AcOEt, el crudo de reacción fue cromatografiado en columna de gel de sílice húmeda, obteniéndose de este modo 21.0 mg de un compuesto de color pardo, cuyo estudio espectroscópico confirmó que se trata de la *o*-quinona **54**. Rendimiento = 84.5%.

Compuesto **54**



IR $\nu_{\text{máx}}$ (CHCl ₃) cm ⁻¹ :	756, 1037, 1233, 1300, 1392, 1672, 1702, 1768, 2853, 2924
HR-MS:	334.043198 (C ₁₉ H ₁₀ O ₆ requiere 334.047738)
MS m/z (%):	334 [M] ⁺ (94), 306 (100), 277 (41), 249 (25), 219 (50), 163 (47)
¹ H-NMR ((CD ₃) ₂ CO 400 MHz) δ :	5.13 (d, <i>J</i> =10.12 Hz, 2H-9'), 6.05 (s, -OCH ₂ O-), 6.59 (d, 1H, <i>J</i> =10.17 Hz), 6.61-6.64 (compleja, 2H), 6.90 (d, 1H, <i>J</i> =8.32 Hz), 7.62 (d, 1H, <i>J</i> =10.18 Hz), 7.90 (s, 1H, H-7)



Conformación del sitio catalítico de la quimotripsina
 Rawn J.D. "Bioquímica", Vol. I, p. 162, 1989

Acetilación enzimática regioselectiva de secoiridoides

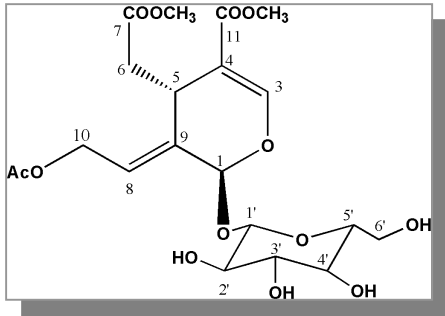
Parte experimental

Acetilación regioselectiva con pancreatina y lipasa pancreática

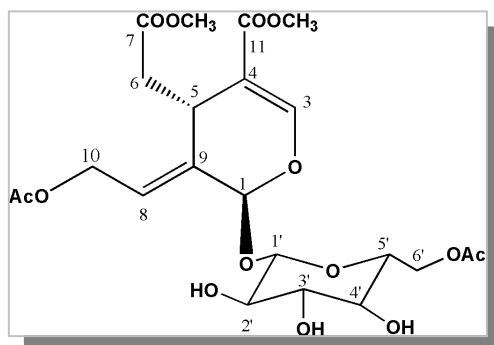
A 50 mg del compuesto **4** y 250 mg de pancreatina SIGMA, le fueron añadidos 5 ml de AcOEt. La mezcla se mantuvo con agitación magnética a 30°C u 80°C (reflujo), durante un periodo de tiempo comprendido entre 7 y 9 días, transcurridos los cuales se centrifugó a 8000 rpm para eliminar la enzima y se separaron los componentes del sobrenadante por HPLC. Se obtuvieron así los compuestos **4**, **6**, **7** y **8**.

Como dadores de grupos acetilo se empleó acetato de etilo, acetato de vinilo, acetato de metilo y acetato de *tert*-butilo en las mismas proporciones antes descritas para el acetato de etilo. La separación de los productos se llevó a cabo empleando la mezcla AcOEt/*n*-Hex/MeOH : 70/25/5.

➤ 10-Acetoxioleósido dimetil éster (**4**)

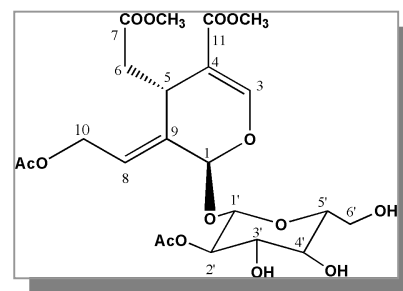
$[\alpha]_D^{23}$:	-196.3° (CHCl ₃)	
MS (FAB)	477 [M+H] ⁺	
¹ H-NMR (CDCl ₃) δ: (400 MHz)	2.05 (s, -OAc), 2.43 (dd, <i>J</i> ₁ =9.4 Hz, <i>J</i> ₂ =14.6 Hz, H-6a), 2.83 (dd, <i>J</i> ₁ =4.0, <i>J</i> ₂ =14.6 Hz, H-6b), 3.40-3.70 (m, 2H, H-2', H-5'), 3.80 (m, 2H, H-6'), 3.65 (s, C ₇ -OMe), 3.72 (s, C ₁₁ -OMe), 3.98 (dd, <i>J</i> ₁ =4.0 Hz, <i>J</i> ₂ =9.5 Hz, H-5), 4.68 (m, H-10a), 4.78 (dd, <i>J</i> ₁ =6.5 Hz, <i>J</i> ₂ =13.2 Hz, H-10b), 4.85 (d, <i>J</i> =7.5 Hz, H-1'), 5.81 (s, H-1), 6.11 (t, <i>J</i> =6.5 Hz, H-8), 7.49 (s, H-3)	
¹³ C-NMR (CDCl ₃) δ:	20.78 (-OCOCH ₃), 31.10 (C-5), 39.99 (C-6), 51.5 (-OMe), 51.86 (-OMe), 60.54 (C-10), 61.42 (C-6'), 69.53 (C-4'), 73.03 (C-2'), 76.07 (C-3' y C-5'), 93.57 (C-1), 99.79 (C-1'), 107.94 (C-4), 123.45 (C-8), 132.13 (C-9), 153.41 (C-3), 166.36 (C-11), 171.54 (C-7), 171.54 (-OCOCH ₃)	

➤ 6'-O-Acetil-10-acetoxioleósido dimetil éster (6)



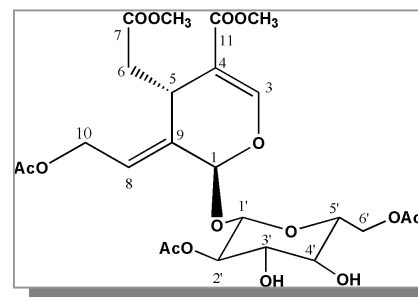
$[\alpha]^{23}_D$:	-63° (c=0.55, CHCl ₃)
UV $\lambda_{\text{máx}}$ (log ϵ) (EtOH) nm:	235 (4.11), 314 (3.03)
IR $\nu_{\text{máx}}$ (CHCl ₃) cm ⁻¹ :	908, 949, 1038, 1079, 1161, 1237, 1296, 1372, 1437, 1601, 1731 (C=O), 2919 (CH)
HR-MS (FAB)	[M+Na] ⁺ 541.1537 (C ₂₂ H ₃₀ NaO ₁₄ requiere 541.1533)
MS m/z (%):	519 (6), 329 (47), 307 (37), 297 (28), 176 (94), 154 (100), 136 (52)
¹ H-NMR (CDCl ₃) δ :	2.07 (s, -OAc), 2.13 (s, -OAc), 2.43 (dd, $J_1=9.5$ Hz, $J_2=15.3$ Hz, H-6a), 2.83 (dd, $J_1=4.0$ Hz, $J_2=15.3$ Hz, H-6b), 3.42-3.45 (m, H-2'), 3.42-3.55 (m, H-4'), 3.42-3.55 (m, H-5'), 3.62 (s, C ₇ -OMe), 3.64 (oculto por H- 1, H-3'), 3.74 (s, C ₁₁ -OMe), 4.02 (dd, $J_1=4.0$ Hz, $J_2=9.5$ Hz, H-5), 4.27 (dd, $J_1=2.0$ Hz, $J_2=12.3$ Hz, H-6'a), 4.51 (dd, $J_1=4.3$ Hz, $J_2=12.3$ Hz, H6'b), 4.75 (dd, $J_1=6.2$ Hz, $J_2=13.2$ Hz, H-10a), 4.82-4.88 (m, H-10b), 4.83 (d, $J=7.8$ Hz, H-1'), 5.75 (s, H-1), 6.10 (t, H-8), 7.48 (s, H-3)
¹³ C-NMR (CDCl ₃) δ :	20.8 (OCOCH ₃), 30.9 (C-5), 39.9 (C-6), 60.6 (C-10), 62.9 (C-6'), 69.5 (C-5'), 73.1 (C-2'), 74.5 (C-3'), 75.8 (C-4'), 93.3 (C-1), 99.5 (C-1'), 108.2 (C-4), 124.0 (C-8), 131.6 (C-9), 153.0 (C-3), 166.4 (C-11), 171.1 (C-7), 171.8 /166.4 (-OCOCH ₃)

➤ 2'-O-Acetil-10-acetoxioleósido dimetil éster (7)

MS (FAB) m/z: [M+Na]⁺ 541 (80)HR-MS (FAB) 541.1537 (C₂₂H₃₀NaO₁₄ requiere 541.1533)

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 2.07 (-OAc), 2.19 (-OAc), 2.45 (dd, *J*₁=9.8 Hz, *J*₂=14.8 Hz, H-6a), 2.87 (dd, *J*₁=4.2 Hz, *J*₂=14.8 Hz, H-6b), 3.49 (m, H-5'), 3.65-3.70 (m, H-2'), 3.65-3.70 (m, H-4'), 3.66 (s, C₇-OMe), 3.74 (s, C₁₁-OMe), 3.81 (dd, *J*₁=5.3 Hz, *J*₂=12.1 Hz, H-6'a), 3.94 (dd, *J*₁=3.0 Hz, *J*₂=12.1 Hz, H-6'b), 3.99 (dd, *J*₁=4.2 Hz, *J*₂=9.8 Hz, H-5), 4.71 (dd, *J*₁=5.8 Hz, *J*₂=13.5 Hz, H-10a), 4.79 (dd, *J*₁=7.8 Hz, *J*₂=13.5 Hz, H-10b), 4.89 (d, *J*=7.7 Hz, H-1'), 4.96 (t, *J*=9.33 Hz, H-3'), 5.80 (s, H-1), 6.00 (t, *J*=6.5 Hz, H-8), 7.47 (s, H-3)

➤ 2', 6'-O-Diacetil-10-acetoxioleósido dimetil éster (8)

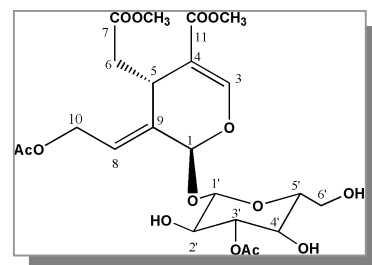
MS (FAB) m/z: [M+Na]⁺ 560 (80)HR-MS (FAB): 560.447 (C₂₂H₃₀NaO₁₄ requiere 560.448)

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 2.07 (s, -OAc), 2.11 (s, -OAc), 2.14 (s, -OAc), 2.42 (dd, *J*₁=9.5 Hz, *J*₂=15.3 Hz, H-6a), 2.87 (dd, *J*₁=4.0 Hz, *J*₂=15.3 Hz, H-6b), 3.48 (t, *J*=8.4 Hz, H-4'), 3.51 (m, H-5'), 3.64 (s, C₇-OMe), 3.73 (s, C₁₁-OMe), 3.98 (dd, *J*₁=4.0 Hz, *J*₂=8.5 Hz, H-5), 4.29 (dd, *J*₁=1.8 Hz, *J*₂=12.3 Hz, H-6'a), 4.49 (dd, *J*₁=4.1 Hz, *J*₂=12.3 Hz, H-6'b), 4.69 (t, *J*=8.1 Hz, H-3'), 4.72 (dd, *J*₁=6.15 Hz, *J*₂=15.15 Hz, H-10a), 4.79 (dd, *J*₁=7.77 Hz, *J*₂=15.15 Hz, H-10b), 4.90-4.96 (d, *J*=7.7 Hz, H-1'), 4.90-4.96 (m, H-2'), 5.71 (s, H-1), 6.02 (t, *J*=6.2 Hz, H-8), 7.46 (s, H-3)

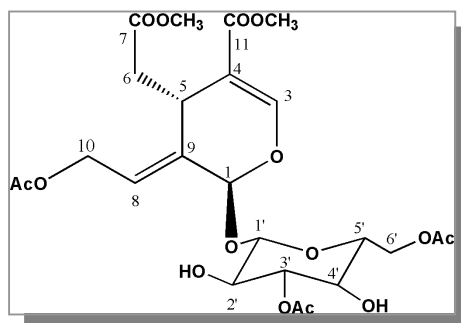
Acetilación regioselectiva con la lipasa de *Candida antarctica* (CAL)

El sustrato para la reacción se obtuvo de *Jasminum odoratissimum*, empleando la metodología descrita en la bibliografía⁴²³ y se utilizó la lipasa inmovilizada de *Candida antarctica* (CAL) (Novozyme Corp.) de SIGMA. A la mezcla de reacción, constituida por 10 mg de sustrato en 1.5 ml de THF y 0.35 ml de acetato de vinilo o acetato de etilo, se añadieron 50 mg de CAL. La acetilación de los compuestos **4**, **9** y **10** con acetato de etilo no requiere THF, ya que en este caso el dador de grupos acetilo es también el disolvente. En cualquier caso, tanto el disolvente como el dador de acetilos fueron previamente secados sobre tamiz molecular de 3Å. La mezcla de reacción fue mantenida con agitación magnética y a 20°C. Tanto el seguimiento de la reacción como la purificación de los productos se llevó a cabo por HPLC.

➤ 3'-O-Acetil-10-acetoxioleósido dimetil éster (**10**)

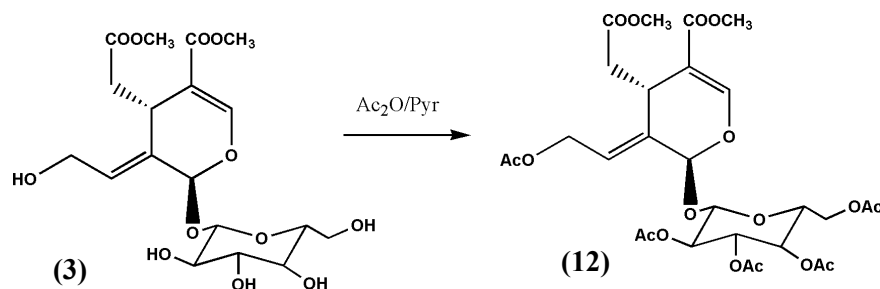


$[\alpha]_D^{23}$:	-130° (c=0.1 CHCl ₃)
IR $\nu_{\text{máx}}$ (CHCl ₃) cm ⁻¹ :	757, 1079, 1250, 1374, 1438, 1634, 1731, 3443
HR-MS (FAB)	[M+Na] ⁺ 541.1522 (C ₂₂ H ₃₀ O ₁₄ Na requiere 541.1533)
¹ H-NMR (CDCl ₃) δ :	2.06 (s, -OAc), 2.18 (s, -OAc), 2.45 (dd, $J_1=8.0$ Hz, $J_2=16.0$ Hz, H-6b), 2.88 (dd, $J_1=4.0$ Hz, $J_2=16.0$ Hz, H-6a), 3.82 (dd, $J_1=4.0$ Hz, $J_2=12.0$ Hz), 3.51 (m, H-5'), 3.61-3.73 (H-2'+H-4'), 3.65 (s, C ₇ -OMe), 3.73 (s, C ₁₁ -OMe), 3.95 (d, $J=12.0$ Hz, H-6'a), 4.00 (dd, $J_1=4.0$ Hz, $J_2=8.0$ Hz, H-5), 4.72 (dd, $J_1=4.0$ Hz, $J_2=16.0$ Hz, H-10b), 4.81 (dd, $J_1=8.0$ Hz, $J_2=16.0$ Hz, H-10a), 4.91 (d, $J=7.8$ Hz, H-1'), 4.97 (t, $J=9.3$ Hz, H-3'), 5.81 (s, H-1), 6.10 (t, $J=6.4$ Hz, H-8), 7.47 (s, H-3)
¹³ C-NMR (CDCl ₃) δ :	20.9 (C ₁₀ -OCOCH ₃), 21.0 (C _{3'} -OCOCH ₃), 31.2 (C-5), 40.1 (C-6), 60.5 (C-10), 51.6 (C ₇ -OCH ₃), 51.9 (C ₁₁ -OCH ₃), 62.0 (C-6'), 69.3 (C-4'), 71.7 (C-2'), 76.4 (C-5'), 78.1 (C-3'), 93.7 (C-1), 100.1 (C-1'), 108.1 (C-4), 123.8 (C-8), 131.7 (C-9), 153.2 (C-3), 166.3 (C-11), 170.8 (C ₁₀ -OCOCH ₃), 171.4 (C-7), 172.6 (C _{3'} -OCOCH ₃)

➤ 3', 6'-O-Diacetil-10-acetoxioleósido dimetil éster (**11**)

$[\alpha]^{23}_D$:	-150° (c=0.1 CHCl ₃)
IR $\nu_{\text{máx}}$ (CHCl ₃) cm ⁻¹ :	758, 1038, 1082, 1236, 1371, 1438, 1635, 1739, 3466
HR-MS (FAB)	[M+Na] ⁺ 583.1571 (C ₂₄ H ₃₂ O ₁₅ Na requiere 583.1639)
¹ H-NMR (CDCl ₃) δ :	2.06 (s, -OAc), 2.11 (s, -OAc), 2.18 (s, -OAc), 2.42 (dd, $J_1=9.6$ Hz, $J_2=15.3$ Hz, H-6b), 2.83 (dd, $J_1=4.0$ Hz, $J_2=15.3$ Hz, H-6a), 3.58 (m, H-4'), 3.60-3.70 (m, H-2'), 3.60-3.70 (m, H-5'), 3.65 (s, C ₇ -OMe), 3.74 (s, C ₁₁ -OMe), 4.01 (dd, $J_1=3.9$ Hz, $J_2=9.0$ Hz, H-5), 4.33 (d, $J=12.3$ Hz, H-6'b), 4.45 (d, $J=12.3$ Hz, H-6'a), 4.74 (dd, $J_1=5.6$ Hz, $J_2=13.5$ Hz, H-9), 4.74 (dd, $J_1=5.6$ Hz, $J_2=13.5$ Hz, H-10a), 4.84 (dd, $J_1=7.6$ Hz, $J_2=13.5$ Hz, H-10b), 4.89 (d, $J=7.2$ Hz, H-1'), 4.99 (t, $J=7.3$ Hz, H-3'), 5.76 (s, H-1), 6.08 (t, $J=6.6$ Hz, H-8), 7.47 (s, H-3)
¹³ C-NMR (CDCl ₃) δ :	20.8 (C ₁₀ -COCH ₃), 20.9 (C ₆ -COCH ₃), 21.0 (C ₃ -COCH ₃), 30.0 (C-5), 39.8 (C-6), 51.5 (C ₁₁ -OCH ₃), 51.7 (C ₇ -OCH ₃), 60.6 (C-10), 62.8 (C-6'), 68.7 (C-4'), 71.6 (C-5'), 74.6 (C-2'), 77.2 (C-3'), 93.2 (C-1), 99.6 (C-1'), 108.2 (C-4), 123.9 (C-8), 131.5 (C-9), 153.0 (C-3), 153.0 (C-11), 166.3 (C-7), 171.1 (C ₁₀ -COCH ₃), 171.5 (C ₆ -COCH ₃), 172.3 (C ₃ -COCH ₃)

- Obtención del 10-hidroxioléosido dimetil éster 10, 2', 3', 4', 6' pentaacetato (**12**)
(Acetilación del 10-hidroxioléosido dimetil éster (**3**))

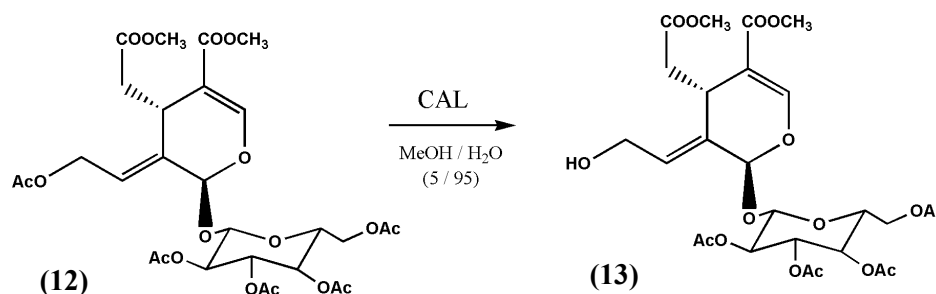


50 mg del compuesto **3** fueron disueltos en la mínima cantidad de piridina, tras lo cual se añadió en exceso anhídrido acético, dejándose la reacción durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, la mezcla se extrajo y fue lavada con HCl diluido, una disolución saturada de NaHCO₃ y agua destilada. La fase orgánica fue secada sobre Na₂SO₄ anhidro y una vez llevado a sequedad, el crudo fue cromatografiado obteniéndose el compuesto **12** con rendimiento cuantitativo.

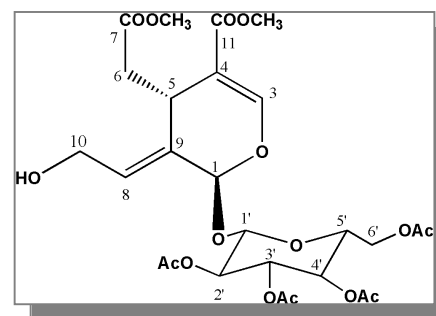
Compuesto **12**

[α] ²³ _D :	-149.8 (c 1.3, CHCl ₃)	
UV λ _{máx} (log ε) (EtOH) nm:	236 (3.94)	
IR ν _{máx} (CHCl ₃) cm ⁻¹ :	1635, 1705, 1745	
HR-MS	644.196503 (C ₂₈ H ₃₆ O ₁₇ requiere 644.195250)	
MS m/z (%):	644 [M] ⁺ (1), 331 (69), 223 (20), 169 (100), 109 (46)	
¹ H-NMR (CDCl ₃) δ:	2.02, 2.03, 2.07, 2.08, 2.09 (5xs, 3H, -OAc), 2.43 (dd, J ₁ =9.4 Hz, J ₂ =14.6 Hz, H-6a), 2.80 (dd, J ₁ =4.0 Hz, J ₂ =14.6 Hz, H-6b), 3.64 (s, C ₇ -OMe), 3.73 (s, C ₁₁ -OMe), 3.98 (dd, J ₁ =4.0 Hz, J ₂ =9.4 Hz, H-5), 4.13 (dd, J ₁ =6.5 Hz, J ₂ =13.2 Hz, H-6'b), 4.32 (dd, J ₁ =6.5 Hz, J ₂ =13.2 Hz, H-6'a), 4.73 (dd, J ₁ =6.5 Hz, J ₂ =13.2 Hz, H-10a), 4.77 (dd, J ₁ =6.5 Hz, J ₂ =13.2 Hz, H-10b), 5.04 (d, J=7.5 Hz, H-1'), 5.27 (t, J=7.05 Hz, H-5'), 5.72 (s, H-1), 6.01 (t, J=6.5 Hz, H-8), 7.46 (s, H-3)	

- Obtención del 10-hidroxioléosido dimetil éster 2', 3', 4', 6' tetraacetato (**13**)
(Desacetilación del 10-hidroxioléosido dimetil éster 10, 2', 3', 4', 6' pentaacetato)

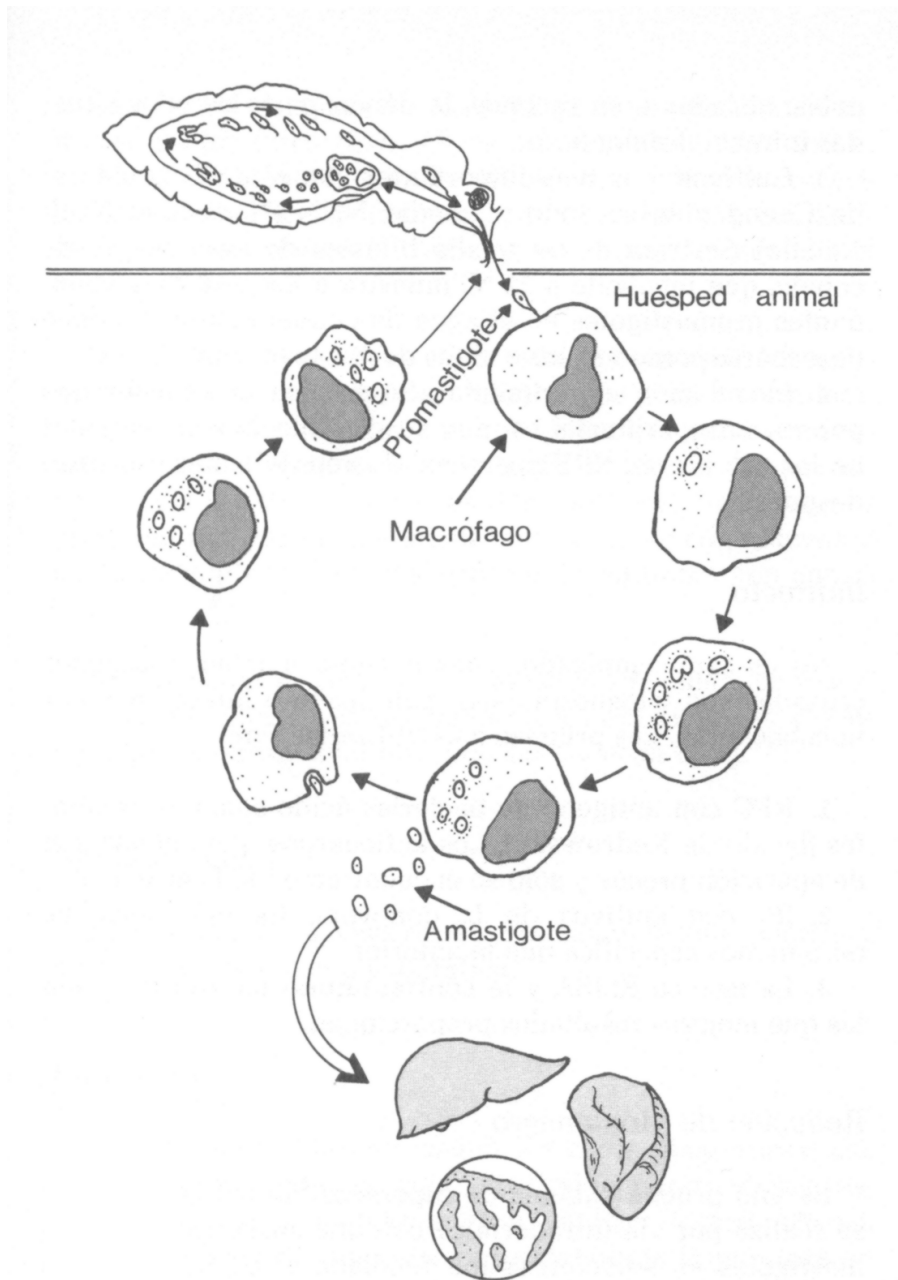


10 mg del derivado pentaacetilado **12** se disolvieron en 15 ml de la mezcla MeOH/agua (5/95), siendo añadidos 50 mg de la lipasa de *Candida antarctica* (CAL). Tras 2 horas de reacción a temperatura ambiente y con agitación magnética, se centrifugó la mezcla, inyectándose el sobrenadante, una vez filtrado, en el cromatógrafo de HPLC. Se obtuvo así el compuesto **13** con un rendimiento del 90%.

Compuesto **13**

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 2.02-2.08 (4xs, 3H, -OAc), 2.38 (dd, $J_1=9.4$ Hz, $J_2=14.6$ Hz, H-6a), 2.84 (dd, $J_1=4.0$ Hz, $J_2=14.6$ Hz, H-6b), 3.65 (s, C₇-OMe), 3.72 (s, C₁₁-OMe), 4.11-4.38 (m, H-5, H-6'a, H-6'b, H-10a, H-10b), 5.04 (d, $J=7.5$ Hz, H-1'), 5.26 (t, $J=7.05$ Hz, H-5'), 5.68 (s, H-1), 6.13 (t, $J=6.5$ Hz, H-8), 7.45 (s, H-3)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 20.5 (-COCH₃), 20.6 (-COCH₃), 20.6 (-COCH₃), 20.8 (-COCH₃), 30.2 (C-5), 39.9 (C-6), 51.5 (C₁₁-OCH₃), 51.7 (C₇-OCH₃), 58.7 (C-10), 61.7 (C-6'), 68.2 (C-4'), 70.7 (C-5'), 72.4 (C-2'), 72.8 (C-3'), 92.8 (C-1), 97.0 (C-1'), 108.3 (C-4), 124.2 (C-8), 131.2 (C-9), 152.9 (C-3), 153.1 (C-11), 166.4 (C-7), 170.1 (-COCH₃), 170.6 (-COCH₃), 170.7 (-COCH₃), 172.1 (-COCH₃)



Ciclo biológico de *Leishmania donovani*
 Pumarola A. et al. 2ª edición. Ed. Salvat, p. 821, Barcelona, (1987)

Actividad antileishmania

Actividades biológicas

La leishmaniasis es una enfermedad infecciosa provocada por parásitos protozoarios del género *Leishmania*, subgénero *Viannia*, de la familia Trypanosomatidae⁴²⁷. Según la OMS, afecta a unos 12 millones de personas repartidos en 88 países del mundo, 72 de los cuales están en vías de desarrollo. Cada año se registran 1.7 millones de nuevos casos y 350 millones de personas se encuentran en riesgo de ser infectados⁴²⁸.

La fuente de infección son animales como roedores, perros y diversos mamíferos salvajes⁴²⁹. El hombre puede contraer esta enfermedad mediante la picadura del insecto vector, de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia*, que haya picado anteriormente a un mamífero infectado⁴³⁰. La enfermedad también puede transmitirse de madres a hijos y a través de transfusiones de sangre o agujas infectadas⁴²⁷.

Existen distintas formas de la enfermedad, siendo la leishmaniasis cutánea la variante más frecuente. Sus síntomas son úlceras en la piel que pueden dejar cicatrices permanentes. La leishmaniasis mucocutánea puede ocasionar una desfiguración apreciable. La leishmaniasis visceral es la forma más grave de la enfermedad, siendo mortal casi en la totalidad de los casos si el enfermo no recibe el tratamiento adecuado; los síntomas de esta variante incluyen accesos de fiebre, pigmentación de la piel, pérdida de peso, hemorragias y anemia⁴³¹.

La enfermedad está en etapa de expansión, siendo cada vez más frecuente la aparición de nuevos focos que afectan de forma principal a pacientes inmunodeprimidos, tales como transplantados o enfermos de hepatitis y SIDA⁴³².

Los esfuerzos realizados con el fin de producir fármacos y vacunas eficaces contra la leishmaniasis han fracasado. Los principales fármacos utilizados para tratar esta enfermedad son los compuestos que contienen antimonio: antimoniato de

⁴²⁷ Chang K.P., Fong D. and Bray R.S. Biology of *Leishmania* and leishmaniasis. En: "Leishmaniasis". Chang K.P. and Bray R.S., ed. pp, 2-27. Elsevier. Amsterdam. (1985)

⁴²⁸ Tropical Disease Research Progress 1975-94, Highlights 1993-1994, World Health Organization. UNDP/World Bank/WHO. Geneva. (1995)

⁴²⁹ Larivière M., Beauvais B., Derouin F. and Traorè. "Parasitologie Médicale". Pp. 55-62. Ellipses. Francia. (1987)

⁴³⁰ Alexander J. and Russell D.G. *Advances of Parasitology*, **31**, 176-231, (1992)

⁴³¹ Marsden P.D and Jones T.C. Clinical manifestations, diagnosis and treatment of leishmaniasis. En: "Leishmaniasis". Chang P.K. and Bray R.S., ed. pp, 183-198. Elsevier. Amsterdam, (1985)

⁴³² Choi C.M., Lerner E.A. *American Journal of Clinical Dermatology*, **3** (2), 91-105, (2002)

meglumina (Glucantine) y estibogluconato de sodio (Stibamidine). Otros medicamentos utilizados son la anfotericina B y la pentamidina^{433,434}.

No obstante, la utilización de estos fármacos presenta inconvenientes importantes, debido a sus efectos secundarios especialmente sobre la función cardiaca. Además, al cabo de unas pocas semanas de tratamiento aparecen mecanismos de resistencia a estos fármacos⁴³³.

En el afán de búsqueda de fármacos eficaces contra la leishmaniasis, se han descubierto varios compuestos de origen natural y sintético con actividad antileishmania que comprenden un grupo diverso desde el punto de vista estructural. Entre ellos, hay algunos que incluyen compuestos heterocíclicos de nitrógeno como: quinolinas⁴³⁵, acridinas⁴³⁶, fenotiazinas⁴³⁷, pirimidinas⁴³⁸ y purinas⁴³⁹; y muchas otras clases de compuestos tales como dihidrochalconas⁴³³, anilinas⁴⁴⁰, flavonoides⁴⁴¹, diterpenos⁴⁴², ésteres y amidas de aminoácidos^{443,444}, alquilfosfolípidos⁴⁴⁵, ureidos diglicosilados⁴⁴⁶ y ciertos complejos de platino⁴³⁴.

-
- ⁴³³ Hermoso A., Jiménez I.A., Mamani Z.A., Bazzocchi I.L., Piñero J.E., Ravelo A.G. and Valladares B. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **11**, 3975-80, (2003)
- ⁴³⁴ Mesa-Valle C.M., Rodríguez-Cabezas M.N., Moraleda-Lindez V., Craciunescu D., Sánchez-Moreno M. and Osuna A. *Pharmacology*, **57** (3), 160-72, (1998)
- ⁴³⁵ Chakrabarti G., Basu A., Manna P. P, Mahato S. B, Mandal N. B and. Bandyopadhyay S.. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **43** 359-66, (1999)
- ⁴³⁶ Gamage S.A., Figgitt D.P., Wojcik S.J., Ralph R.K., Ransijin A., Mauel J., Yardley V., Snowdon D., Croft S.L., Denny W.A. *Journal of Medicinal Chemistry*, **40** (16), 2634-42, (1997)
- ⁴³⁷ Khan M.O., Austin S.E., Chan C., Yin H., Marks D., Vaghjiani S.N., Kendrick H., Yardley V., Croft S.L., Douglas K.T. *Journal of Medicinal Chemistry*, **43** (16), 3148-56, (2000)
- ⁴³⁸ Avila J.L., Polegre M.A., Avila A. and Robins R.K. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **83** (2), 285-9, (1986)
- ⁴³⁹ Aronov A.M. and Gelb M.H. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, **8**, 3505-3510, (1999)
- ⁴⁴⁰ Benbow J.W., Bernberg E.L., Korda A. and Mead J.R. *Antimicrobial Agents and Chemistry*, **42** (2), 339-43, (1998)
- ⁴⁴¹ Mitra B., Saha A., Chowdhury A.R., Pal C., Mukhpadwhyay S., Bandyopadhyay S. and Majumder H.K. *Molecular Medicine*, **6** (6), 527-41, (2000)
- ⁴⁴² Kayser O., Kiderlen A.F., Bertels S. and Siems K. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **45** (1), 288-92, (2001)
- ⁴⁴³ Rabinovitch M. and Zilberfarb V. *Parasitology*, **96** (2), 289-96, (1998)
- ⁴⁴⁴ Rabinovitch M., Zilberfarb V. and Pouchelet M. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **36** (2), 288-93, (1987)
- ⁴⁴⁵ Croft S.L., Snowdon D. and Yardley V. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **38** (6), 1041-7, (1996)
- ⁴⁴⁶ Neetu T., Ramesh, Mishra R.C., Tripathi R.P., Srivastava V.M.L. and Suman Gupta. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, **14** (15), 4055-9, (2004)

Material y métodos

Cepas utilizadas: *L. amazonensis* MHOM/BR/77/LTB0016
L. braziliensis MHOM/95/PE/LQ2

Medios de Cultivo:

◆ Medio USMARU

Fase sólida: Blood agar base (DIFCO)	4%
Sangre de conejo desfibrinada	15%
Agua destilada	
Fase líquida: Solución salina	0.85%
Estreptomicina	0.3 mg/ml

◆ Medio Schneider

◆ Medio RPMI 1640

RPMI 1640	8.32 g
Hepes	4.75 g
NaHCO ₃	1.60 g
Solución de aminoácidos orgánicos ⁽¹⁾	100 ml
Solución de vitaminas con ácido fólico ⁽²⁾	0.2 ml
SBFI	200 ml
Agua destilada c.s.p.	1000 ml

(1) Solución de aminoácidos, ácidos orgánicos y azúcares (g):

Cisteína	0.8	Prolina	69
Glutamato	2.5	Glutamina	1
L-Ornitina	1	Glucosa	7
Malato	6.7	α -Cetoglutarato	3.7
Fumarato	0.55	Succinato	0.6
Fructosa	4	Agua destilada c.s.p.	1 L

(2) Solución de vitaminas (mg)

Pantotenato cálcico	10	Cloruro de colina	10
Ácido fólico	10	1-Inositol	20
Clorhidrato de Piridoxal	10	Nicotinamida	10
Riboflavina	1	Clorhidrato de tiamina	10
Agua destilada c.s.p.	0,1 L		

Procedencia y cultivo del parásito

La cepa de *Leishmania braziliensis* fue cedida por la Unidad de Investigación de Leishmaniasis del Departamento de Microbiología de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, Perú.

La cepa se mantuvo inicialmente en medio USMARU, medio especialmente indicado para organismos exigentes en sus condiciones nutricionales, como es el caso de *Leishmania braziliensis* (los promastigotes de *Leishmania* crecen en este medio con una temperatura de incubación de 22-25°C). Seguidamente se llevó a cabo su adaptación al medio líquido RPMI 1640, enriquecido con SBF1 al 20%, vitaminas y aminoácidos. El pH del medio se ajustó a 7.2 con NaOH al 10% y al 5% antes de añadir SBF1 al 20%.

El medio se esterilizó por filtración con un filtro VacuCap de 0.2 µm y una bomba de vacío, en cabina de flujo laminar. A continuación se repartió en alícuotas en recipientes estériles de 250 ml y se almacenó a 4°C.

Antes de utilizar cada alícuota se le añadió un antibiótico para evitar la contaminación bacteriana (gentamicina a una concentración de 40 mg/l) y un antifúngico para evitar el crecimiento de hongos en el medio (5-fluorocitosina a una concentración de 0.002 g/ml). El antifúngico se utilizó solamente en la adaptación de las cepas al medio RPMI 1640, una vez las cepas están adaptadas se deja de añadir el antifúngico.

Se tomaron 500 µl de la fase líquida del cultivo sembrado en medio USMARU y se mantuvieron en una estufa a 24°C. Para el cultivo se utilizaron "Flask" de 25 cm³ de la casa Costar, estériles, que contenían 2 ml de medio RPMI 1640 enriquecido con SBF1 al 20%, vitaminas y aminoácidos.

El cultivo se examinó diariamente utilizando un microscopio invertido modelo Leica DMIL, hasta que los promastigotes se observaron activos. En este momento se tomaron 500 µl de este cultivo y se inocularon en 2 ml de medio fresco.

Una vez adaptados al medio líquido RPMI, y conociendo los tiempos de duplicación, se realizaron los pases sucesivos. Para ello, cada dos días, se renovó el medio, eliminando casi todo el cultivo, dejando cantidad suficiente en el fondo del recipiente y añadiendo 2 ml de medio fresco.

El manejo de las cepas se realizó siempre en una cámara de flujo laminar, esterilizada previamente mediante luz UV y provistos de guantes y mascarilla.

La cepa de *Leishmania amazonensis* utilizada en estos ensayos fue cedida por el Laboratorio de Bioquímica de Trypanosomatidos, Departamento de Inmunología, Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Río de Janeiro. Estos parásitos ya estaban adaptados al crecimiento en medio líquido, utilizándose medio Schneider enriquecido con SBF1 al 10%, 100 U/ml de penicilina G potásica y 100 µg/ml de gentamicina. Los cultivos se mantuvieron en la estufa a 25°C.

Actividad antileishmania

Los ensayos de actividad antiparasitaria, realizados por el Dr. D. José Piñero Barroso, del Departamento de Parasitología de la Universidad de La Laguna, se llevaron a cabo utilizando un método colorimétrico cuantitativo en el que se usa como indicador de oxidación-reducción "Alamar Blue®" al 10%.

Para estos ensayos se partió de cultivos madre de promastigotes de *L. braziliensis* y *L. amazonensis* en fase logarítmica de crecimiento. Los parásitos se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 minutos y se resuspendieron en 1 ml de medio de cultivo RPMI sin rojo fenol con un suplemento del 10% de SBF1. Se contaron, a continuación, y se preparó una suspensión celular de 10⁶ parásitos/ml para realizar el ensayo en placas microtiter de 96 pocillos. Posteriormente, se adicionó el compuesto, probándose cada producto a 8 concentraciones distintas, obtenidas mediante diluciones seriadas y cada concentración fue ensayada por triplicado en la misma placa. Las placas se repitieron tres veces en días diferentes.

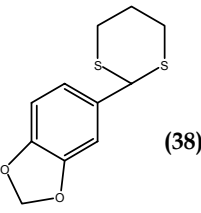
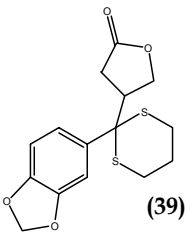
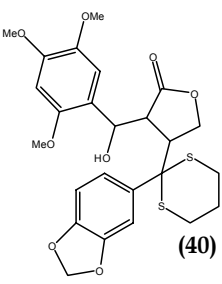
Tras el montaje de la placa se añadió a cada uno de los pocillos 20 µl de Alamar Blue® y se incubó la placa durante 48h a 22 ó 25°C, dependiendo de la especie de

parásito analizada. Para finalizar se procedió al recuento con un lector de ELISA a 570 y 630 nm.

Los datos obtenidos permiten calcular la CI_{50} (Concentración Inhibitoria 50), concentración ($\mu\text{g/ml}$) de principio activo que inhibe el porcentaje de crecimiento reduciéndolo a la mitad en relación con la muestra control. Para el cálculo de este parámetro se representó el porcentaje de inhibición del crecimiento frente a la concentración de principio activo analizada, ajustando los puntos que se obtienen mediante una ecuación de segundo grado.

Resultados y discusión

Se llevó a cabo el estudio de actividad leishmanicida con justicidona y sus siete precursores sintéticos. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

PRODUCTO		<i>L. braziliensis</i>	<i>L. amazonensis</i>
 <p>(38)</p>	% Inh. a 300 $\mu\text{g/ml}$	30.82	9.17
	CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	-	-
 <p>(39)</p>	% Inh. a 300 $\mu\text{g/ml}$	18.33	48.52
	CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	-	-
 <p>(40)</p>	% Inh. a 300 $\mu\text{g/ml}$	-	-
	CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	51.62	94.51

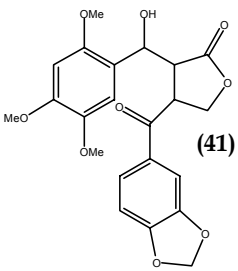
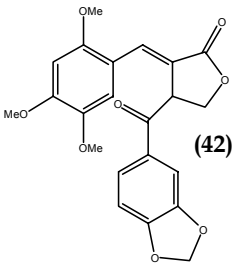
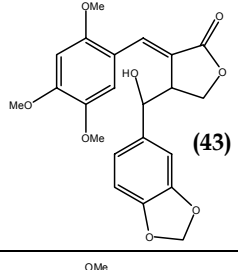
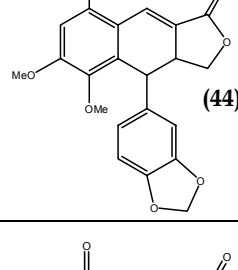
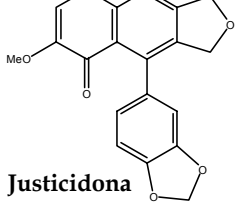
PRODUCTO	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. amazonensis</i>	
 (41)	% Inh. a 300 µg/ml	-	37.74
	CI ₅₀ (µg/ml)	125.06	-
 (42)	% Inh. a 300 µg/ml	3.7	31.72
	CI ₅₀ (µg/ml)	-	-
 (43)	% Inh. a 300 µg/ml	-	-
	CI ₅₀ (µg/ml)	154.43	155.25
 (44)	% Inh. a 300 µg/ml	-	40.13
	CI ₅₀ (µg/ml)	159	-
 Justicidona	% Inh. a 300 µg/ml	-	42.12
	CI ₅₀ (µg/ml)	66.22	-

Tabla 1. CI₅₀ e inhibición del crecimiento del parásito a una concentración de 300 µg/ml para la justicidona y sus precursores sintéticos.

A la vista de los resultados obtenidos se puede comprobar cómo existen diferencias en cuanto a la actividad antiparasitaria de los productos ensayados en función de la especie de parásito analizada.

Frente a *L. braziliensis* podemos comprobar cómo los productos más activos resultaron ser **40** y **justicidona**, con valores de CI_{50} de 51.62 $\mu\text{g/ml}$ (99.27 μM) y 66.22 $\mu\text{g/ml}$ (181.9 μM), respectivamente. Esto supone una actividad moderada en comparación con la del ketoconazol, empleado como control. Éste es un antifúngico que ha resultado activo *in vivo* contra *L. mexicana*⁴⁴⁷ y que frente a *L. braziliensis* mostró una CI_{50} de 34.89 $\mu\text{g/ml}$ (65.8 μM).

Del resto de productos analizados comprobamos que los compuestos **41**, **43** y **44** mostraron una actividad menor, con valores de CI_{50} entre 125-160 $\mu\text{g/ml}$. Los compuestos **38**, **39** y **42** presentaron una actividad mínima a una concentración tan elevada como 300 $\mu\text{g/ml}$, en el mejor de los casos el compuesto **38** inhibió el crecimiento de los parásitos, respecto al control, un 30.82%.

En los estudios realizados frente a *L. amazonensis* se pone de manifiesto que los productos analizados presentaban una menor actividad antiparasitaria. En este caso el producto más activo, como frente a *L. braziliensis*, resultó ser de nuevo el compuesto **40**, con una CI_{50} de 94.51 $\mu\text{g/ml}$ (181.75 μM). Por el contrario, la justicidona mostró una mínima actividad a 300 $\mu\text{g/ml}$ frente a *L. amazonensis*.

En el caso de los ensayos frente a *L. amazonensis* el compuesto **43** mostró una actividad leishmanicida menor. También se estudiaron los lignanos sesamina y justicidina E de *Justicia hyssopifolia* y los compuestos **20** y **35**. En todos los casos se obtuvo una actividad muy baja frente a *L. amazonensis*, a una concentración de 300 $\mu\text{g/ml}$ (Tabla 2).

⁴⁴⁷ Ramos J.M., Segovia M. *Revista Española de Quimioterapia*, **10** (1), (1997)

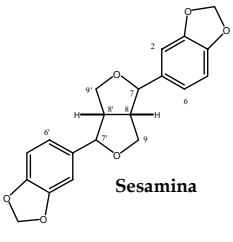
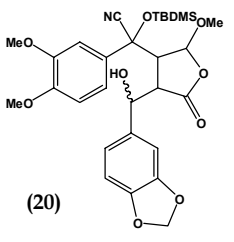
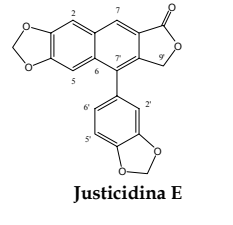
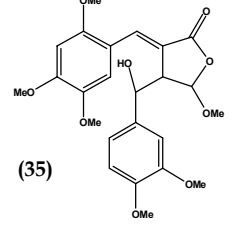
PRODUCTO	% Inh. a 300 µg/ml (<i>L. amazonensis</i>)	PRODUCTO	% Inh. a 300 µg/ml (<i>L. amazonensis</i>)
 <p>Sesamina</p>	7.16	 <p>(20)</p>	16.95
 <p>Justicidina E</p>	18.64	 <p>(35)</p>	9.02

Tabla 2. % de inhibición del crecimiento de *L. amazonensis* a concentración de 300 µg/ml, de los compuestos **20**, **35**, sesamina y justicidina E

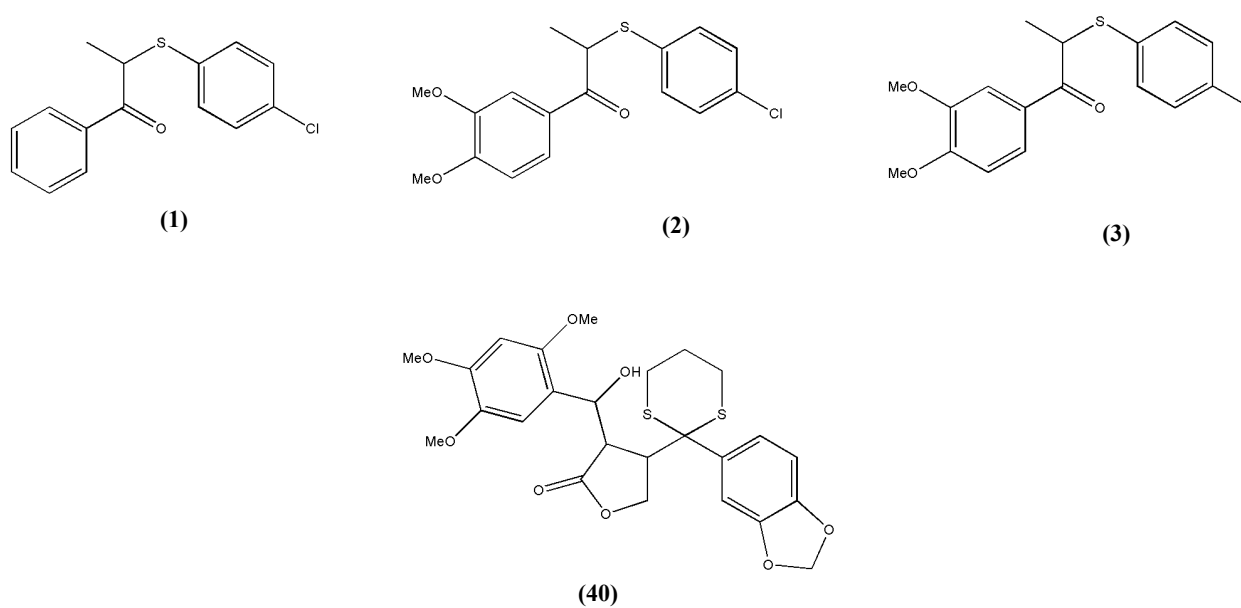
Existen en la literatura evidencias de que los lignanos presentan cierta actividad antiparasitaria contra organismos del Orden Kinetoplastida, donde se engloban protozoos parásitos tan importantes como los del género *Leishmania* y *Trypanosoma*. En un reciente estudio⁴⁴⁸ se comprobó que los lignanos tetrahidrofuránicos obtenidos de inflorescencias de *Piper solmsianum* presentaban actividad *in vitro* frente a la cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas en el continente americano.

Otro estudio realizado con neolignanos naturales, obtenidos de especies del género *Virola* y análogos sintéticos de los mismos⁴⁴⁹, mostró que estos productos presentan actividad frente a *L. donovani*. Ensayos *in vitro* permitieron comprobar cómo, frente a formas amastigotas del parásito, la mayor actividad y selectividad en la acción antiparasitaria está ligada a la existencia de un puente sulfuro en C-8 (estructuras 1, 2 y 3, Esq. 1). Obsérvese que, al igual que estos neolignanos, el compuesto **40**, precursor sintético de la justicidona que presenta mayor actividad, posee dos anillos aromáticos sustituidos y puentes sulfuro.

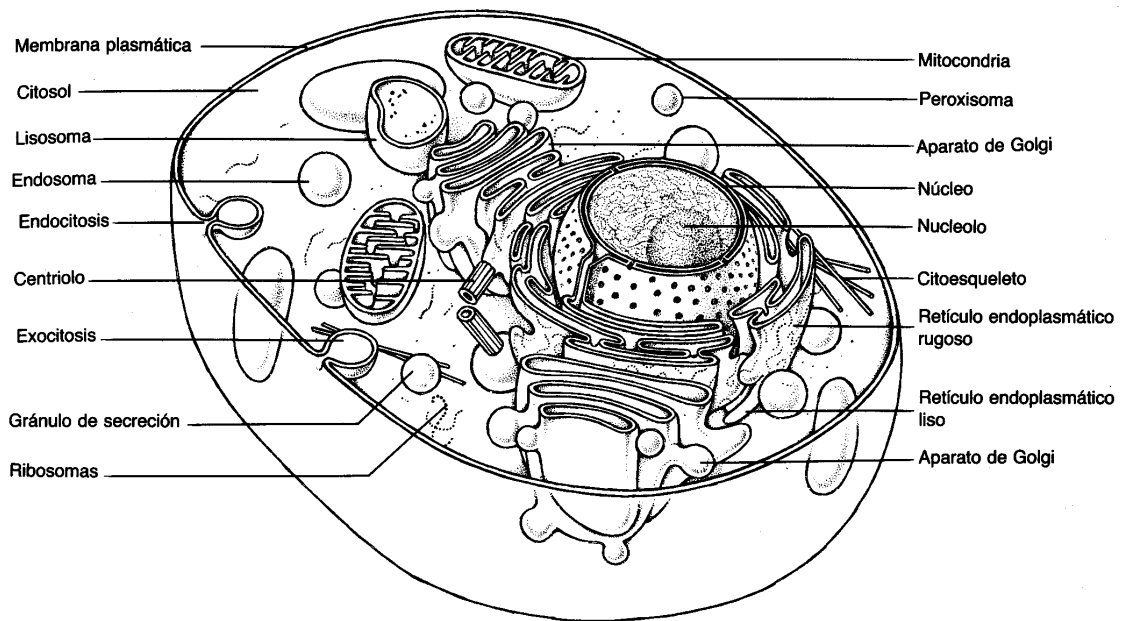
⁴⁴⁸ Martins R.C., Lago J.H., Albuquerque S., Kato M.J. *Phytochemistry*, **64** (2), 667-70, (2003)

⁴⁴⁹ Barata L.E., Santos L.S., Ferri P.H., Phillipson J.D., Paine A., Croft S.L. *Phytochemistry*, **55** (6), 589-95, (2000)

Actividad antileishmania



Esquema 1. Neolignanos activos contra *L. Donovanii* y precursor sintético de la justicidona con actividad frente a *L. braziliensis* y *L. amazonensis*

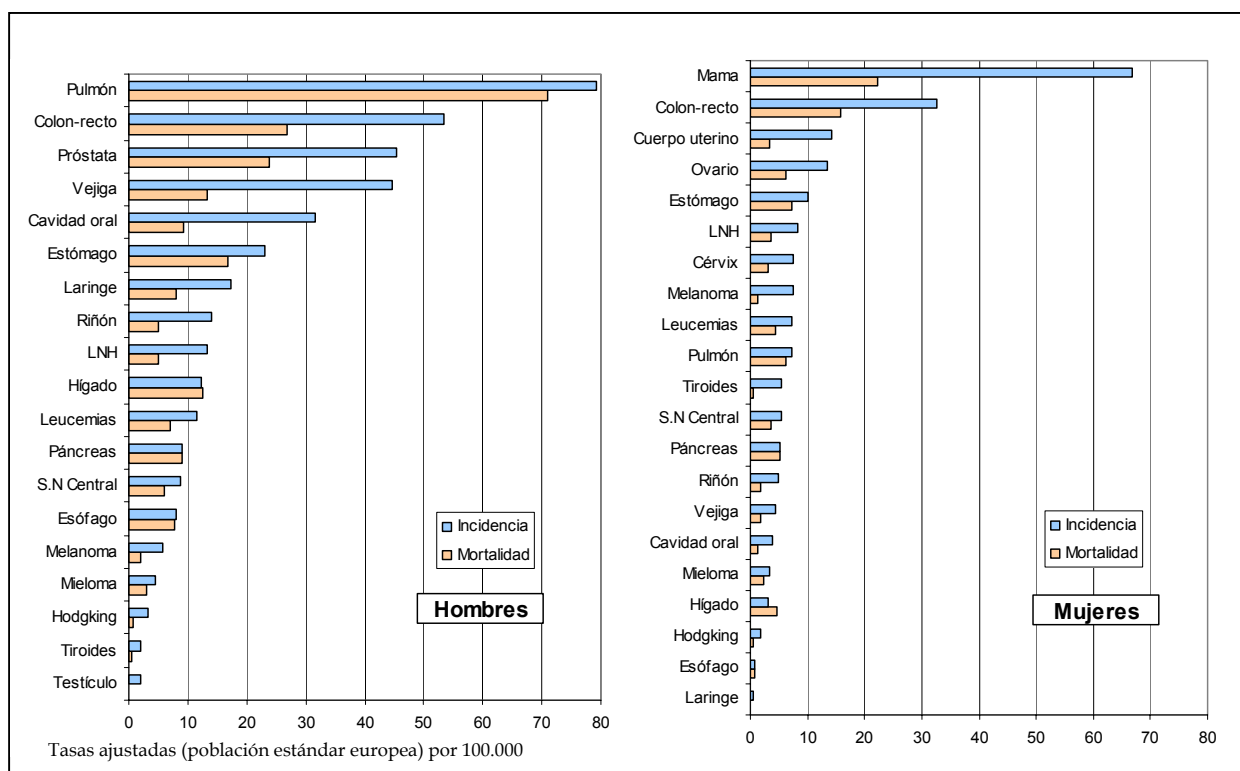


Célula eucariota. de Duve C. "La Célula Viva", p.19
Biblioteca Scientific American 1988

Actividad citotóxica

Actividades biológicas

Bajo el término cáncer se reúne a un grupo diverso de patologías que, en conjunto, suponen la primera causa de muerte en España, ocupando, en lo que a incidencia se refiere, un lugar intermedio en Europa. Durante el año 2000 hubo en España 91623 muertes por cáncer, lo que supuso un 25.6% de todas las defunciones. Existen más de 200 tipos de cánceres malignos, siendo el de pulmón el más importante en cuanto a mortalidad en Occidente. En la Gráfica 1 se muestra la incidencia y mortalidad por cáncer en España en 1998⁴⁴⁹.



Gráfica 1. Incidencia y mortalidad por cáncer en España en 1998

Pese a que existen muchos anticancerígenos de uso clínico, algunos de los cuales como taxol, vincristina, tenipósido y etopósido son obtenidos directa o indirectamente de plantas, la búsqueda de nuevos y mejores antineoplásicos es una importante línea de investigación en la lucha contra el cáncer.

⁴⁴⁹ López-Abente G., Pollán M., Aragonés N., Pérez-Gómez B. Informe sobre la salud de los españoles. Cáncer. Área de Epidemiología Ambiental y Cáncer. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III, Madrid, (2003)

Por esta razón, se decidió evaluar las posibles actividades de la justicidona y sus intermedios sintéticos, así como de los derivados semisintéticos obtenidos a partir del glucósido D3 (compuesto **14**).

Procedimiento

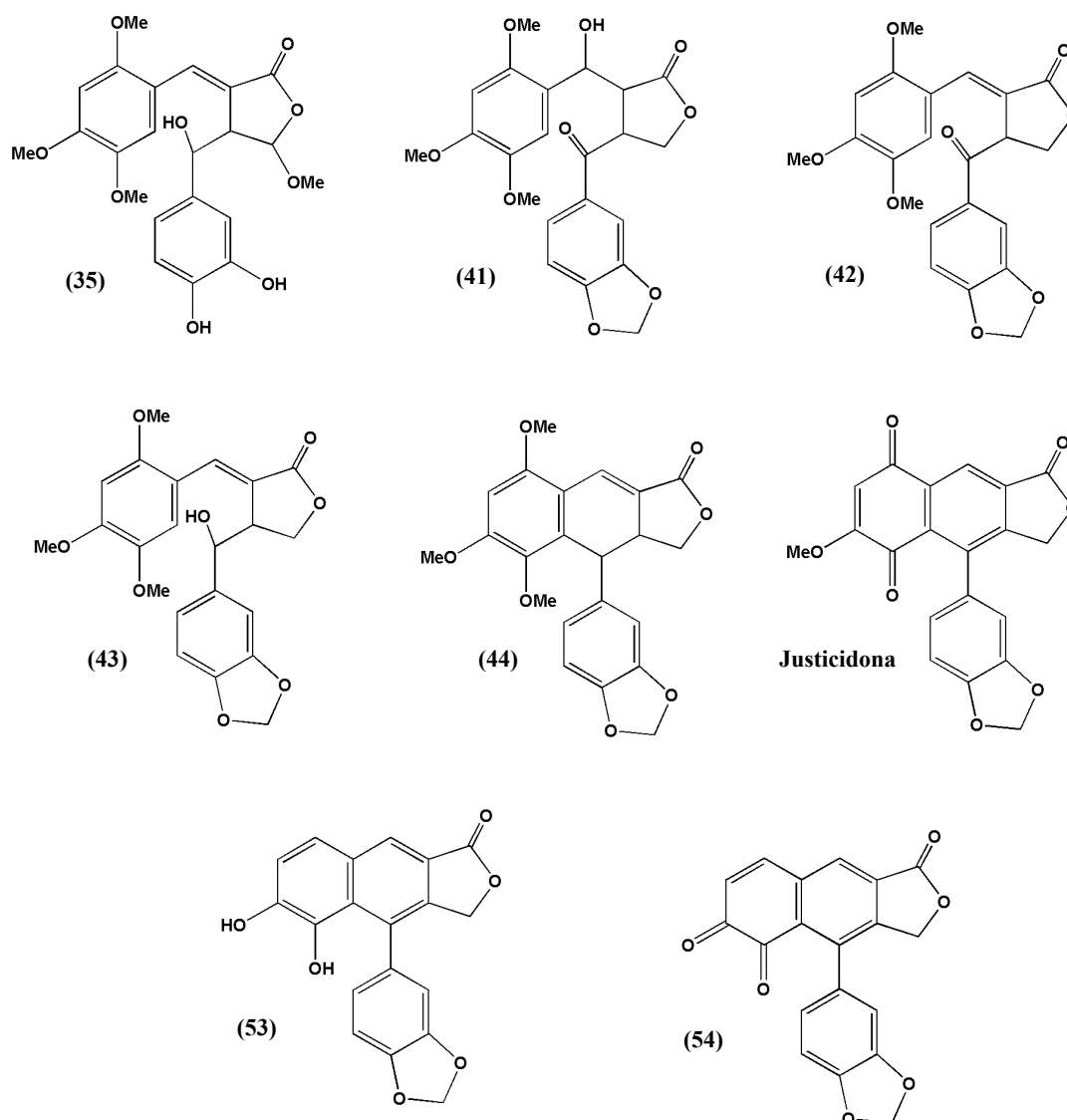
Los ensayos de citotoxicidad fueron llevados a cabo por la Dra. Raquel Gloria Díaz Peñate de la Unidad de Investigación del Hospital de Gran Canaria Dr. Negrín en Las Palmas de Gran Canaria.

Los productos, dados en el Esquema 1, se disolvieron en DMSO a una concentración de 100 ó 50 mM según su solubilidad, se repartieron en alícuotas y se almacenaron, protegidos de la incidencia directa de la luz, hasta su uso a -80°C . Se estudió la supervivencia de células HL60, procedentes de leucemia promielocítica aguda humana, frente a los diferentes productos. Las células se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con un 10% de suero bovino fetal, glutamina, penicilina y estreptomicina a 37°C , en una atmósfera húmeda con un 5% de CO_2 .

Se plantaron 10.000 células por pocillo en placas de 96 y se trataron con distintas dosis de los productos. Después de 72 h, la viabilidad de las células fue estudiada mediante la técnica de reducción de MTT, basada en la capacidad que presentan las células vivas de reducir el MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]2,5-difeniltetrazolio), formándose una sal insoluble de color azul.

Las células se incubaron con una solución de 0.5 mg/ml de MTT en medio de cultivo durante 4 horas, deteniéndose entonces la reacción mediante la adición de un volumen igual de SDS al 20% en HCl 0.02N. Se incubaron las placas a 37°C durante 16 horas hasta la completa disolución de los cristales y se leyó la absorbancia de cada pocillo en un lector de placas a 562 nm.

Los datos de absorbancia se representaron en una gráfica y se ajustaron a una curva dosis-respuesta de pendiente variable, con un programa de gráficos científicos que calculó la CI_{50} (concentración a la que se inhibe el 50% del crecimiento). Los ensayos se repitieron al menos tres veces, indicándose la media y la desviación estándar.



Esquema 1. Lignanos empleados en los ensayos de citotoxicidad

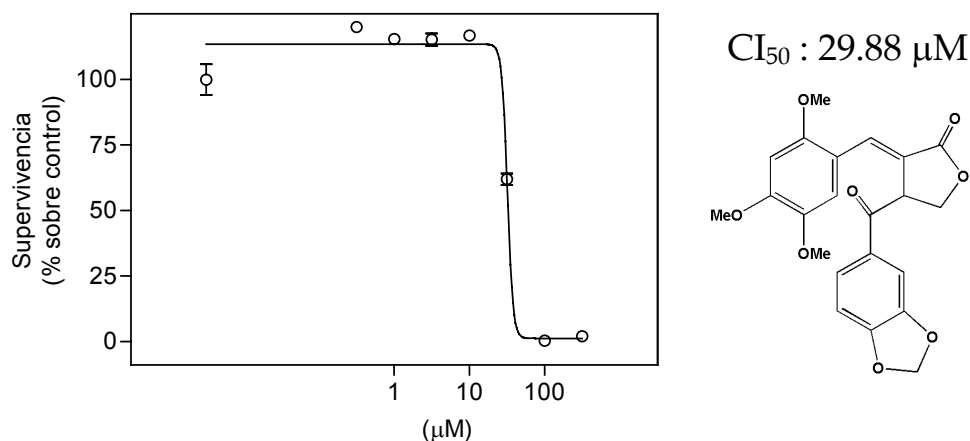
Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2. Los compuestos **35**, **41** y **43** no muestran actividad citotóxica, mientras que **42** y **54** (*o*-quinona) (Gráficas 2 y 3) presentan cierta actividad sobre las células HL60, aunque bastante baja.

La justicidona (Gráfica 4) y su precursor sintético inmediato (compuesto **44**, Gráfica 5) presentan una actividad citotóxica moderada, que es algo más alta para el compuesto **53** (genina del glucósido D3, Gráfica 6) con una CI_{50} de 4.13 μ M. Sin embargo, los fármacos antitumorales comunes tienen CI_{50} inferiores a 1 μ M.

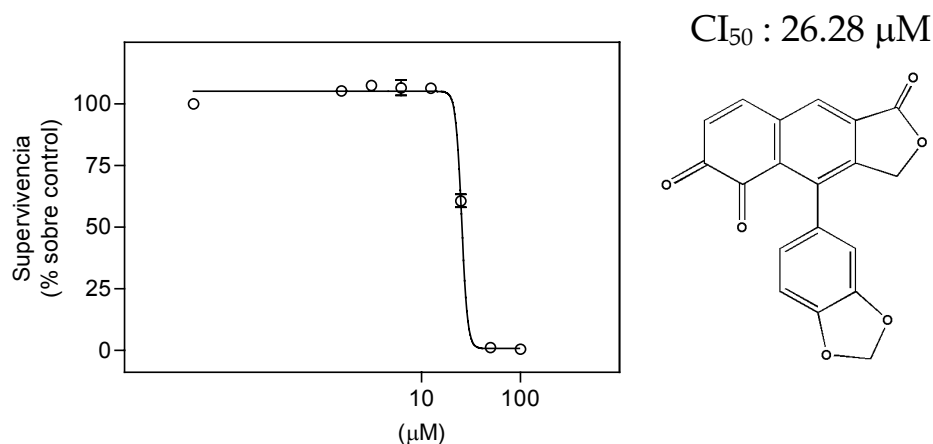
No obstante, si en estudios posteriores estos tres últimos compuestos presentaran buenas características como antitumorales, es decir, selectividad por las células tumorales, detención del ciclo celular e inducción de apoptosis de forma independiente de p53 o de las vías afectadas por el cáncer, quizás sea interesante abrir una nueva línea de investigación consistente en la modificación de dichos compuestos, con el objeto de mejorar su actividad citotóxica.

Producto	CI ₅₀	SD
41	≥ 100	
42	29.877	3.107
43	≥ 100	
44	10.747	0.716
Justicidona	14.048	1.266
35	> 50	
53	4.13233	0.634
54	26.2767	1.895

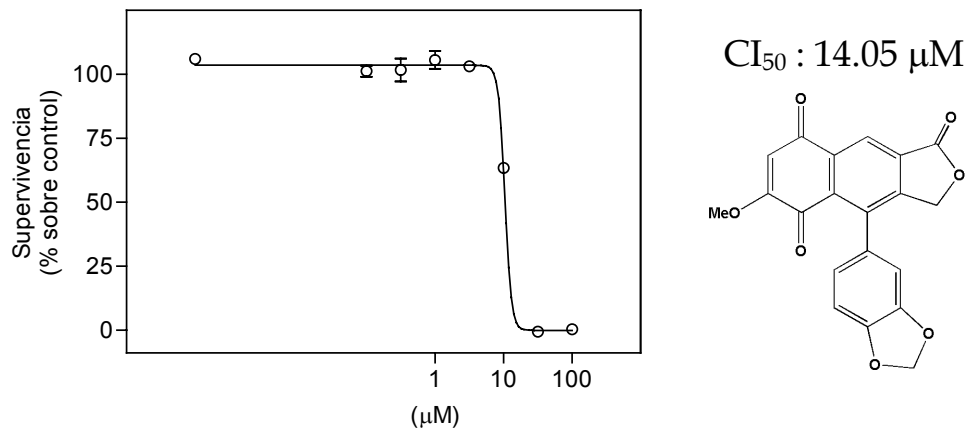
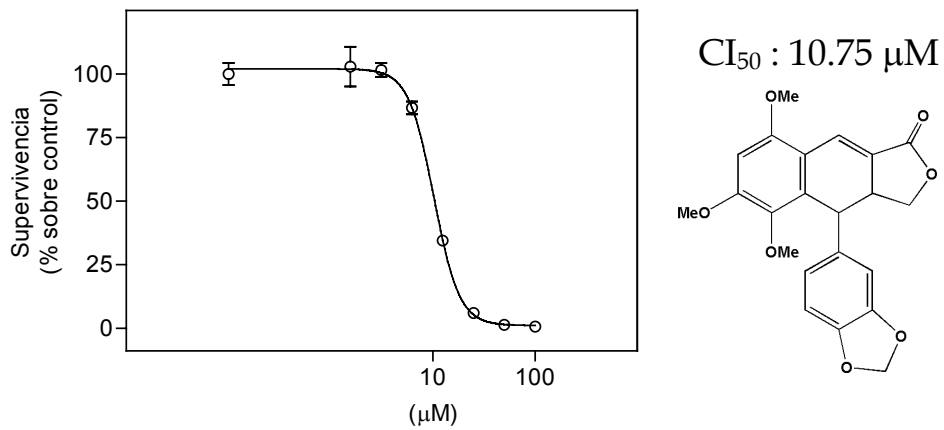
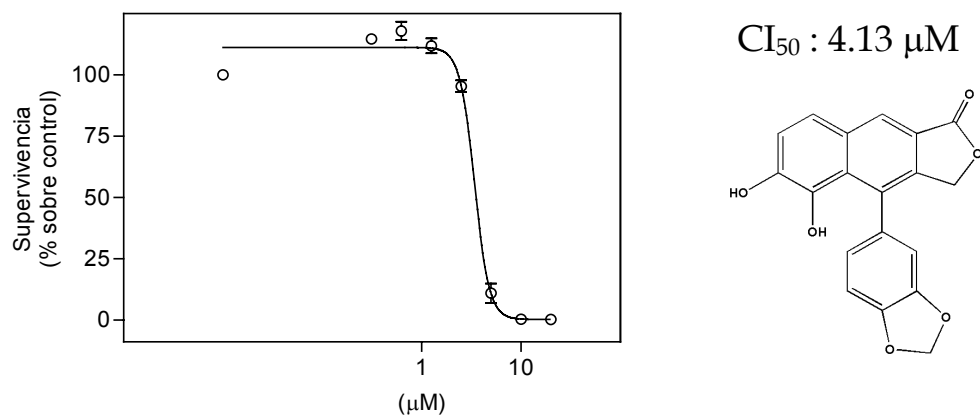
Tabla 2. Ensayo de citotoxicidad. CI₅₀

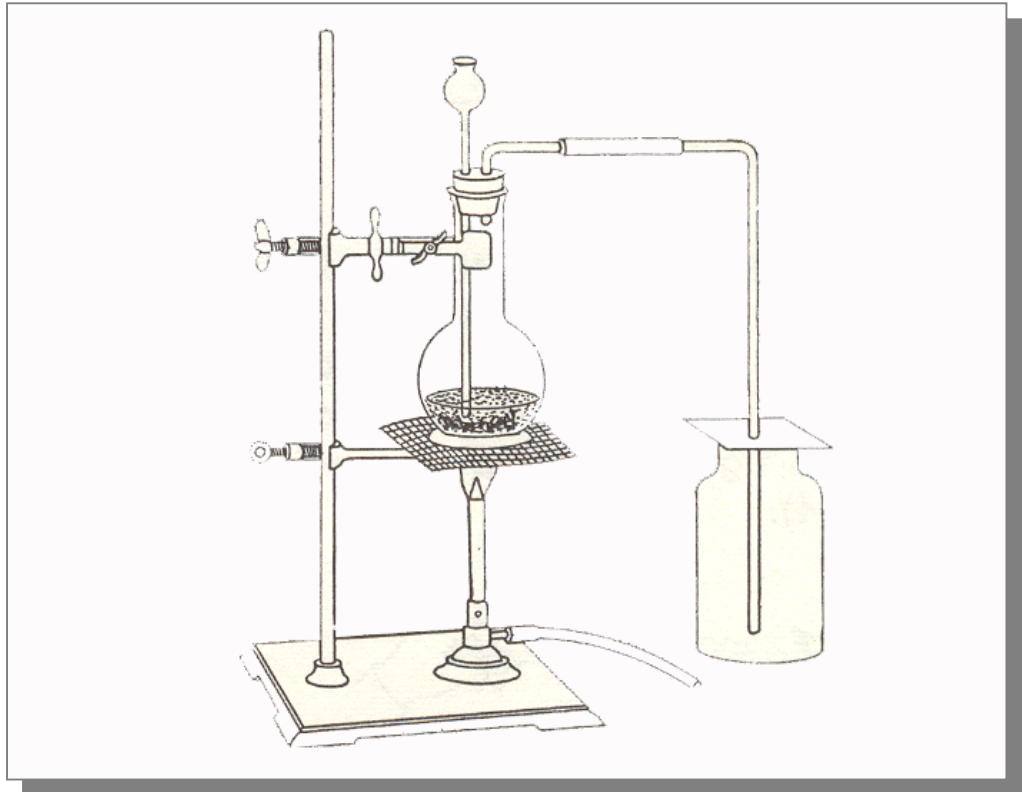


Gráfica 2. Ensayo de citotoxicidad. Curva dosis-respuesta del compuesto 42



Gráfica 3. Ensayo de citotoxicidad. Curva dosis-respuesta del compuesto 54

Gráfica 4. Ensayo de citotoxicidad. Curva dosis-respuesta de **justicidona**Gráfica 5. Ensayo de citotoxicidad. Curva dosis-respuesta del compuesto **44**Gráfica 6. Ensayo de citotoxicidad. Curva dosis-respuesta del compuesto **53**



“Prácticas de laboratorio”. Larrazabal L. Minerva Books, LTD. N.Y. (1965)

Conclusiones

- [1] Se ha realizado una revisión sobre lignanos que incluye sus tipos, su metabolismo y funciones fisiológicas en las plantas, así como sus actividades biológicas, haciendo especial énfasis en los enterolignanos.
- [2] Se han aislado 9 compuestos conocidos de la raíz de *Bupleurum handiense*: 6 lignanos (isokaerofilina, kaerofilina, bursehernina, guamarol, chasnarolido y metilchasnarolido), un polieno (2(Z)-9(Z)-heptadecadien-4,6-diino-1,8-diol), una cumarina (isoescopoletina) y una saikosaponina (saikogenina F).
- [3] Se han aislado 5 lignanos conocidos de *Justicia hyssopifolia*: justicidina E, helioxantina, savinina, sesamina y 3-hidroxi-metil-5- β -D-glucósido-6-hidroxi-4(3,4-metilendioxfenil)-2-lactona del ácido naftoico.
- [4] Se ha aislado y caracterizado, de *Justicia hyssopifolia*, un nuevo lignano arilnaftalénico que posee un sistema *p*-quinónico en su estructura, siendo, hasta la fecha, el primer y único lignano con esta característica descrito en la literatura química.
- [5] Se han llevado a cabo varias aproximaciones a la síntesis total de la justicidona que han puesto de manifiesto la existencia de ciertas dificultades a la hora de emplear los métodos estándar de síntesis para lignanos arilnaftalénicos.
- [6] Se ha diseñado una estrategia sintética para resolver los problemas encontrados que ha permitido llevar a cabo la síntesis total de la justicidona en 8 etapas, mediante una secuencia lineal de reacciones bien conocidas.
- [7] Se ha llevado a cabo un experimento con el objeto de estudiar la dificultad encontrada en la ciclación de uno de los precursores sintéticos de la justicidona (compuesto **32**) y de un análogo de éste (compuesto **42**) sintetizado en una de las aproximaciones. Este experimento permitió además llevar a cabo la síntesis total de la justicidina E en 6 etapas.

- [8] Se ha llevado a cabo la semisíntesis de la justicidona y de la *o*-quinona 4-(1,3-benzodioxol-5-il)nafto[2,3-*c*]furan-1,5,6(3*H*)triona en tres y dos etapas respectivamente, a partir de 3-hidroxi-metil-5- β -D-glucósido-6-hidroxi-4(3,4-metilendioxifenil)-2-lactona del ácido naftoico, lignano muy abundante en *Justicia hyssopifolia*.
- [9] Se ha realizado la acetilación enzimática regioselectiva de secoiridoides de *Jasminum odoratissimum* empleando lipasa pancreática y lipasa de *Candida antarctica*. De este modo se han obtenido nuevos productos difíciles de sintetizar mediante los métodos sintéticos convencionales.
- [10] Se ha determinado la actividad antileishmania de la justicidona y de sus precursores sintéticos. La justicidona y uno de sus precursores sintéticos (**40**) mostraron una actividad moderada contra *Leishmania braziliensis*.
- [11] Se ha determinado la actividad citotóxica de 8 lignanos empleando células HL60, procedentes de leucemia promielocítica aguda humana. La justicidona y su precursor sintético inmediato (**44**) presentan una actividad moderada, que es algo mayor para la genina de 3-hidroxi-metil-5- β -D-glucósido-6-hidroxi-4(3,4-metilendioxifenil)-2-lactona del ácido naftoico (**53**).