

ESTRUCTURAS PRIVILEGIADAS DE ESPECIES DE LA FAMILIA CELASTRACEAE

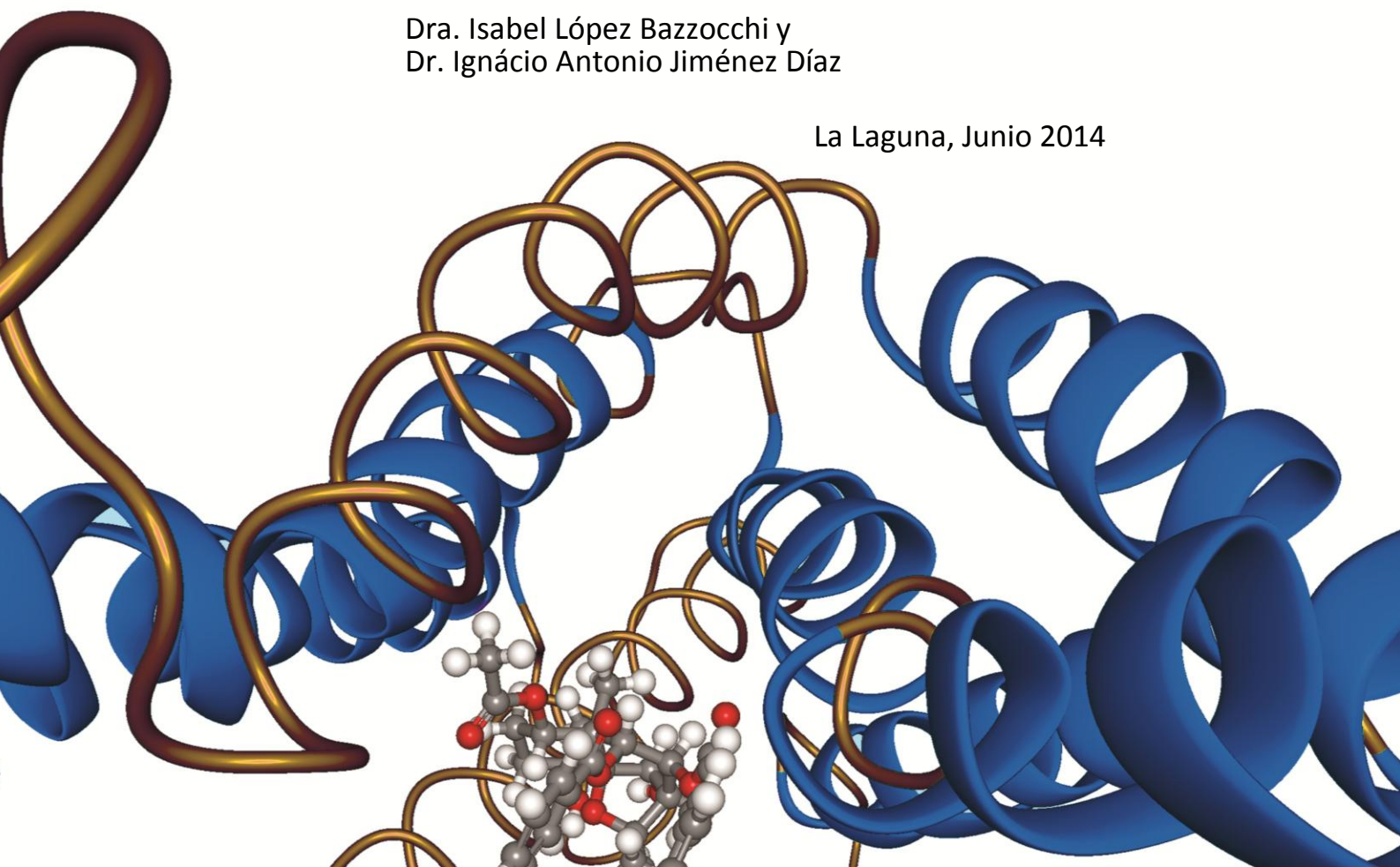
– Fuente para el diseño de nuevos
agentes terapéuticos

Oliver Callies

Directores:

Dra. Isabel López Bazzocchi y
Dr. Ignacio Antonio Jiménez Díaz

La Laguna, Junio 2014



El trabajo de investigación que contiene la presente Memoria fue desarrollado en el Instituto Universitario de Bio-Organica "Antonio González", bajo la dirección de los Doctores Isabel López Bazzocchi e Ignacio Antonio Jiménez Díaz, a quienes expreso mi más profundo agradecimiento por su invaluable ayuda y amistad.

Meinen Eltern
A mis padres

ESTRUCTURAS PRIVILEGIADAS DE ESPECIES DE LA FAMILIA CELASTRACEAE

– Fuente para el diseño de nuevos
agentes terapéuticos

Memoria presentado por

Oliver Callies

para optar al grado de

Doctor por la Universidad de La Laguna

La Laguna, Junio de 2014

AGRADECIMIENTOS

A ellos mi más profundo agradecimiento...

Cuando un sueño se hace realidad, no sólo se le atribuye al empeño que uno mismo pone en realizarlo. Detrás de cada sueño siempre hay muchas personas que nos apoyan y que creen en nosotros. Sin estas personas, nunca habría sido posible llegar a ese objetivo. Son seres especiales que nos animan a seguir adelante en nuestros proyectos, no sólo cuando nos sentimos como náufragos en alta mar, sino también compartiendo tantos momentos de alegría y felicidad, brindándonos, de diferentes maneras, su solidaridad.

Son muchas las personas, a las que me gustaría agradecer su amistad, apoyo, ánimo y compañía en las diferentes etapas de este gran proyecto, el cual ha formado una época importante de mi vida. Algunas están aquí cerca, otras en mis recuerdos y en el corazón. Sin importar en dónde estén o si alguna vez llegan a leer estas dedicatorias, quiero darles las gracias por formar parte de este camino:

Quiero agradecer a mis directores, Isabel y Antonio, quienes, además de guiarme con su valiosa experiencia, así como su sabio y oportuno consejo en todas las tareas relacionados con la realización de esta Tesis Doctoral, me han ofrecido su confianza, su generosidad y su entrañable amistad. ¡Gracias por ser unos Doktorväter espectaculares!

A los profesores y compañeros del grupo QUIMIOPLAN: Juan Carlos (el Boli), Gabi, Nayra, Ariadna, Nuria, Alex, Sandra, David, Alejandro, Lolo, Liliana y Laila. A los que han pasado por el laboratorio durante sus estancias: Cassia, Ninoska, Isabel II, Erica, Sara, Abir, Ines, Marvin Núñez, M^a Luisa, Morena, Javier (el colombiano), Marvin Chavez y Javier (el salvadoreño). Muchas gracias a Uds. por haber tenido la oportunidad, el honor y el placer de compartir el día a día con ustedes, enseñándome las costumbres, la música, los platos, el idioma y muchas cosas más de estas Islas Afortunadas y de Latinamerica, permitiéndome a conocer el mundo y a apreciar esta isla y hacerme sentir un canario más.

A los profesores y compañeros de mi laboratorio de "exilio": Toño, M^a del Mar, Carmen María, José Luis y Gabo, gracias por todo y por haberme tratado como si fuera de vuestro grupo.

A José Gavín y Antonio Daranas, por ser unos colegas espectaculares, gracias por vuestro continuo apoyo, paciencia y amistad durante el trabajo en el Servicio de RMN.

A los grupos que llevaron a cabo las actividades biológicas: al equipo de los Drs. Francisco Gamarro y Santiago Castanys del Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra", Consejo Superior de Investigaciones Científicas en Granada por llevar a cabo la evaluación de las actividades de reversión de la MDR en cáncer. Al equipo de los Drs. Luis-Miguel Bedoya y José Alcamí del Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud de Carlos III en Madrid por la realización de todo el trabajo relacionado con la evaluación de las actividades anti-VIH:

A los grupos QUIBIONAT, SA, SINTESTER y al laboratorio de Fernando Tellado por la prestación de reactivos, así como al grupo de MARINOS por el uso de su balanza.

Al Dr. David Francisco Torres-Romero por la recolección del material vegetal, al Lic. Jorge Alberto Monterosa Salomón por la identificación de la planta, C. vulcanicola, al servicio de Parques Nacionales y Vida Silvestre, Dirección de Recursos Renovables del Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) y a la Fundación Ecológica de El Salvador (Salvanatura) por proporcionar el material vegetal.

Al personal, compañeros del IUBO y a todos los demás, que, de una u otra manera, han aportado su granito de arena en esta Memoria de Tesis.

Asimismo, agradecer a las siguientes instituciones: FEDER, CajaCanarias, SEGAI, al Departamento de Química y a la Universidad de la Laguna por las becas y financiación concedida.

A mis ex-alumnos de alemán, en particular a Carmen-Rosa y Miguel-Ángel, que se han convertido en unos grandes amigos, gracias de todo corazón por vuestra amistad, confianza y apoyo.

A todos los amigos que están lejos y que no se han nombrado antes: Santino, Maria, Daniel, Adrian, Nico, Rüdiger y Steffi, y los de toda la vida: Stefan y Annette. Gracias por vuestra amistad, vuestro respaldo, gracias porque estén y por todos los momentos tan preciosos que hemos pasado y que todavía nos quedan.

Finalmente, y no por ello menos importante, quiero agradecer de todo mi corazón a mi familia soportando la gran distancia, en particular a mi hermana, a mis abuelos y a mis padres, motor que me ha apoyado e impulsado todos estos años a continuar con este proyecto hasta su culminación y a quienes jamás encontrare la forma de agradecer su apoyo, comprensión y confianza.

Vielen Dank euch allen!

ABREVIATURAS

$[\alpha]_D$	Ángulo de la rotación específica usando la línea D del sodio
Ac	Acetil
Ác.	Ácido
AcOEt	Acetato de etilo
Ac ₂ O	Anhídrido acético
AMPBC	Ácido <i>m</i> -cloroperoxibenzoico
Ar	Argón (en reacciones); aromático (en estructuras)
Bz	Benzil
<i>c</i>	Concentración
c	Cuaternario
C	Carbono
°C	Unidad: grados centígrados
CC	Cromatografía en columna
CCF	Cromatografía en capa fina
CCFP	Cromatografía en capa fina preparativa
ccin	<i>cis</i> -Cinamoilo
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CEM	Cromatografía de exclusión molecular
CHCl ₃	Cloroformo
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CI ₅₀	Concentración inhibitoria máxima media
cm	Unidad: centímetros
<i>col.</i>	Colaboradores
COSY	Experimento 2D de RMN de correlación escalar entre ¹ H y ¹ H a corta distancia (<i>Correlation Spectroscopy</i>)
δ	Desplazamiento de una señal en Resonancia Magnética Nuclear en partes por millón. δ _H : en RMN de ¹ H, δ _C : en RMN de ¹³ C
Δ	Doble enlace; diferencia
d	Doblete; Unidad: días
DCC	Diciclohexil-carbodiimida
DCM	Diclorometano
dd	Doble doblete
DE	Desviación estándar

DEPT	Experimento 1D de RMN de ^{13}C (<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>)
DMAP	4-Dimetilaminopiridina
EM	Espectrometría de Masas
EMAR	Espectrometría de Masas de Alta Resolución
eq	Equivalente
ESI	Experimento de MS por ionización por electrospray
EtOH	Etanol
Et ₃ N	Trietilamina
Et ₂ N	Diethylamina
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
g	Unidad: gramos
h	Unidad: horas
H	Protón, Hidrógeno
HMBC	Experimento heteronuclear 2D de RMN (<i>Heteronuclear Multiple Quantum Coherence</i>)
HPLC	Cromatografía líquida de Alta Presión (<i>High Pressure Liquid Chromatography</i>)
HSQC	Experimento heteronuclear 2D de RMN (<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>)
Hz	Unidad: Hertzio
IR	Infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento entre dos núcleos en RMN
K	Unidad: Kelvin
λ	Longitud de onda de la luz
l	Unidad: litro
m	Multiplete
μ	micro
[M]	EM: Ion molecular
<i>m/z</i>	Unidad en EM: masa de una partícula dividida por su carga
MDR	Multirresistencia a fármacos (<i>Multidrug Resistance</i>)
Me	Metilo
MeOH	Metanol
mg	Unidad: miligramos
MHz	Unidad: Megahertzio
mL	Unidad: mililitro
mmol	Unidad: milimol
mol	Unidad: mol
ν	Frecuencia
nm	Unidad: nanómetros
NOE	<i>Nuclear Overhauser Effect</i>
NOESY	Experimento homonuclear de NOE

n.r.	Sin reaccionar
Pgp	Glicoproteína P (<i>P glycoprotein</i>)
PN	Producto natural
ppm	Unidad: partes por millón
py	Piridina
QSAR	Relación cuantitativa estructura-actividad (<i>Quantitative Structure-Activity Relationship</i>)
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN de ¹³ C	RMN de carbono-13
RMN de ¹ H	RMN de protón
ROE	<i>Rotatory Overhauser Effect</i>
ROESY	Experimento homonuclear de ROE (<i>Rotatory Frame Overhauser Effect Spectroscopy</i>)
s	Singulete
s _A	Singulete ancho
SAR	Relación estructura-actividad (<i>Structure-Activity Relationship</i>)
t	Triplete
t _A	Triplete ancho
t.a.	temperatura ambiente
tcin	<i>trans</i> -Cinamoilo
TPL	Triterpeno de la serie del lupano
US	Ultrasonido
UV	Espectroscopía de ultravioleta
VEP	Virus de Epstein-Barr
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	
LOS PRODUCTOS NATURALES Y LA FAMILIA CELASTRACEAE EN EL DESARROLLO DE FÁRMACOS	1
1.1. Introducción	3
1.2. Modificaciones estructurales	8
1.3. Familia Celastraceae, fuente de nuevos agentes terapéuticos	14
2. OBJETIVOS	21
3. SESQUITERPENOS	
LOS SESQUITERPENOS DIHIDRO- β -AGAROFURÁNICOS Y SU POTENCIAL REVERTIDOR DE LA MDR EN CÁNCER	25
3.1. Introducción	27
3.2. Resultados y discusión	43
3.2.1 Sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos aislados de las hojas de <i>Celastrus vulcanicola</i>	43
3.2.2 Modificaciones estructurales: Preparación de una quimioteca de sesquiterpenos	77
3.3. Parte experimental	112
3.3.1 Aislamiento de los sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos de las hojas de <i>Celastrus vulcanicola</i>	112
3.3.2 Datos físicos, espectrométricos y espectroscópicos de los metabolitos aislados de las hojas de <i>C. vulcanicola</i>	119
3.3.3 Procedimiento general de la preparación de una quimioteca de derivados agarofuránicos	140
3.3.4 Condiciones de reacción, datos físicos, espectrométricos y espectroscópicos de los análogos de los sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos	142

3.4. Actividad revertidora de la multirresistencia a fármacos en cáncer de los sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos	284
3.4.1 Introducción	284
3.4.2 Resultados y discusión: Determinación de la actividad revertidora de la multirresistencia a fármacos en cáncer	293
4. TRITERPENOS	
LOS TRITERPENOS DE LA SERIE DE LUPANO Y SU POTENCIAL ANTI-VIH	329
4.1. Introducción	331
4.2. Resultados y discusión: Modificaciones estructurales de triterpenos de la serie de lupano: preparación de una quimioteca para modular la actividad anti-VIH	341
4.2.1 Transformaciones de los triterpenos de la serie de lupano naturales	344
4.2.2 Modificaciones en los alcoholes sobre C-3 y C-28	344
4.2.3 Modificación de la unidad de isopropenilo	356
4.2.4 Introducción de átomos de halógeno	362
4.3. Parte experimental: Preparación de una quimioteca de triterpenos de la serie de lupano	364
4.4. Actividad anti-VIH de los triterpenos de la serie de lupano	394
4.4.1 Introducción	394
4.4.2 Resultados y discusión	400
4.4.3 Estudios de relación estructura-actividad	416
5. TÉCNICAS EXPERIMENTALES	419
6. CONCLUSIONES DE ESTA MEMORIA DE TESIS DOCTORAL	423

I

Capítulo

INTRODUCCIÓN

LOS PRODUCTOS NATURALES
Y LA FAMILIA Celastraceae
EN EL DESARROLLO DE
FÁRMACOS

PRODUCTOS NATURALES Y DESARROLLO DE FÁRMACOS



1 | LOS PRODUCTOS NATURALES Y LA FAMILIA *Celastraceae* EN EL DESARROLLO DE FÁRMACOS

1.1 | INTRODUCCIÓN

Todos los mecanismos de la vida dependen de una maquinaria compleja de procesos químicos, regulados por enzimas, que convierten los sustratos incorporados del medio, permitiendo al organismo mantenerse, crecer y reproducirse. Aquellas sustancias que están presentes en todos los organismos y son esenciales para los procesos básicos de la vida, como son los carbohidratos, proteínas, grasas ó ácidos nucleicos, se conocen como **metabolitos primarios**. Por otra parte, los **metabolitos secundarios son** aquellos que están presentes sólo en determinados grupos de organismos y confieren una cierta ventaja al organismo¹.

Relevancia de los productos naturales como fármacos

El uso de los productos naturales **para curar enfermedades**, heridas o para combatir parásitos mediante estrategias básicas, es una práctica habitual entre los animales. El puma, por ejemplo, cada vez que muestra señales de debilidad o enfermedad, ingiere la corteza del árbol *Chinchona*, fuente natural de quinina, ó los chimpancés usan ciertas plantas como anticonceptivo. Así, imitando y perfeccionando el comportamiento de los animales, el hombre, ya desde épocas remotas, ha usado la naturaleza **como fuente de agentes medicinales**^{2,3}.

Aún hoy en día, la **importancia de los productos naturales** es indiscutible^{4,5}. Eso se debe, por un lado, a la tendencia a nivel mundial por lograr una mejor calidad de vida,

¹ DEWICK, P. M. *Medicinal Natural Products: A biosynthetic approach*, 3ª edición. Wiley-Blackwell, Oxford, UK, 2009.

² CLAYTON, D. H.; WOLFE, N. D. (1993). The adaptive significance of self-medication. *Trends Ecol. Evol.*, 8(2),60–63.

³ HART, B. L. (2011). Behavioural defences in animals against pathogens and parasites: parallels with the pillars of medicine in humans. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 366, 3406–3417.

⁴ BAUER, A.; BRÖNSTRUP, M. (2014). Industrial natural product chemistry for drug discovery and development. *Nat. Prod. Rep.*, 31, 35–60.

⁵ VASILEVICH, N. I.; KOMBAROV, R. V.; GENIS, D. V.; KIRPICHENOK, M. A. (2012). Lessons from Natural Products Chemistry Can Offer Novel Approaches for Synthetic Chemistry in Drug Discovery. *J. Med. Chem.*, 55, 7003–7009.

más sana y sostenible, que, actualmente, representa un mercado estimado de 290.000 millones de dólares en los Estados Unidos⁶. Por otra parte, la política en muchos países se ha sensibilizado con el uso de sustancias tóxicas o alergénicas, resultando, por ejemplo en Alemania, en la prohibición del uso de productos sintéticos para la tinción del cabello en menores de 16 años⁷. Este recelo por el uso de compuestos de origen sintético ha desencadenado un aumento del consumo de productos cosméticos, dietéticos, nutracéuticos y farmacéuticos de fuentes naturales.

Sin embargo, esta evolución no se refleja del todo en la investigación. Así, durante los últimos 40 años, la **investigación en productos naturales** ha estado sometida a considerables fluctuaciones, alcanzando su auge durante el período comprendido entre los años 1970 y 1980 debido, fundamentalmente, al impulso dado por la industria farmacéutica. Sin embargo, en la década de los años 90, se produjo un declive en la investigación en este campo, debido al desarrollo a la química combinatoria, a la aparición de técnicas de evaluación *in vitro* de alto rendimiento (*High-throughput in vitro screening*), la convención de Río del 1992, los avances en Biología Molecular ó la falta de interés en las terapias para enfermedades infecciosas^{8,9}.

Recientemente, el desarrollo de grandes quimiotecas para su posterior **evaluación de alto rendimiento** ha cedido paso a quimiotecas pequeñas, formadas por entre 100 y 3000 compuestos y con motivos estructurales que se asemejen a los presentes en productos naturales^{10,11,12}. Esta metodología, conocida como *síntesis orientada a la diversidad*, tiene como característica la presencia de heteroátomos y un gran número de centros quirales en las moléculas, e, incluso, se diseñan compuestos que mimeticen el comportamiento biológico de productos naturales^{13,14}.

⁶ LOHAS – *Lifestyles of Health and Sustainability* [en línea]. [Fecha de consulta: 25 de mayo de 2014]. Disponible en internet: <http://www.lohas.com>

⁷ HOFFMANN, M. (2013). *Trend zu Naturhaarfärbungen: Walnussbraun oder Hibiskusrot*. [en línea]. Spiegel Online. [Fecha de consulta: 25 de mayo de 2014]. Disponible en internet: <http://www.spiegel.de/gesundheit/diagnose/naturhaarfärbungen-im-trend-walnussbraun-oder-hibiskusrot-a-889835.html>

⁸ KOEHN, F. E.; CARTER, G. T. (2005). The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 4(3), 206–220.

⁹ PHILLIPSON, J. D. (2001). Phytochemistry and medicinal plants. *Phytochem.*, 56, 237–243.

¹⁰ BREINBAUER, R.; VETTER, I. R.; WALDMANN, H. (2002). From protein domains to drug candidates: Natural products as guiding principles in the design and synthesis of compound libraries. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 41, 2878–2890.

¹¹ EVANS, B. E.; RITTLE, K. E.; BOCK, M. G.; DIPARDO, R. M.; FREIDINGER, R. M.; WHITTER, W. L.; LUNDELL, G. F.; VEBER, D. F.; ANDERSON, P. S. (1988). Methods for drug discovery: development of potent, selective, orally effective cholecystokinin antagonists. *J. Med. Chem.*, 31(12), 2235–2246.

¹² WELSCH, M. E.; SNYDER, S. A.; STOCKWELL, B. R. (2011). Privileged scaffolds for library design and drug discovery. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 14(3), 347–361.

¹³ WETZEL, S.; BON, R. S.; KUMAR, K.; WALDMANN, H. (2011). Biology-Oriented Synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 50, 10800–10826.

Aunque la **Química Combinatoria** ha sido usada en el 70% de los estudios realizados durante para desarrollo de nuevos fármacos en los últimos 30 años, sólo ofreció un fármaco al mercado, el sorafenib¹³. Sin embargo, en la optimización estructural de un nuevo *cabeza de serie*, el uso de la Química Combinatoria resulta, hoy día, una aproximación acertada para el desarrollo de un nuevo fármaco¹⁵. A pesar de todo, la aprobación de nuevas sustancias activas, también conocidas como nuevas entidades químicas, en los últimos 30 años, está en declive (Fig. 1.1)¹³ y, de hecho, muchas de las grandes empresas farmacéuticas han abandonado la búsqueda de nuevas entidades químicas¹⁶.

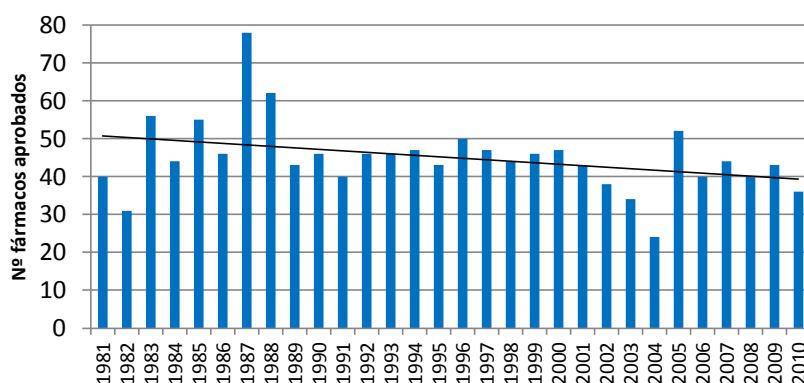


Fig. 1.1 | Número de fármacos aprobados por año (1981–2010).

Los **productos naturales**, sin lugar a dudas, han jugado un papel clave en el descubrimiento de nuevos fármacos, quedando reflejado en la cantidad de fármacos comercializados de origen natural y derivados sintéticos en las últimas décadas.

El cuarto análisis realizado por NEWMAN y CRAGG¹³ del origen de los fármacos más comercializados, cubriendo el periodo 1981–2010, mostró la continua contribución de la naturaleza, no sólo como fuente de potenciales agentes quimioterapéuticos, sino también como compuestos líderes que aportan inspiración para la semisíntesis o síntesis total de nuevos fármacos. En éste análisis, los fármacos fueron clasificados como (Fig. 1.2): productos naturales (N), productos naturales vegetales (NB), semisintéticos de productos naturales (ND), compuestos sintéticos (S), compuestos sintéticos basados

¹⁴ NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. (2012). Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.*, 75, 311–335.

¹⁵ LACHANCE, H.; WETZEL, S.; KUMAR, K.; WALDMANN, H. (2012). Charting, navigating, and populating natural product chemical space for drug discovery. *J. Med. Chem.*, 55(13), 5989–6001

¹⁶ PAULI, G. F.; CHEN, S.-N.; FRIESEN, J. B.; MCALPINE, J. B.; JAKI, B. U. (2012). Analysis and purification of bioactive natural products: the AnaPurNa study. *J. Nat. Prod.*, 75, 1243–1255.

en el farmacóforo de un producto natural (S*) y compuestos que mimetizan un producto natural (S/NM y S*/NM). Así, los productos naturales, incluyendo productos de origen vegetal y semisintéticos de productos naturales (N, NB, ND), representaron el 50% de todas las entidades químicas aprobadas para su uso en clínica (Fig. 1.2)¹³.

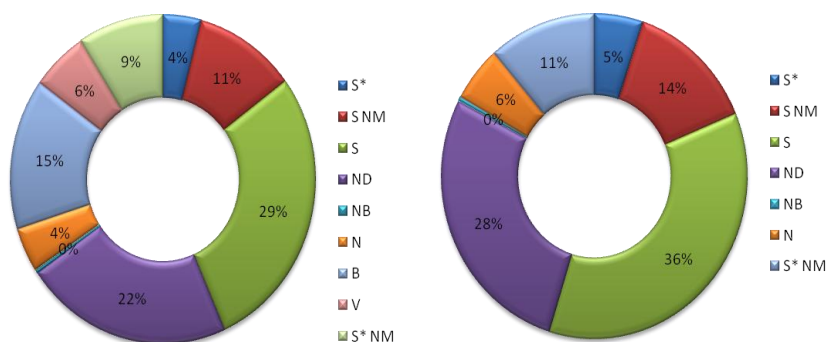


Fig. 1.2 | Fármacos (izquierda) y moléculas pequeñas (derecha) aprobados para su uso en clínica.

Analizando este período, los productos naturales (N, NB y ND) representan un 26% de los fármacos aprobados y un 34% de los fármacos basados en moléculas pequeñas. Si se incluyen los compuestos miméticos de un producto natural y basados en un farmacóforo de un producto natural¹³.

El potencial terapéutico de los productos naturales se debe a su capacidad de interactuar con una amplia variedad de receptores biológicos¹⁷, razón por la cual son considerados *estructuras privilegiadas*. Ello se debe a que estos metabolitos secundarios han sido sintetizados bajo la acción catalítica de proteínas y, por lo tanto, tienden a interactuar con estructuras semejantes. Por otra parte, han sido seleccionados y validados por la evolución durante miles de millones de años¹⁰.

Estos datos, unido a la falta de agentes específicos para curar ciertas enfermedades, la acelerada degradación del medio ambiente con la consiguiente pérdida de especies vegetales de incalculable valor, pero sobre todo, por la extraordinaria diversidad y complejidad de los productos naturales, difíciles de imitar en el laboratorio, hacen que los metabolitos secundarios sigan siendo una excelente alternativa en la búsqueda de agentes quimioterápicos para la medicina moderna^{16,18,19}.

¹⁷ KOCH, M. A.; WALDMANN, H. (2005). Protein structure similarity clustering and natural product structure as guiding principles in drug discovery. *Drug Discov. Today*, 10(7), 471–483.

¹⁸ BALUNAS, J. M.; KINGHORN, K. (2005). Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences*, 78, 431–441.

¹⁹ HARVEY, A. L. (2008). Natural products in drug discovery. *Drug Discov. Today*, 13(19/20), 894–901.

Proceso en el desarrollo de fármacos

Uno de los fármacos que más se ha consumido a nivel mundial a lo largo de la historia, es la Aspirina. Su desarrollo tiene una larga historia y empieza con la aplicación de la corteza del “sauce” como analgésico, representando uno de los remedios naturales más antiguos en Europa. En el siglo XIX, se aisló el producto responsable de su efecto farmacológico, la salicina, seguido por su transformación química en el principio activo, ácido salicílico. Al presentar graves efectos secundarios, ya que provoca úlceras gástricas, y dado que se conoce que el efecto fisiológico que produce una molécula está relacionado con su estructura, en el año 1897, la empresa alemana Bayer sintetizó el ácido acetilsalicílico por acetilación del producto natural, dando origen al compuesto que fue patentado bajo el nombre Aspirina²⁰.

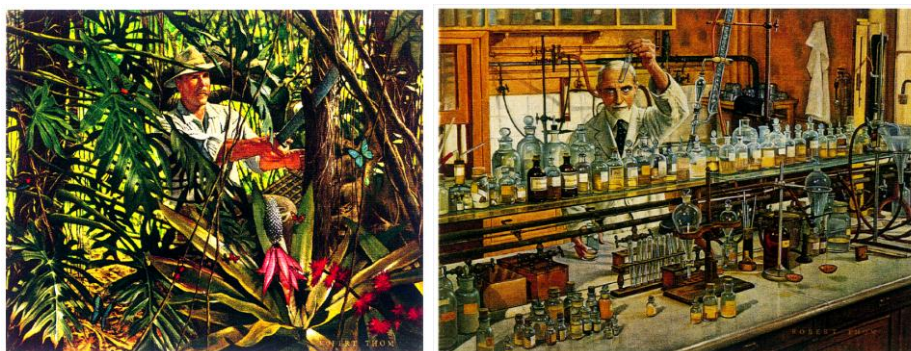


Fig. 1.3 | El proceso en la búsqueda de nuevos productos naturales como agentes terapéuticos comienza con la búsqueda del material vegetal, seguido por el estudio fitoquímico y aislamiento de los metabolitos. (Imágenes: R. Thom: "Wresting the jungle's secrets" y "The development of chemotherapy. De: Phillipson, 2001).

El **desarrollo de un fármaco** es un proceso largo, laborioso y conlleva un alto riesgo económico, ya que se requiere una media de 12–24 años hasta su aprobación y un costo de más de 800 millones de dólares^{21,22}. Las fases implicadas se pueden resumir en: una fase preclínica, que incluye el aislamiento, determinación estructural y optimización de un compuesto *líder*, así como la evaluación en animales. En la fase clínica I, se realizan estudios farmacocinéticos y farmacodinámicos en humanos sanos, seguido por las fases clínicas II (evaluación de la eficacia preliminar y relación dosis-respuesta en pacientes) y

²⁰ SCHRÖR, K. (2009). *Acetylsalicylic acid*. Weinheim, Alemania: Wiley-VCH GmbH & Co. KGaA.

²¹ DIMASI, J. A.; HANSEN, R. W.; GRABOWSKI, H. G. (2003). The price of innovation: new estimates of drug development costs. *J. Health Econ.*, 22(2), 151–185.

²² MORGAN, S.; GROOTENDORST, P.; LEXCHIN, J.; CUNNINGHAM, C.; GREYSON, D. (2011). The cost of drug development: a systematic review. *Health Policy*, 100(1), 4–17.

III (eficacia y seguridad del fármaco en las condiciones de uso habituales), seguido por su aprobación por la FDA (US. Food and Drug Administration) o la EMEA (European Medicines Agency). Los ensayos de fase clínica IV se realizan con el medicamento después de su comercialización y pueden ser similares a los descritos en las fases I, II y III, si estudian algún aspecto aún no valorado o condiciones de uso distintas de las autorizadas como podría ser una nueva indicación²³ (Fig. 1.4).

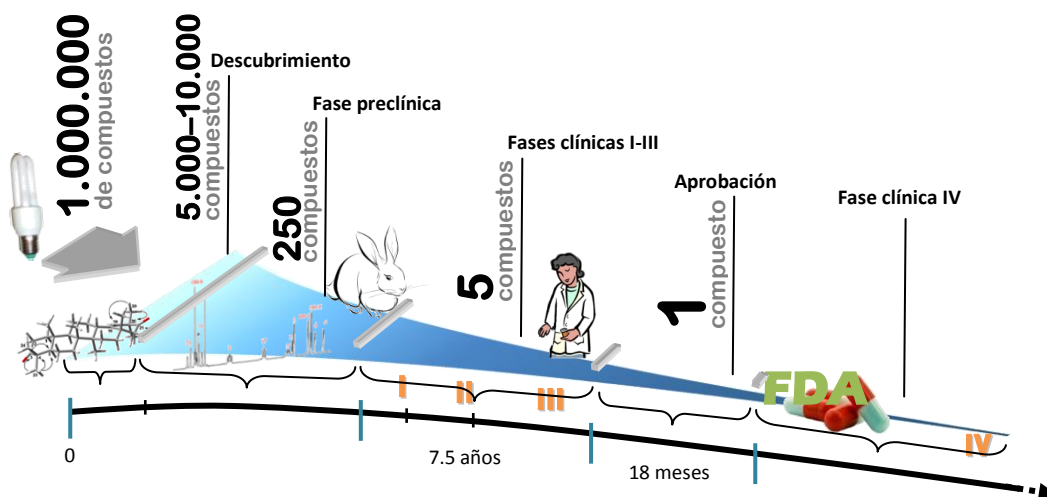


Fig. 1.4 | Etapas en el desarrollo de un nuevo fármaco.

1.2 | MODIFICACIONES ESTRUCTURALES

Con el objetivo de explotar el potencial de los productos naturales en el diseño de nuevos agentes terapéuticos más potentes, más selectivos y menos tóxicos²⁴, la **modificación estructural de un prototipo o cabeza de serie**, optimizando sus propiedades farmacológicas, es indispensable en el desarrollo de cualquier fármaco. Incluso si no se llegan a conseguir análogos con un mejor perfil farmacológico, las correlaciones cualitativas y cuantitativas que se pueden establecer entre las modificaciones estructurales realizadas y los datos de actividad biológica, son fundamentales para determinar el farmacóforo.

²³ RAVINA, E.; KUBINYI, H. (2011). *The evolution of drug discovery*. Weinheim, Alemania: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

²⁴ MANG, C.; JAKUPOVIC, S.; SCHUNK, S.; AMBROSI, H.-D.; SCHWARZ, O.; JAKUPOVIC, J. (2006). Natural products in combinatorial chemistry: an andrographolide-based library. *J. Comb. Chem.*, 8, 268-274.

A la hora de realizar modificaciones estructurales a partir de un *cabeza de serie* se pueden seguir una serie estrategias bien establecidas en Química Médica²⁵:

Simplificación estructural (aproximación disyuntiva). Partiendo de una estructura compleja, se realizan simplificaciones progresivas de la molécula, haciéndola más asequible desde el punto de vista sintético. Ejemplos de la simplificación de la estructura del *cabeza de serie* morfina son la meperidina, un potente narcótico y analgésico, y la metadona, con potente actividad analgésica (Fig. 1.5).

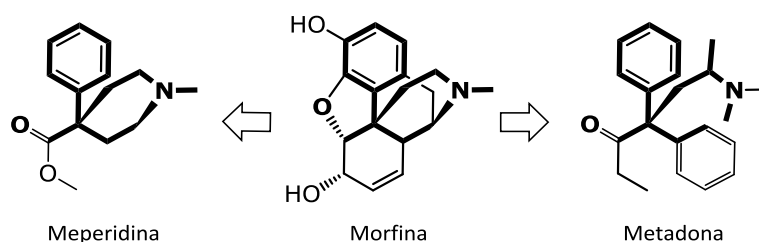


Fig. 1.5 | Simplificación de la morfina. El farmacóforo está representado en trazo más grueso.

Moléculas híbridas. Una estrategia para potenciar la actividad biológica consiste en la unión de dos moléculas bioactivas, con estructuras iguales (homodímero) o diferentes (heterodímero), dando lugar a moléculas híbridas²⁶. Así, por ejemplo, el analgésico benorilato es el éster formado a partir del paracetamol y del ácido acetilsalicílico (Fig. 1.6).

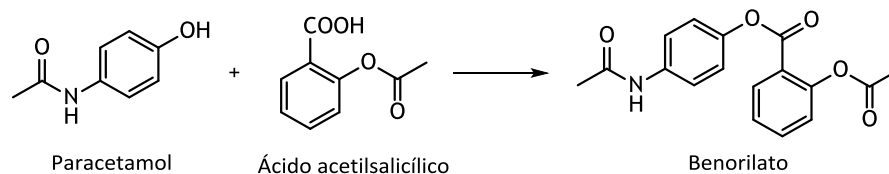


Fig. 1.6 | El benorilato, heterodímero del paracetamol y el ácido acetilsalicílico.

Variación de sustituyentes. El intercambio de un sustituyente por otro en una molécula bioactiva puede modificar sus propiedades físico-químicas, tales como solubilidad, densidad electrónica, conformación ó biodisponibilidad, y por consiguiente su perfil farmacológico. Así, la transformación de un grupo hidroxilo (la morfina) en un metoxilo (codeína) modifica la actividad de analgésico a antitusivo²⁷ (Fig. 1.7).

²⁵ Wermuth, C. G. (2008). *The Practice of Medicinal Chemistry*. (3ª ed.) London, San Diego: Elsevier.

²⁶ BALDWIN, J., LUMMA, W. C., Jr.; LUNDELL, G. F.; PONTICELLO, G. S.; RAAB, A. W.; ENGELHARDT, E. L.; HIRSCHMANN, R.; SWEET, C. S.; SCRIBINE, A. (1979). Symbiotic approach to drug design: antihypertensive β -adrenergic blocking agents. *J. Med. Chem.*, 22, 1284–1290.

²⁷ TOPLISS, J. G. (1977). A manual method for applying the Hansch approach to drug design. *J. Med. Chem.*, 20(4), 463–469.

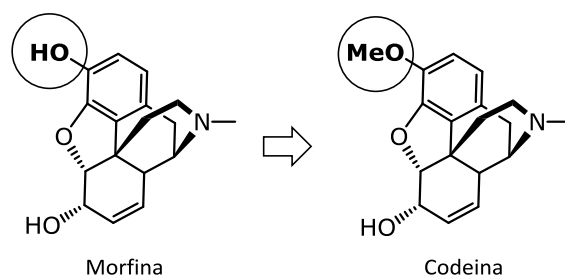


Fig. 1.7 | Variación del sustituyente en opiáceos.

Aumento de la rigidez y/o complejidad (aproximación conjuntiva). Se basa en aumentar la complejidad del producto de partida, mediante la generación de anillos o la introducción de insaturaciones, lo que disminuye la libertad conformacional, aumentando así la selectividad y por consiguiente, reduciendo los efectos secundarios. Como ejemplo, el cromakalim con actividad hipotensora, fue preparado a partir de β -bloqueantes con estructura de fenilpropanolamina (Fig. 1.8)²⁸.

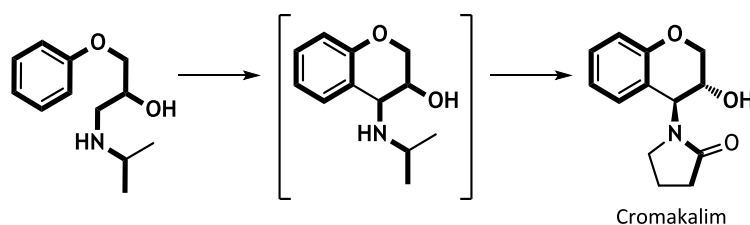


Fig. 1.8 | Análogos cíclicos de fenilpropanolamina.

Extensión y contracción de anillos. Éstas se pueden entender como la preparación de series homólogas. Así, por ejemplo, en los análogos del enalaprilato, un hipotensor que inhibe el enzima angiotensina convertasa, se puede observar que, al aumentar el tamaño del anillo se incrementa la actividad inhibidora²⁹ (Fig. 1.9).

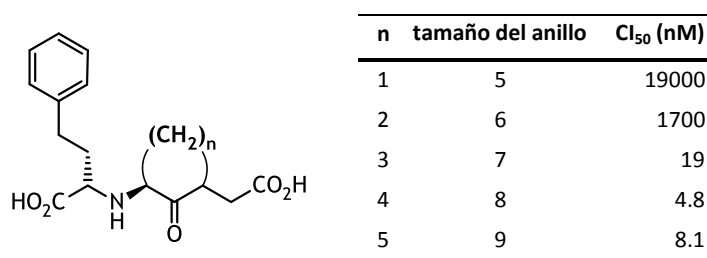


Fig. 1.9 | Extensión de anillos: Análogos del enalaprilato.

²⁸ EVANS, J. M., FAKE, C. S.; HAMILTON, T. C.; POYSER, R. H.; WATTS, E. A. (1983). Synthesis and antihypertensive activity of substituted trans-4-amino-3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-1-benzopyran-3-ols. *J. Med. Chem.*, 26(11), 1582-1589.

²⁹ THORSETT, E. D.; HARRIS, E.; ASTER, S.; PETERSON, E.; SNYDER J.; HIRSCHFELD, J.; TRISTAM, E.; PATCHETT, A.; ULM, E.; TASSIL, T. (1986). Conformationally restricted inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Synthesis and computations. *J. Med. Chem.*, 29(2), 251-260.

Formación de bioisómeros: Los grupos de átomos o moléculas que tienen propiedades físicas y químicas semejantes y producen efectos fisiológicos similares o antagónicos, se les conoce como bioisómeros²⁵. El tiofeno es un bioisómero del benceno, porque la longitud del enlace C=C en el benceno se corresponde con el diámetro del átomo de azufre³⁰ (Fig. 1.10).

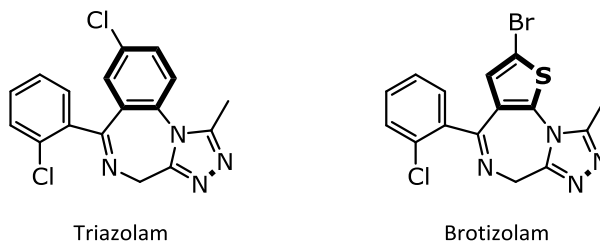


Fig. 1.10 | Benzodiazepinas bioisostéricas.

Reglas para establecer la estrategia adecuada

Una vez analizadas las posibilidades de modificaciones que se pueden realizar en la estructura de un *cabeza de serie*, se debe planificar una estrategia, siguiendo una serie de reglas establecidas en Química Médica:

- **Regla de las modificaciones mínimas:** consiste en la preparación de análogos estructuralmente similares al *cabeza de serie*, mediante reacciones orgánicas sencillas, como hidrogenaciones, hidroxilaciones, acetilaciones, variación de sustituyentes.
- **Regla del patrón biológico:** las modificaciones se basan en estructuras de compuestos con comprobada actividad biológica.
- **Regla de la síntesis sencilla:** Es conveniente la preparación de compuestos que requieren una síntesis en pocos pasos, altos rendimientos y reactivos económicos.
- **Regla de la eliminación de centros quirales:** La síntesis de moléculas aquirales es una estrategia para facilitar su síntesis.
- **Regla del estudio de relaciones estructura-actividad:** El estudio SAR realizada con un *cabeza de serie* y sus correspondientes derivados, conlleva a la obtención de análogos que validen los requisitos estructurales para la actividad.

³⁰ SIEBERT, C. D. (2004). Das Bioisosterie-Konzept: Arzneistoffentwicklung. *Chem. Unserer Zeit*, 38(5), 320–324.

La finalidad de dichos estudios es determinar las características esenciales en una molécula para la expresión de la bioactividad. El hecho de que las propiedades biológicas de un compuesto son función de sus propiedades fisicoquímicas permite desarrollar un modelo que proporciona información de las características moleculares ideales e incluso aporta información de su mecanismo de acción, lo que permite el diseño racional de fármacos, mejorando el perfil farmacológico del compuesto³¹.

Así, el estudio de los efectos que tienen ciertas modificaciones estructurales de un determinado *cabeza de serie* en su actividad permite modificar la estructura de un compuesto a fin de optimizar su actividad farmacológica para obtener un fármaco más selectivo, potente y menos tóxico. Esta correlación entre la estructura de una molécula y su actividad biológica, se conoce como **relación estructura-actividad** (*structure-activity relationship, SAR*). Un ejemplo de estudios SAR es el que se llevó a cabo con el paclitaxel (taxol), producto natural usado actualmente en clínica como anticancerígeno. Tras un gran número de modificaciones estructurales se pudieron determinar los motivos estructurales en la molécula imprescindibles para la expresión de su actividad, es decir, el farmacóforo (Fig. 1.11).

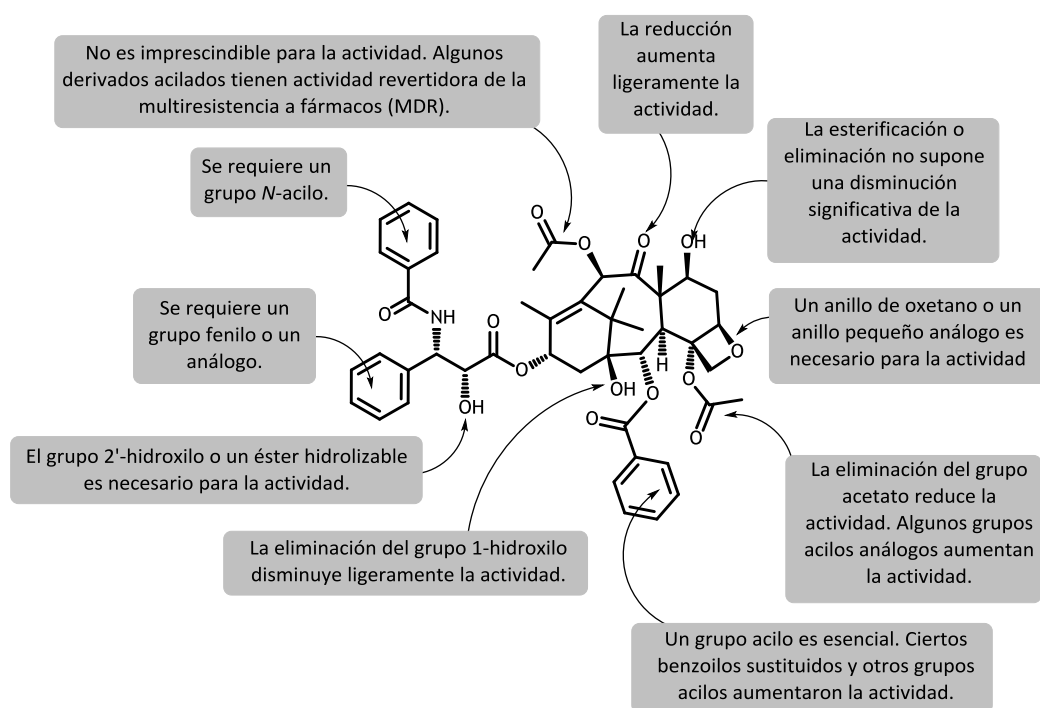


Fig. 1.11 | Estudios de la relación estructura-actividad del paclitaxel.

³¹ MCKINNEY, J.; RICHARD, A.; WALLER, C.; NEWMAN, M.; GERBERICK, F. (2000). The practice of structure activity relationships (SAR) in toxicology. *Toxicol. Sci.*, 56(1), 8–17.

Los estudios de relación **estructura-actividad cuantitativa (QSAR)**, haciendo uso de herramientas informáticas, se ha revelado como una excelente metodología para obtener conocimiento de los requerimientos esenciales en cuanto a los grupos funcionales y su disposición espacial que debe poseer un compuesto líder para ser activo^{31,32}.

En la metodología QSAR, la idea, que estructuras similares poseen actividades similares, es uno de los principios fundamentales³². Sin embargo, en la bibliografía se reportan numerosos ejemplos de compuestos que no siguen este comportamiento, presentando actividades biológicas muy diferentes a pesar de ser estructuralmente similares³³. Como ejemplo se puede nombrar una serie de inhibidores de un receptor μ -opioide, en los se observaron diferencias de hasta un factor de 50 en su K_i a pesar de presentar estructuras similares (Fig. 1.12)³⁴. Este comportamiento inusual, en el proceso del diseño de un fármaco, resulta problemático, ya que el comportamiento real no siempre coincide con las predicciones estadísticas de modelización³³.

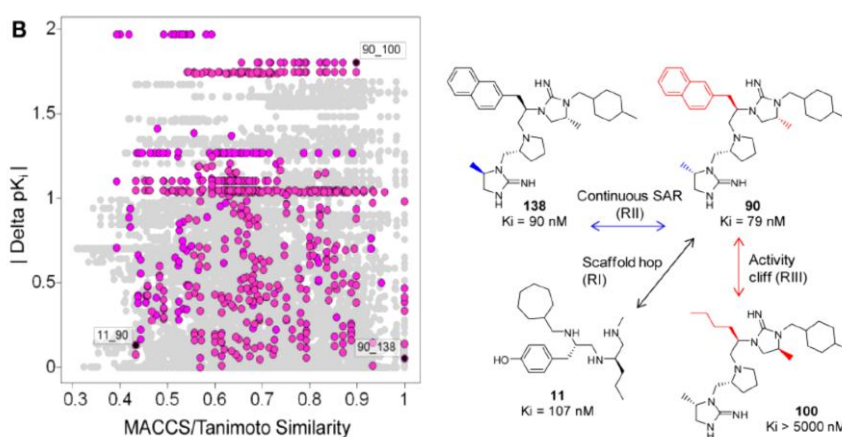


Fig. 1.12 | Mapa bidimensional de un SAR basado en 160 compuestos ensayados por su unión a un receptor μ -opioide. Se indican las estructuras de tres pares de compuestos representativos y su posición en el SAR (en negro).

Estas observaciones contradictorias fueron descritas por primera vez en el 2006 por MAGGIORA, dándole el término de **precipicio de actividad (activity cliff)**. Así, se presenta un SAR en tridimensional que relaciona los descriptores de la molécula con la

³² MARTIN, Y.; KÖFRON, J; TRAPHAGEN, L. (2002). Do structurally similar molecules have similar biological activity? *J. Med. Chem.*, 45(19), 4350–4358.

³³ GUHA, R. (2012). Exploring Structure-Activity Data Using the Landscape Paradigm. *WIREs Comput. Mol. Sci.*, 2(6), 829–841

³⁴ MEDINA-FRANCO, J. L. (2012). Scanning structure-activity relationships with structure-activity similarity and related maps: from *Consensus Activity Cliffs* to *Selectivity Switches*. *J. Chem. Inf. Model.*, 52, 2485–2493.

bioactividad correspondiente. En este **mapa de estructura-actividad**, estructuras similares que presentan actividades similares se verían representados por un paisaje de colinas suaves, mientras que los pares de sustancias con actividades muy diferentes presentarían picos o *precipicios* (*activity-cliff*). Esta observación se ha propuesto como motivo por el cual muchos modelos de QSAR no dieron resultados reproducibles en la realidad³⁵.

Hoy en día, la **modelización de paisajes de actividad** se ha convertido en una metodología bien establecida en el análisis de un SAR complejo. Esto tiene la ventaja de que grandes cambios en la actividad son visibles de manera intuitiva, señalando aquellos requerimientos estructurales cruciales para la bioactividad. Por otra parte, esta metodología, permite incluso comparar y analizar un conjunto de compuestos frente a diferentes dianas y de compuestos con dianas múltiples (*multitarget drugs*)³⁴. Al identificar los *precipicios* de actividad y reunirlos para formar *riscos de actividad* (*activity ridges*), es posible identificar caminos a lo largo de los cuales una secuencia de compuestos presentan cambios continuos en el SAR. Cabe destacar, que un *precipicio* de actividad, en general, se debe a una interacción clave entre una molécula pequeña y el receptor lo que resulta en un cambio de selectividad. Esto es de particular interés si la estructura del receptor no se conoce, ya que, en el caso de que éste se conoce, la identificación de las interacciones claves es posible de otras metodologías³³.

1.3 | **FAMILIA Celastraceae: FUENTE DE NUEVOS AGENTES TERAPÉUTICOS**

Entre las plantas superiores, destaca la **familia Celastraceae** dada su amplia distribución botánica, naturaleza química y complejidad de sus metabolitos y, fundamentalmente, por las actividades farmacológicas de sus especies. Así, algunas de sus especies son mundialmente conocidas por su uso en la medicina tradicional o en la agricultura, especialmente en Asia y América Latina³⁶.

La familia Celastraceae está formada por arbustos, árboles o, en ocasiones, lianas³⁷. En general, poseen pequeñas flores actinomorfas, verdosas o blancas, tetra- o

³⁵ MAGGIORA GM. On Outliers and Activity Cliffs—Why QSAR Often Disappoints. *J. Chem. Inf. Model.* 2006;46:1535–1535.

³⁶ GONZÁLEZ, A. G.; BAZZOCCHI, I. L.; MOUJIR, L.; JIMÉNEZ, I. A. (2000). Ethnobotanical uses of Celastraceae. Bioactive metabolites. En Atta-ur-Rahman (Ed.), *Studies in Natural Products Chemistry. Bioactive Natural Products, Vol. 23.* (pp. 649–738). Amsterdam: Elsevier.

³⁷ GUERRERO, R.; FERNÁNDEZ, N.; ARREGUÍN, S. (2002). La familia *Celastraceae* en la cuenca del río Balsas, Mexico. *Polibotánica*, 14, 1–50.

pentaméricas, bi- o unisexuales con un disco nectarífero y una amplia variedad de tipos de frutos y arilos³⁸.

La **clasificación filogenética** del grupo *Celastraceae* resulta difícil, ya que es altamente polifilético³⁹. Actualmente, la **familia Celastraceae** comprende 98 géneros con 1210 especies³⁸, que está subdividida en las subfamilias Hippocrateoideae⁴⁰, Salacioideae⁴¹, Cassinoideae³⁸, Tripterygioideae³⁸ y Euonymieae (Fig. 1.13 y Fig. 1.14).

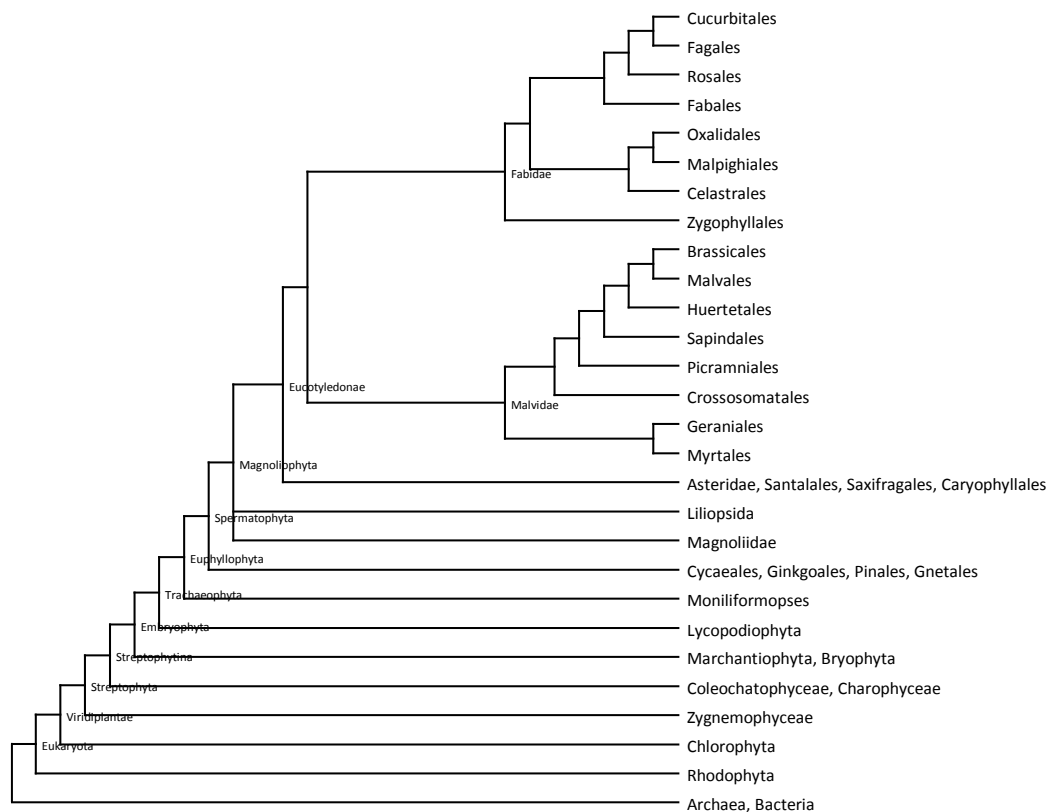


Fig. 1.13 | Posición filogenética del grupo Celastrales dentro de Eucariota.

³⁸ SIMMONS, M. P.; BACON, C. D.; CAPPA, J. J.; MCKENA, M. J. (2012). Phylogeny of Celastraceae subfamilies Cassinoideae and Tripterygioideae inferred from morphological characters and nuclear and plastid loci. *System. Bot.*, 37(2): 456–467.

³⁹ *Missouri Botanical Garden*. [en línea]. [Fecha de consulta: 2 de mayo de 2014]. Disponible en internet: <http://www.mobot.org/mobot/research/apweb/orders/celastralesweb.html>

⁴⁰ COUGHENOUR, J. M.; SIMMONS, M. P.; LOMBARDI, J. A.; YAKOBSON, K.; ARCHER, R. H. (2011). Phylogeny of Celastraceae subfamily Hippocrateoideae inferred from morphological characters and nuclear and plastid loci. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 59, 320–330.

⁴¹ COUGHENOUR, J. M.; SIMMONS, M. P.; LOMBARDI, J. A.; CAPPA, J. J. (2010). Phylogeny of Celastraceae subfamily Salacioideae and tribe Lophopetaleae inferred from morphological characters and nuclear and plastid genes. *System. Bot.*, 35, 358–366.

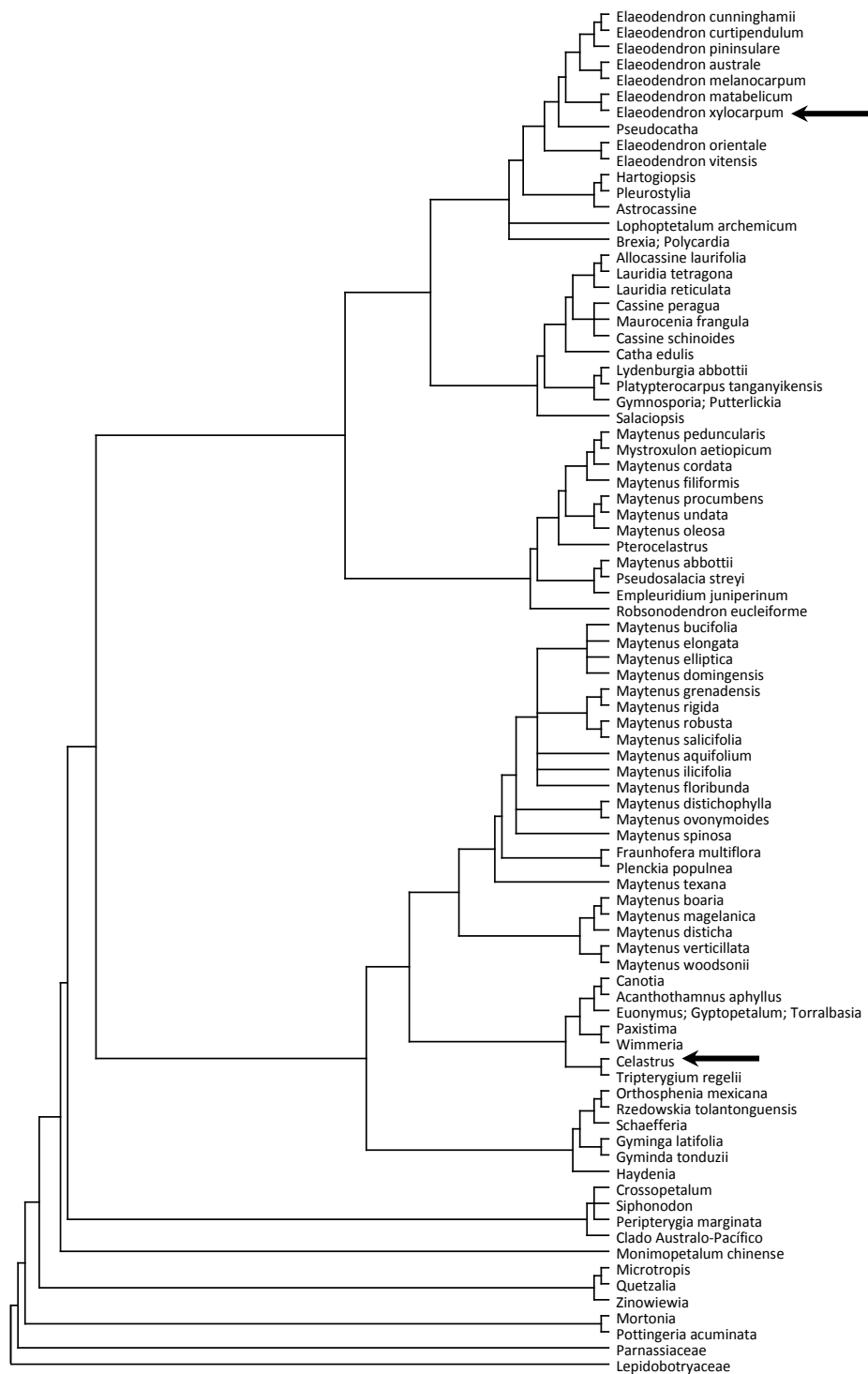


Fig. 1.14 | Cladograma de las Celastrales. Las flechas indican las especies vegetales cuyos metabolitos han sido sometidos a ensayos de bioactividad (*Celastrus vulcanicola* y *Elaeodendron xylocarpum*) en esta Memoria^{38,39,41-45}.

La filogenia de esta familia muestra fuertes relaciones biogeográficas, así, las especies de Australia–Nueva Caledonia y las africanas se han identificado como dos clados distintos, siendo el origen de las especies de América y Asia^{38,39,42,43}.

El **origen evolutivo** de las Celastrales se estima entre 87-75 millones de años para el grupo corona y entre 100-112 millones de años para el grupo troncal⁴⁴, por lo que data del inicio del Cretáceo Superior, estimándose el origen de la familia Celastraceae entre 85-70 millones de años^{45,46}. Estos datos se han confirmado por el hallazgo de madera fosilizada en Nueva México con una edad de 68 millones de años, que se atribuye a la familia Celastraceae⁴⁷. El origen de esta familia coincide con su **distribución geográfica gondwaniana** hoy en día (Fig. 1.15)^{39,48,49}, estando distribuida principalmente en el neo- y paleotrópico, aunque también está presente en zonas templadas³⁹.



Fig. 1.15 | Las masas terrestres en el Cretáceo Superior (hace 97 millones de años, aproximadamente) y posibles rutas de colonización entre los continentes, responsable de la distribución gondwaniana de las especies de la familia Celastraceae hoy en día (derecha).

⁴² National Center for Biotechnology Information (NCBI) Organismal Classification [en línea]. [Fecha de consulta: 2 de mayo de 2014]. Disponible en internet: http://bioportal.bioontology.org/ontologies/47845/?p=terms&conceptid=obo%3ANCBITaxon_489983

⁴³ Integrated Taxonomic Information System [en línea]. [Fecha de consulta: 2 de mayo de 2014]. Disponible en internet: www.itis.gov

⁴⁴ WANG, H., MOORE, M. J., SOLTIS, P. S., BELL, C. D., BROCKINGTON, S. F., ALEXANDRE, R., DAVIS, C. C., LATVIS, M., MANCHESTER, S. R., & SOLTIS, D. E. (2009). Rosid radiation and the rapid rise of angiosperm-dominated forests. *Proc. National Acad. Sci. U.S.A.* 106: 3853–3858.

⁴⁵ WIKSTRÖM, N., SAVOLAINEN, V., & CHASE, M. W. (2001). Evolution of the angiosperms: Calibrating the family tree. *Proc. Roy. Soc. B*, 268: 2211–2220.

⁴⁶ BELL, C. D., SOLTIS, D. E., & SOLTIS, P. S. (2010). The age and diversification of the angiosperms re-visited. *American J. Bot.* 97: 1296–1303.

⁴⁷ ESTRADA-RUIZ, E., UPCHURCH, G. R., WHEELER, E. A., & MACK, G. H. (2012). Late Cretaceous angiosperm woods from the Crevasse Canyon and McRae Formations, south-central New Mexico, U.S.A.: Part 1. *Internat. J. Plant Sci.* 173: 412–428.

⁴⁸ SIMMONS, M. P.; CLEVINGER, C. C.; SAVOLAINEN, V.; ARCHER, R. H.; MATHEWS, S.; DOYLE, J. (2001). Phylogeny of the Celastraceae inferred from phytochrome B gene sequence and morphology. *Am. J. Bot.*, 88(2): 313–325.

⁴⁹ SERENO, P. C.; WILSON, J. A.; CONRAD, J. L. (2004). New dinosaurs link southern landmasses in the Mid-Cretaceous. 2004, *Proc. R. Soc. Lond. B*, doi 10.1098/rspb.2004.2692.

En **Europa**, sólo hay una especie nativa, *Euonymus europaeus*, y varias especies que se usan como plantas ornamentales, como es el caso de *Euonymus japonicus*. En las Islas Canarias se encuentran dos especies endémicas, *Gymnosporia cassinoides* (L'Hér.) Masf., antiguamente conocida como *Maytenus canariensis* (Loes.) G. Kunkel & Sunding, y *Gymnosporia cryptopetala* Reyes-Bet. & A. Santos⁵⁰ (Fig. 1.16).



Fig. 1.16 | *Gymnosporia cassinoides* y *Euonymus europaeus*, dos especies de la familia Celastraceae con distribución en Canarias o Europa.

La **importancia económica** de las especies de *Celastraceae* radica en que algunas de ellas son utilizadas para la obtención de aceites, colorantes, preparación de infusiones y extractos medicinales, otras se cultivan como plantas ornamentales³⁷. La especie que seguramente más impacto económico tiene es *Catha edulis*, conocida comúnmente como "khat", ampliamente usada en algunas regiones de África y de la Península Arábiga como psicoestimulante y euforizante⁵¹.

Por otra parte, varias especies de la familia Celastraceae tienen **aplicación en la agricultura o medicina tradicional** en todo el mundo, en particular en Asia y Latinoamérica. Así, varias especies del género *Celastrus* tienen propiedades, antipirética, abortivo, afrodisíaco, tranquilizante, estimulante de la memoria, laxante o contra la diarrea, dependiendo del método de preparación y de la parte de la planta usada^{Error!} **Marcador no definido.** y, por otra parte, tienen aplicación en la agricultura o en la medicina tradicional china (*Celastrus angulatus*)⁵².

⁵⁰ REYES-BETANCORT, J. A.; GUERRA, A. S. (2010). *Gymnosporia cryptopetala* Reyes-Bet & A. Santos (Celastraceae), a new species from the Canary Islands. *Candollea* 65 (2), 189–196.

⁵¹ KASSIE, F.; DARROUDI, F.; KUNDI, M. SCHULTE-HERMANN, R.; KNASMÜLLER, S. (2001). Khat (*Catha edulis*) consumption causes genotoxic effects in humans. *Int. J. Cancer*, 92, 329–332.

⁵² Changsha Winner Bio-tech CO., Ltd. *Celastrus angulatus* extract [en línea]. [Fecha de consulta: 30 de mayo de 2014]. Disponible en internet: http://winnerpharm.en.alibaba.com/product/1634216082-219327579/Pesticide_insecticide_Celastrus_angulatus_Maxim_P_E.html

Entre los metabolitos secundarios aislados de especies de la familia Celastraceae, se encuentran como compuestos más representativos los poliésteres de dihidro- β -agarofurano, alcaloides sesquiterpénicos, cardenólidos, celastroloides y maytansinoides^{36,53,54}. Cabe mencionar, que este último grupo de metabolitos, con estructura de ansamacrólido, que se asemeja a los antibióticos ansamicinas, hoy día se sabe, que es metabolito del hongo asociado a la planta, *Actinosynnema pretiosum*^{55,56,57}.

Numerosos de estos metabolitos tienen una amplia gama de **actividades biológicas**, como son los triterpenofenoles con actividad antimicrobiana o los diterpenos triepoxidados del abietano con actividad antileucémica e inmunosupresora³⁶. Cabe citar como compuesto más relevante el **celastrol**, *nor*-triterpenometilénquinona, cuyas actividades biológicas incluyen antiinflamatoria, antioxidante y la supresión de la producción de óxido nítrico inducible y que se encuentra en fase clínica IIa para estudiar su farmacocinética, dosis óptima y seguridad en enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis lateral amiotrófica⁵⁸. Otro compuesto de relevancia es la **triptolida**, un triepóxido aislado de las raíces de *Tripterigyum wilfordii* y que se usa en China para tratar enfermedades inflamatorias y autoinmunes. La triptolida se ha descrito como un potente antitumoral y un análogo, la sal sódica de la 14-succinil-triptolida (PG490-88), se encuentra en ensayos clínicos, con actividad antiproliferativa y proapoptótica en células epiteliales prostáticas humanas en cáncer de colon y esófago.⁵⁹

Con estos antecedentes y en el marco de una línea de investigación que tiene como objetivo la búsqueda de nuevos metabolitos secundarios con actividad biológica de especies de la familia *Celastraceae*, y la optimización de los compuestos líder mediante preparación de una quimioteca y posterior evaluación biológica, nos planteamos los objetivos que presentamos a continuación.

⁵³ BRÜNING, R.; WAGNER, H. (1978). Übersicht über die Celastraceen-Inhaltsstoffe, Chemotaxonomie, Biosynthese, Pharmakologie. *Phytochem.* 17, 1821–1858.

⁵⁴ HEGNAUER, R. (1990). *Chemotaxonomie der Pflanzen. Eine Übersicht über die Verbreitung und die systematische Bedeutung der Pflanzenstoffe*. Basel: Birkhäuser Verlag.

⁵⁵ PULLEN, C. B., SCHMITZ, P., HOFFMANN, D., MEURER, K., BOETTCHER, T., VAN BAMBERG, D., PEREIRA, A. M., DE CASTRO FRANÇA, S., HAUSER, M., GEERTSEMA, H., VAN WYK, A., MAHMUD, T., FLOSS, H. G., & LEISTNER, E. (2003). Occurrence and non-detectability of maytansinoids in individual plants of the genera *Maytenus* and *Putterlickia*. *Phytochem.* 62: 377–387.

⁵⁶ CASSADY, J. M., CHAN, K. K., FLOSS, H. G., & LEISTNER, E. (2004). Recent developments in maytansinoid antitumor agents. *Chem. Pharm. Bull.* 52: 1–26.

⁵⁷ WINK, M. (2008). Plant secondary metabolism: Diversity, function and its evolution. *Natural Product Communic.* 3: 1205–1216.

⁵⁸ BORIDY, S.; SOLIMAN, G. M.; MAYSINGER, D. (2012). Modulation of inflammatory signaling and cytokine release from microglia by celastrol incorporated into dendrimer nanocarriers. *Nanomedicine*, 7(8), 1149–1165.

⁵⁹ LI, X.-J.; JIANG, Z.-Z.; ZHANG (2014). Triptolide: Progress on research in pharmacodynamics and toxicology. *J. Ethnopharmacol.*, [en prensa], DOI: 10.1016/j.jep.2014.06.006

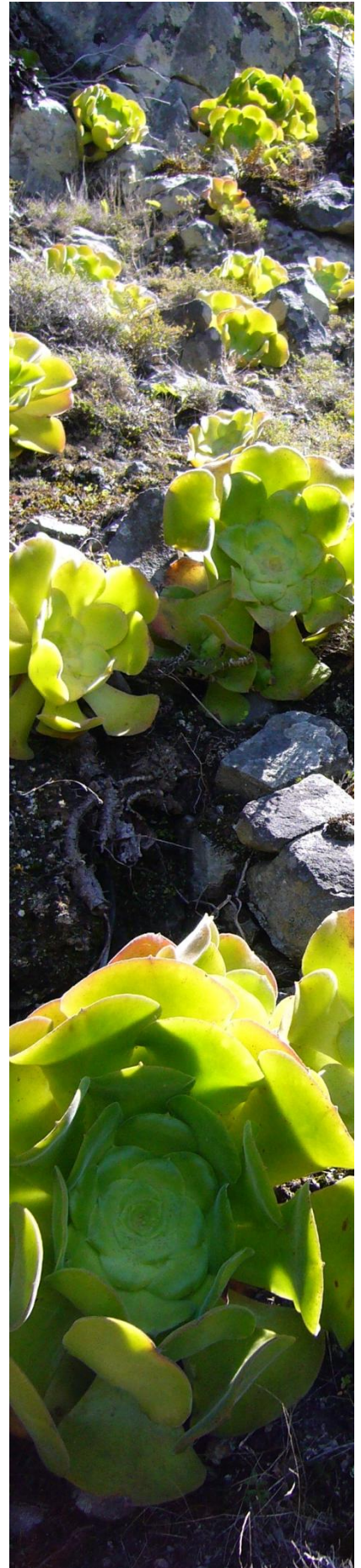
II

Capítulo

OBJETIVOS

DE ESTA MEMORIA DE TESIS

OBJETIVOS



2 | OBJETIVOS DE ESTA MEMORIA DE TESIS

1. **Aislamiento y elucidación estructural** de los metabolitos secundarios obtenidos del extracto de las hojas de la especie *Salacia gigantea* y *Celastrus vulcanicola* (*Celastraceae*).
2. Estrategia multidisciplinar hacia la **búsqueda de agentes de interés en la salud pública** estudiando las actividades biológicas de los metabolitos aislados: actividad anticancerígena (citotóxica, antioxidante, revertidora de la multiresistencia a fármacos), antimicrobiana y antiviral (anti-HIV).
3. **Modificaciones estructurales**, que nos permitan establecer la relevancia de los diferentes grupos funcionales de una molécula en su actividad (farmacóforo), así como obtener productos potencialmente más activo y menos tóxicos que los de partida. Asimismo, se prepararán moléculas híbridas que permitan mejorar las propiedades farmacológicas/farmacocinéticas de los compuestos activos. Se realizará modificaciones de:
 - 3.1. **Sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos** con un posterior estudio de su potencial como revertidores de la MDR.
 - 3.2. **Triterpenos de la serie de lupano** con un posterior estudio de sus propiedades anti-HIV.
4. Estudios de la **relación estructura-actividad** (SAR) y relación estructura-actividad cuantitativa tridimensional (3D-QSAR), que predicen los requerimientos estructurales (desarrollo de modelos) e incluso el mecanismos de acción de una sustancia, lo que permitirá el diseño racional de fármacos.
5. Estudio del **mecanismo de acción** de los metabolitos más prometedores.
6. Estudio de las **cuestiones no previstas** y que por su interés merezcan su análisis.

III

Capítulo

SESQUITERPENOS

DIHIDRO- β -AGAROFURANOS
Y SU POTENCIAL REVERTIDOR
DE LA MDR A FÁRMACOS EN
CÁNCER

SESQUITERPENOS DIHIDRO- β -AGAROFURANOS



3 | LOS SESQUITERPENOS DIHIDRO- β -AGAROFURÁNICOS Y SU POTENCIAL REVERTIDOR DE LA MDR EN CÁNCER

3.1 | INTRODUCCIÓN

Sesquiterpenos

Los **terpenos** constituyen el grupo de productos naturales más amplio, más ubicuo y estructuralmente más diverso, con aproximadamente 65.000 metabolitos de origen natural, y se encuentran en casi todos los grupos de organismos vivos donde ejercen una amplia gama de funciones. Todos los terpenos tienen en común que se basan en unidades C_5 de isopreno¹ que se unen de forma *cola-cabeza* dando lugar a los hemiterpenos (C_5), monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), sesterterpenos (C_{25}), triterpenos (C_{30}) y tetraterpenos (C_{40})^{2,3}.

El punto de partida para la biosíntesis de los sesquiterpenos es el difosfato de farnesilo (FPP), unidad de C_{15} que se forma mediante unión de una unidad de difosfato de geranilo (C_{10}) con difosfato de isopentenilo (IPP). El FPP puede dar lugar a sesquiterpenos lineales o cíclicos. Los enzimas responsables de la ciclación que genera la mayoría de los esqueletos base son las sesquiterpeno sintasas. A partir de los distintos carbocationes se generan la mayoría de los esqueletos sesquiterpénicos, que abarcan una gran variedad de sistemas mono-, bi- y tricíclicos con tamaños de anillo de 6 hasta 11 miembros (Fig. 3.1)¹.

¹ DEWICK, P. M. *Medicinal Natural Products: A biosynthetic approach*, 3ª edición. Wiley-Blackwell, Oxford, UK, 2009.

² OLDFIELD, E.; LIN, F.-Y. (2012). Terpene biosynthesis: Modularity rules. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 51, 1124–1137.

³ HILL, R. A.; CONNOLLY, J. D. (2012). Triterpenoids. *Nat. Prod. Rep.* 30, 1028–1065.

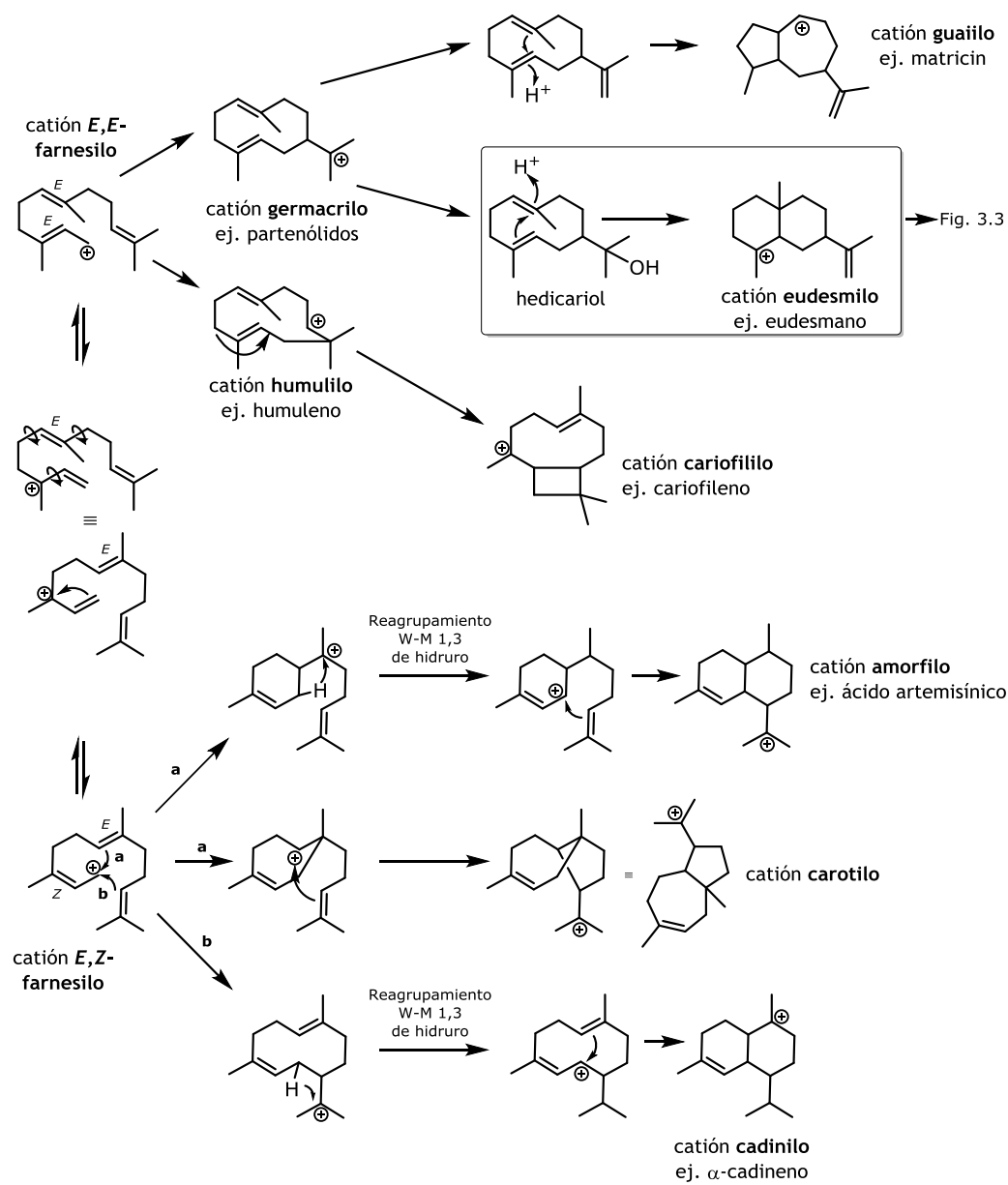


Fig. 3.1 | Ruta biosintética de algunos de los esqueletos sesquiterpénicos más representativos.

Sesquiterpenos agarofuránicos

Los sesquiterpenos agarofuránicos pertenecen a la familia del eudesmano, ya que se sintetizan a partir del catión eudesmilo. Se caracterizan por tener un esqueleto base tricíclico, con un anillo de tetrahidrofurano entre los carbonos C-5 y C-7 en posición β con respecto al plano del sistema decalínico^{4,5}. Los anillos están fusionados con una unión *trans* en el α - y β -agarofurano, mientras que los dihidroagarofuranos presentan uniones *trans* para el dihidro- α -agarofurano (=isodihidroagarofurano) y el dihidro- β -agarofurano (*trans*-dihidroagarofurano), o *cis* en los *cis*-dihidroagarofurano y 4-*epi-cis*-dihidroagarofurano⁶.

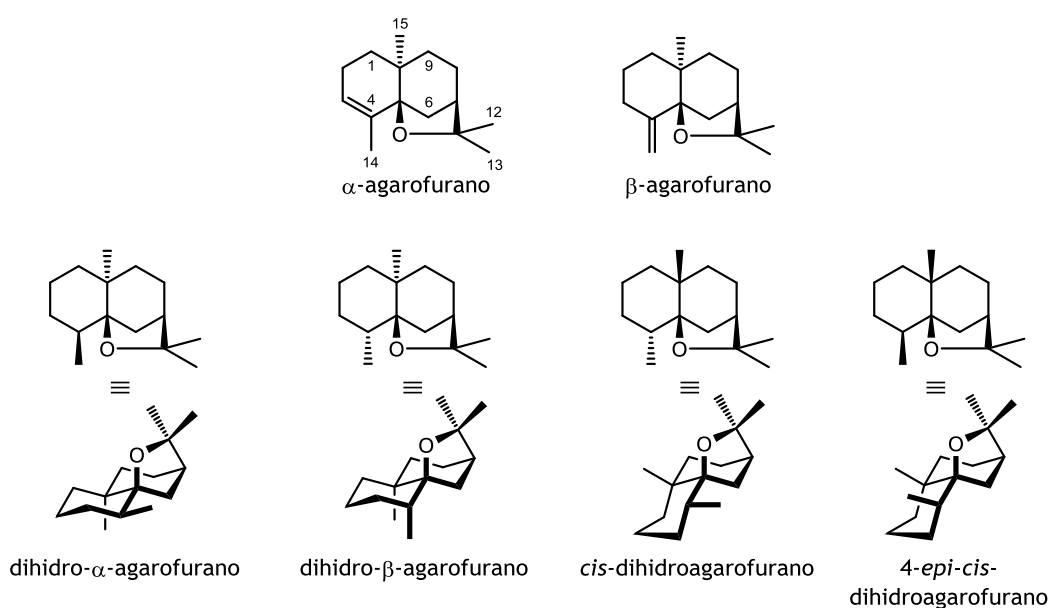


Fig. 3.2 | Esqueletos de agarofuranos y de los isómeros de dihidroagarofurano.

Biosintéticamente, se propone que los sesquiterpenos agarofuránicos provienen del hedicariol, que se biosintetiza a partir de *E,E*-FPP a través del catión germacrilo (Fig. 3.1). El hedicariol puede adoptar ocho conformaciones diferentes, cuatro de los cuales, tras varias ciclaciones, dan lugar a los correspondientes dihidroagarofuranos, tal como se presenta en la Fig. 3.3. La misma secuencia biosintética da lugar al sesquiterpeno kessano, que, curiosamente, en plantas del género *Prostanthera* se han encontrado

⁴ DEN HERTOOG, H. J. JR.; KRUK, C. (1974). Stereochemistry of Malkanguniol and stereostructures of some other related polyalcohols from *Celastrus paniculatos* Willd. *Tetrahedron Lett.*, 26, 2219–2222.

⁵ BARRETT, H. C.; BÜCHI, G. J. (1967). Stereochemistry and synthesis of α -agarofuran. *J. Am. Chem. Soc.* 89, 5665–5667.

⁶ CAVALLI, J.-F.; TOMI, F.; BERNARDINI, A.-F.; CASANOVA, J. (2004). Spectral assignments and Referenca Data. Dihydroagarofurans: the fourth isomer isolated from *Cedrelopsis grevei* bark oil. *Magn Reson. Chem.*, 42, 709–711.

ambas clases de sesquiterpenos en una relación de 5:3 (kessano:*cis*-agarofurano) y según se ha descrito, las temperaturas elevadas favorecen la formación del agarofurano^{6,7,8}.

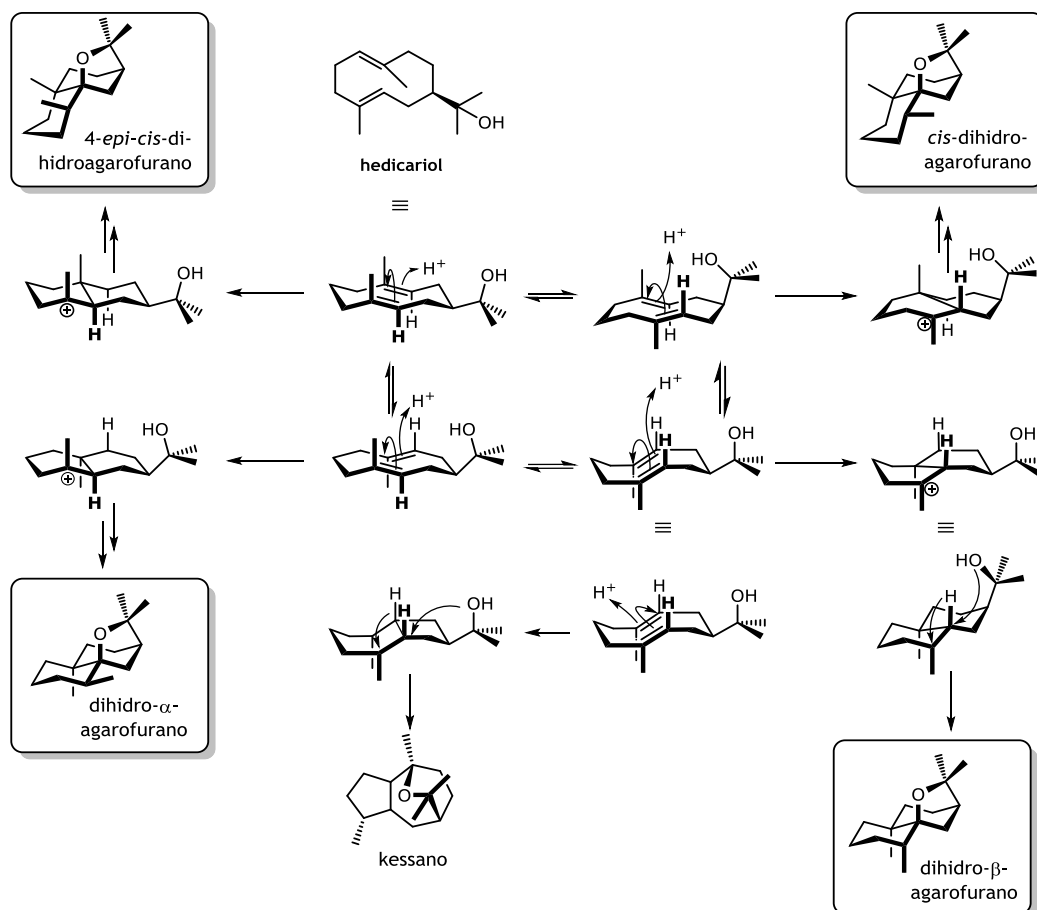


Fig. 3.3 | Biosíntesis de los sesquiterpenos agarofuránicos.

Los sesquiterpenos agarofuránicos están ampliamente distribuidos en especies vegetales y se han encontrado también en cianobacterias. Entre los agarofuranos identificados, el dihidro- β -agarofurano es el más común (Tabla 3.1). Aparte de esqueletos agarofuránicos base, en varias familias vegetales se han descrito compuestos con diferentes grados de oxidación, incluyendo el 3,4-epoxi-dihydroagarofurano, esqueletos hidroxilados o esterificados (Fig. 3.4).

⁷ SOUTHWELL, I. A.; TUCKER, D. J. (1993). *cis*-Dihydroagarofuran from *Prostanthera* sp. aff. *ovalifolia*. *Phytochem.*, 33 (4), 857–862.

⁸ MINNAARD, A. J.; STORK, G. A.; WIJNBERG, J. B. P. A.; DE GROOT, A. (1997). Total synthesis of neohedycaryol. Its possible role in the biosynthesis of eudesmane sesquiterpenes. *J. Org. Chem.*, 62, 2344–2349.

Tabla 3.1 | Especies vegetales y sus correspondientes familias en las que se han descrito la presencia de agarofuranos. En lo que respecta a la familia Celastraceae, por la gran cantidad de especies que presentan agarofuranos, se incluye sólo la especie *M. jelskii*, a modo de ejemplo.

		α -agarofurano	β -agarofurano	dihidro- α -agarofurano	4 α -hidroxi-dihidroagarofurano	dihidro- β -agarofurano	epoxi-dihidroagarofurano	dihidro- β -agarofurano poliesteres	4- <i>epi-trans</i> -dihidroagarofurano	otros agarofuranoides
<i>Calothrix</i> sp. ^a	Cyanobacteria			x						
<i>Cryptomeria fortunei</i> ^b	Taxodiaceae									(3)
<i>Pseudolarix kaempferi</i> ^c	Pinaceae							x		
<i>Ferula assa-foetida</i> ^d	Apiaceae					x				
<i>Anaphalis contorta</i> ^e	Asteraceae					x				
<i>Pluchea purpurascens</i> ^f		x				x				
<i>Xanthium brasilicum</i> ^g						x				
<i>Bursera traveolens</i> ^h	Burseraceae			x	x		(1)			
<i>Maytenus jelskii</i>	Celastraceae							x		
<i>Adesmia boronioides</i> ^l	Fabaceae				x					
<i>Cyclopia subternata</i> ^k		x				x				
<i>Centaurium erythraea</i> ^l	Gentianaceae					x				
<i>Pelargonium</i> spp. ^m	Geraniaceae	x				x				
<i>Cyclotrichium straussii</i> ⁿ	Lamiaceae					x				
<i>Salvia sclarea</i> ^o						x				
<i>Teucrium polium</i> ^p		x			x	x	(1)			
<i>Tymus caespititius</i> ^q						x				
<i>Corymbia maculata</i> ^r	Myrtaceae	x				x				
<i>Eucalyptus resinifera</i> ^r						x				
<i>Piper marginatum</i> ^s	Piperaceae					x				
<i>Amyris balsamifera</i> ^t	Rutaceae	x				x				
<i>Cedrelopsis grevei</i> ^u						x			x	
<i>Osyris lanceolata</i> ^v	Santalaceae							x		
<i>Aquilaria sinensis</i> ^w	Thymelaeaceae	x	x							(4)
<i>Alpinia japonica</i> ^x	Zingiberaceae	x			x	x	(1)(2)			
<i>Alpinia zerumbet</i> ^y							x			

(1) 3 β ,4 β - epoxi-dihidroagarofurano. (2) 3 α ,4 α - epoxi-dihidroagarofurano. (3) 1 α -hidroxi-dihidro- β -agarofurano. (4) baimuxinol, ácido baimuxifuránico^{9a-y}.

^{9 a} HÖCKELMANN, C.; BECHTER, P. G.; VON REUB, S. H.; JÜTTNER, F. (2009). Sesquiterpenes of the Geosmin-producing Cyanobacterium *Calothrix* PCC 7507 and their toxicity to Invertebrates. *Z. Naturforsch. C*, 64, 49–55. ^b WU, J.; ZHAO, W.-M. (2010). New sesquiterpene and triterpene from the fruits of *Cryptomeria fortunei*. *J. Asian Nat. Prod. Res.*, 12 (5), 382-387. ^c CAI, T.; QI, W.; YANG, L.; TU, G.; YANG, R.; XIE, K.; FU, H. (2012). Chemical constituents of *Pseudolarix kaempferi* Gord. *J. Chin. Pharm. Sci.*, 21 (5), 428–435. ^d KAVOOSI, G.; ROWSHAN, V. (2013). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil obtained from *Ferula assa-foetida* oleo-gum resin: Effect of collection time. *Food Chem.*, 138, 2180–2187. ^e PANDE, C.; JOSHI, R. K.; SAMMAL, S. S. (2008). Chemical composition of the essential oil of *Anaphalis contorta* Hook f. *J. Essent. Oil Res.*, 20, 444–445. ^f PINO, J. A.; PERERA, W. H.; SARDUY, R.; OVIEDO, R.; QUIJANO, C. (2008). Essential oil from the stems, leaves and flowers of *Pluchea rosea* Godfrey and *Pluchea purpurascens* (Sw.) DC. *J. Essent. Oil Res.*, 20, 497–501. ^g HABIBI, Z.; LALEH, A. (2004). Composition of the essential oil of *Xanthium brasilicum* Vellozo from Iran. *J. Essent. Oil Res.*, 16, 31–32. ^h YUKAWA, C.; IWABUCHI, H.; KAMIKAWA, T.; KOMEMUSHI, S.; SAWABE, A. (2004). Terpenoids of the volatile oil of *Bursera graveolens*. *Flav. Fragr. J.*, 19, 565–570. ⁱ PERESTELO, N. R.; SÁNCHEZ-CANETE, M. P.; GAMARRO, F.; JIMÉNEZ, I. A.; CASTANYS, S.; BAZZOCCHI, I. L. (2011). Overcoming human P-glycoprotein-dependent multidrug resistance with novel dihydro- β -agarofuran

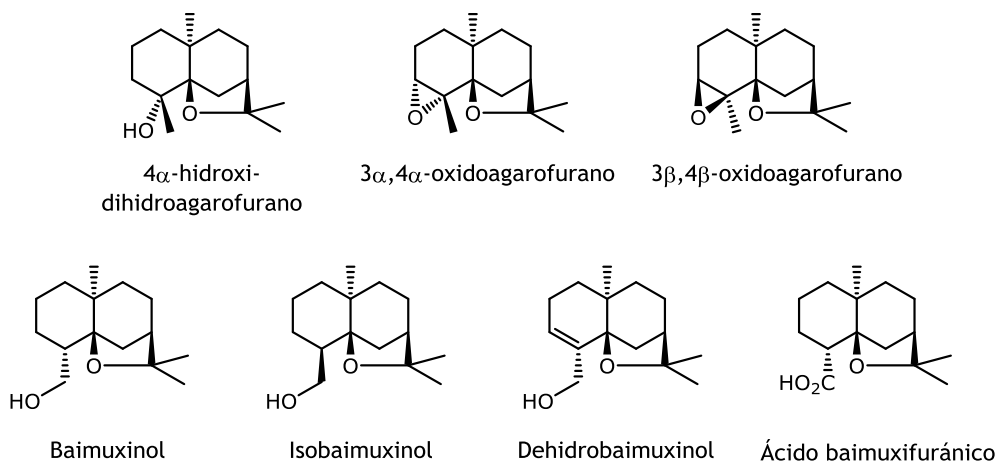


Fig. 3.4 | Ejemplos de dihidroagarofurans con diferentes grados de oxidación.

sesquiterpenes. *Eur. J. Med. Chem.*; 46, 4915–4923. [†] GONZÁLES, S. B.; BANDONI, A. L.; VAN BAREN, C.; LIRA, P. D. L.; CERDA-GARCÍA-ROJAS, C. M.; JOSEPH-NATHAN, P. (2004). The Essential Oil of the Aerial Parts of *Adesmia boronioides* Hook. f. *J. Essent. Oil Res.*, 16(6), 513–516. [‡] LE ROUX, M.; CRONJE, C.; BURGER, B. V.; JOUBERT, E. (2012). Characterization of volatiles and aroma-active compounds in Honeybush (*Cyclopia subternata*) by GC-MS and GC-O Analysis. *J. Agric. Food Chem.*, 60, 2657–2664. [§] JOVANOVIĆ, O.; RADULOVIĆ, N.; STOJANOVIĆ, G.; PALIĆ, R. (2009). Chemical composition of the essential oil of *Centaurium erythraea* Rafn (Gentianaceae) from Serbia. *J. Essent. Oil Res.*, 21, 317–322. ^{||} LALLI, J. Y. Y.; VILJOEN, A. M. BASER, K. H. C.; DEMIRCI, B.; OZEK, T. (2006). The essential oil composition and chemotaxonomical appraisal of South African Pelargoniums (Geraniaceae). *J. Essent. Oil Res.*, 18, 89–105. [°] MASOUDI, S.; RUSTAIYAN, A.; AZAR, P. A.; LARIJANI, K. (2006). Composition of the essential oils of *Cyclotrichium straussii* (Bornm.) Rech. f. and *Phlomis pungens* Willd. from Iran. *J. Essent. Oil Res.*, 18, 16–18. [°] CAI, J.; LIN, P.; ZHU, X.; SU, Q. (2006). Comparative analysis of clary sage (*S. sclarea* L.) oil volatiles by GC-FTIR and GC-MS. *Food Chem.*, 99, 401–407. [°] DJABOU, N.; MUSELLI, A.; ALLALI, H.; DIB, M. E. A.; TABTI, B.; VARESI, L.; COSTA, J. (2012). Chemical and genetic diversity of two Mediterranean subspecies of *Teucrium polium* L. *Phytochem.*, 83, 51–62. [°] SANTOS, P. A. G.; BARROSO, J. G.; FIGUEIREDO, A. C.; PEDRO, L. G.; SALGUEIRO, L. R.; FONTINHA, S. S.; DEANS, S. G.; SCHEFFER, J. C. (2005). Chemical polymorphism of populations of *Thymus casepititius* grown on the islands Corvo, Flores, São Miguel and Terceira (Azores) and on Madeira, assessed by analysis of their essential oils. *Plant Science*, 169, 1112–1117. [°] PINO, J. A.; MARBOT, R.; QUERT, R.; GARCÍA, H. (2002). Study of essential oils of *Eucalyptus resinifera* Smith, *E. tereticornis* Smith and *Corymbia maculata* (Hook.) K. D. Hill & L. A. S. Johnson, grown in Cuba. *Flav. Fragr. J.*, 17, 1–4. [°] ANDRADE, E. H.; CARREIRA, L. M. M.; DA SILVA, M. H. L.; DA SILVA, J. D.; BASTOS, C. N.; SOUSA, P. J. C.; GUIMARÃES, E. F.; MAIA, J. G. S. (2008). Variability in essential-oil composition of *Piper marginatum* sensu lato. *Chem. Biodiv.*, 5, 197–208. [°] PINO, J. A.; MARLOT, R.; FUENTES, V. (2006). Aromatic plants from Western Cuba. VI. Composition of the leaf oils from *Murraya exotica* L., *Amyris balsamifera* L., *Severinia buxifolia* (Poir.) Ten. and *Triphasia trifolia* (Burm. f.) P. Wilson. *J. Essent. Oil Res.* 18, 24–28. [°] AFOULOUS, S.; FERHOUT, H.; RAOELISON, E. G.; VALENTIN, A.; MOUKARZEL, B.; COUDERC, F.; BOUJILIA, J. (2013). Chemical composition and anticancer, antiinflammatory, antioxidant and antimalarial activities of leaves essential oil of *Cedrelopsis grevei*. *Food Chem. Toxicol.*, 56, 353–362. CAVALLI, J.-F.; TOMI, F.; BERNARDINI, A.-F.; CASANOVA, J. (2004). Spectral assignments and reference data. *Magn. Res. Chem.*, 42, 709–711. [°] YEBOAH, E. M. O.; MAJINDA, R. T. (2013). Five new agarofuran sesquiterpene polyesters from *Osyris lanceolata*. *Phytochem. Lett.*, 6, 531–535. YEBOAH, E. M. O.; MAJINDA, R. R. T.; KADZIOLA, A.; MULLER, A. (2010). Dihydro- β -agarofuran sesquiterpenes and pentacyclic triterpenoids from the root bark of *Osyris lanceolata*. *J. Nat. Prod.*, 73, 1151–1155. [°] MEI, W.-L.; ZENG, Y.-B.; WU, J.; CUI, H.-B.; DAI, H.-F. (2008). Chemical composition and anti-MRSA activity of the essential oil from Chinese eaglewood. *J. Chin. Pharm. Sci.*, 17(3), 225–229. [°] ITOKAWA, H.; MORITA, H.; WATANABE, K.; MIHASHI, S.; IITAKA, Y. (1985). Agarofuran-, eudesmane- and eremophilane-type sesquiterpenoids from *Alpinia japonica* (THUNB.)MIQ. *Chem. Pharmac. Bull.*, 33(3), 1148–1153. [°] VICTÓRIO, C. P.; KUSTER, R. M.; LAGE, C. L. S. (2011). Leaf and root volatiles produced by tissue cultures of *Alpinia zerumbet* (Pers.) Burt & Smith under the influence of different plant growth regulators. *Quim. Nova*, 34(3), 430–433.

La familia botánica en la que los **sesquiterpenos agarofuránicos polihidroxiados** se encuentran más ampliamente distribuidos, es en la **Celastraceae**^{10,11}. Así, se han aislado esqueletos de este tipo de metabolitos con esqueletos base que van desde los más simples, como el boariol, que posee dos grupos hidroxilo¹², hasta los más complejos con nueve grupos hidroxilos en la serie del euniminol e isoeuniminol¹³(Fig. 3.5). En los años 90, se intentó agrupar los sesquiterpenos aislados hasta el momento según sus esqueletos polihidroxiados base, teniendo en cuenta el número, posición y estereoquímica de los sustituyentes. Sin embargo, dada la gran variedad de esqueletos polihidroxiados conocidos hoy en día, esta clasificación ya no cumple con el objetivo inicial de la misma que era facilitar el estudio de este tipo de compuestos¹¹.

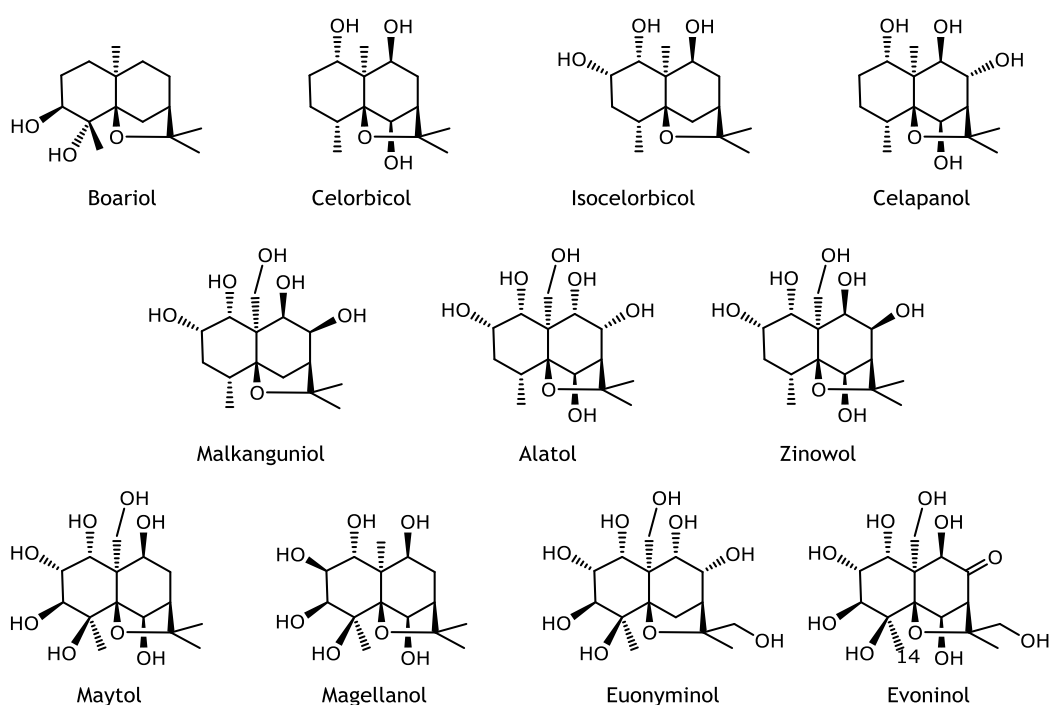


Fig. 3.5 | Diversidad estructural de los sesquiterpenos dihidro-β-agarofuranos polihidroxiados.

¹⁰ BRÜNING, R.; WAGNER, H. (1978). Übersicht über die Celastraceen-Inhaltsstoffe: Chemie, Chemotaxonomie, Biosynthese, Pharmakologie. *Phytochem.*, 17(11), 1821-1854.

¹¹ GAO, J. M.; WU, W. J.; ZHAG, J. W.; KONISHI, Y. (2007). The dihydro-β-agarofuran sesquiterpenes. *Nat. Prod. Rep.*, 24, 1153-1189.

¹² GONZÁLEZ, A. G.; MUÑOZ, O. M.; RAVELO, A. G.; CRESPO, A.; BAZZOCCHI, I. L.; JIMÉNEZ, I. A.; SOLANS, X.; RUIZ-PÉREZ, C.; RODRÍGUEZ-ROMERO, V. (1992). A new sesquiterpene from *Maytenus boaria* (Celastraceae); crystal structure and absolute configuration. *Tetrahedron Lett.*, 33(14), 1921-1924.

¹³ SHIZURI, Y.; WADA, K.; SUGIURA, K.; HIRATA, Y. (1973). The structures of evonine and neoevonine alkaloids obtained from *Euonymus sieboldiana* Blume. *Tetrahedron.*, 29, 1773-1794, 1795-1800.

En estas plantas, los sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos se encuentran, generalmente, en forma de poliésteres, esterificados por una gran variedad de **ácidos** alifáticos, olefínicos, aromáticos o heterocíclicos. Ejemplos son el ácido acético, metilbutírico, benzoico, cinámico, furoico y nicotínico que son los más habituales. Con menos frecuencia se han encontrado los ácidos isobutírico¹⁴, epoxicinámico^{15,16}, hexanoico¹⁷, *N*-metil-2-piridin-5-carboxílico¹⁸, ácido trimetoxigálico, tíglico, angélico¹⁹, ácido 4,5-epoxi-2-oxo-4-tetrahidrofuroico y ácido 3',4'-dihidroxi-2',5'-dimetoxi-3'-tetrahidrofuroico²⁰.

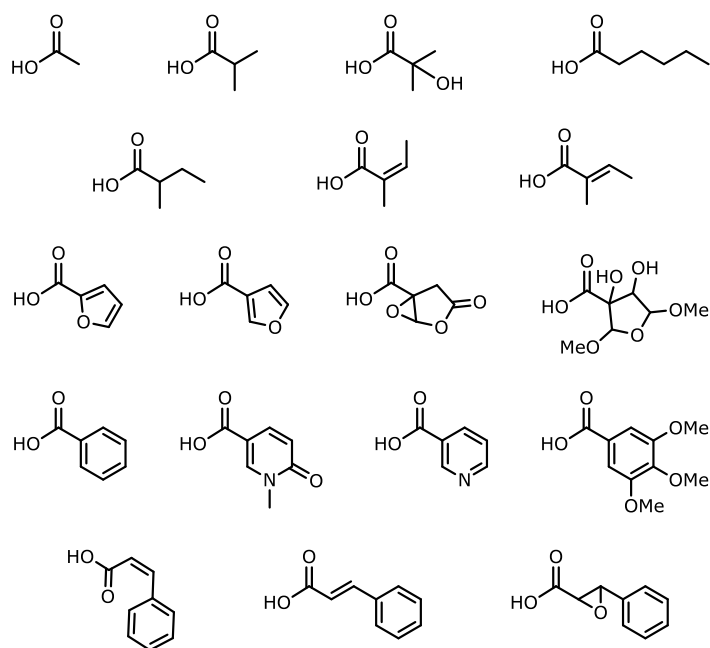


Fig. 3.6 | Ácidos que esterifican los dihidro- β -agarofuranos poliesterificados.

- ¹⁴ MAOTIAN, W.; HAILIN, Q.; MAN, K.; YANZI, L. (1991). Insecticidal sesquiterpene polyol ester from *Celastrus angulatus*. *Phytochem.*, 30(12), 3931–3933.
- ¹⁵ JIMÉNEZ, M., GARCÍA, E., GARCINA, L., LIRA-ROCHA, A. (1988). Polyhydroxyagarofuran derivatives from *Rzedowskia tolantouguensis*. *Phytochem.*, 27(7), 2213–2217.
- ¹⁶ TU, Y. Q.; WANG, D.Z.; ZHANG, H. J.; ZHOU, L. (1991). Sesquiterpenoids from *Celastrus gemmatus*. *Phytochem.*, 30(1), 271–273.
- ¹⁷ TAKAISHI, Y.; TOKURA, K.; TAMAI, S.; UJITA, K.; NAKAMO, K.; TOMIMATSU, T. (1991). Sesquiterpene esters from *Tripterygium wilfordii*. *Phytochem.*, 30(5), 1561–1566.
- ¹⁸ MATA, R.; CALZADA, F. (1990). Chemical studies on mexican plants used in traditional medicine, XV. Sesquiterpene evoninoate alkaloids from *Hippocratea excelsa*. *J. Nat. Prod.*, 53(5), 1212–1219.
- ¹⁹ GONZÁLEZ, A. G.; JIMÉNEZ, I. A.; RAVELO, A. G.; BAZZOCCHI, I. L. (1994). New angelic and tiglic dihydro- β -agarofuran ester sesquiterpenoids from *Maytenus canariensis* (Celastraceae). *Nat. Prod. Lett.*, 5, 33–40.
- ²⁰ PERESTELO, N. R. (2010). *Metabolitos secundarios aislados de Maytenus jelskii (Celastraceae). Estudios de relación estructura-actividad.* (Tesis Doctoral). Departamento de Química Orgánica, Universidad de La Laguna.

Con tales características, los sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos poliesterificados, presentan unas posibilidades de **variedad estructural** inmensa. Así, un cálculo teórico, variando el número, regiosustitución y estereoquímica de los sustituyentes, se llega a un resultado de más de 10^{20} posibles compuestos (Fig. 3.7).

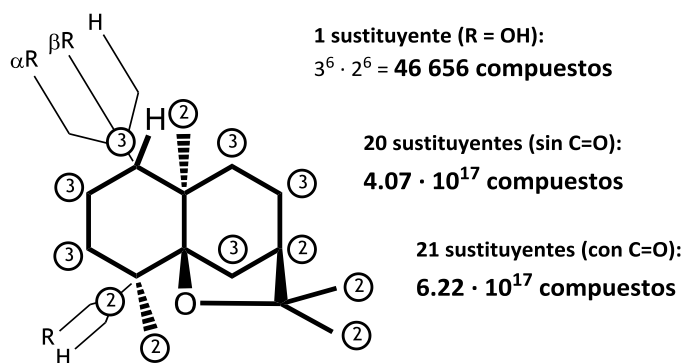


Fig. 3.7 | Cálculo teórico de los posibles estructuras dihidro- β -agarofuranos poliesterificados.

En algunos casos, se encuentran ésteres procedentes de diácidos piridínicos, como el evonínico, wilfórdico o cassínico, formando una macrolactona entre las posiciones C-3–C-12 del esqueleto sesquiterpénico del tipo evoninol, euoniminol o isoeuoniminol. Independientemente del esqueleto base, cuando la función éster es el ácido nicotínico o sus derivados, se designan como **alcaloides sesquiterpénicos** (Fig. 3.8)^{21,22,23}.

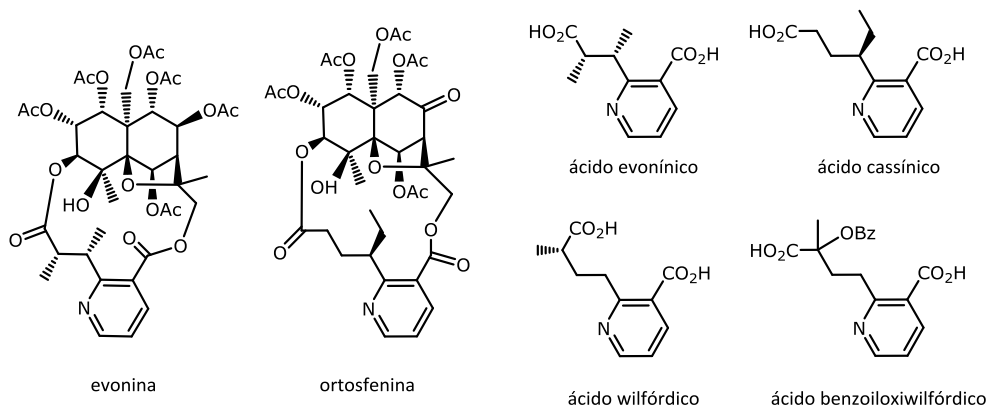


Fig. 3.8 | Ejemplos de alcaloides sesquiterpénicos macrocíclicos y de algunos ácidos que los esterifican.

²¹ PAILER, M.; STREICHER, W.; LEITICH, J. (1971). Über Evonymus-Alkaloide, 3. Mitt.: Konstitution und Konfiguration von Evonin und Evonolin (aus *Evonymus europaea* L.). *Monatshefte für Chemie / Chemical Monthly*, 102(6), 1873–1897.

²² ORECHOFF, A. (1934). Untersuchung einiger Heil- und Giftpflanzen der UdSSR. auf deren Alkaloidgehalt. *Arch. Pharm.*, 272 (44-47), 673–691.

²³ GONZÁLEZ, A. G.; SAN ANDRÉS, L.; RAVELO, A. G.; JIMÉNEZ, I. A.; DOMÍNGUEZ, X. A. Minor Constituents from *Orthosphenia mexicana*. *J. Nat. Prod.*, 52(6), 1338–1341.

Actividades biológicas de los sesquiterpenos agarofuránicos

El interés generado por los sesquiterpenos poliesterificados de las celastráceas se ha incrementado en las últimas décadas debido a la **amplia gama de actividades biológicas**, entre las cuales se encuentran, la actividad inhibidora del proceso fotosintético, antialimentaria e insecticida, antituberculosa, antiviral, inmunosupresora, inhibidora de la activación del virus Epstein-Barr, citotóxica, antiinflamatoria, relajante intestinal y actividad revertidora de la multirresistencia a fármacos¹¹. A continuación comentaremos algunos ejemplos de las actividades más relevantes en esta clase de compuestos.

Actividad insecticida y antialimentaria

El control de plagas y la lucha contra las malezas es de enorme importancia en la agricultura a nivel mundial ya que conlleva pérdidas económicas considerables e incluso carestías, en el caso extremo. Sin embargo, la lucha contra las plagas se enfrenta a retos económicos y medioambientales para combatirla de una manera eficaz evitando la aparición de resistencia²⁴ a diferentes clases de pesticidas, así como la contaminación del medio ambiente con la correspondiente toxicidad para el hombre²⁵. Por otra parte, la incidencia de plagas debido al calentamiento global está en aumento, y, según algunos pronósticos, las pérdidas en las cosechas de los cultivos más importantes a nivel mundial podrían alcanzar hasta un 20% en el año 2025²⁶.

Los pesticidas vegetales se han propuesto, desde hace décadas, como una alternativa atractiva a los pesticidas sintéticos ya que son, en principio, menos perjudiciales para la salud y/o el medio ambiente. Aunque en la bibliografía se reportan muchas sustancias de origen vegetal con actividad insecticida, existe controversia de que su desarrollo sea económicamente factible. A pesar de las grandes ventajas que presentan, incluyendo su aplicación en la agricultura ecológica o su impacto positivo en el medio ambiente, el uso de pesticidas *verdes* en los países industrializados, en comparación con otros métodos de control de plagas, es realmente escasa²⁴.

Ejemplos de pesticidas vegetales comercialmente disponibles son las piretrinas aisladas de *Tanacetum cinerariifolium* (Asteraceae) o el aceite de nim extraído de

²⁴ EL-WAKEIL, N. E. (2013). Botanical pesticides and their mode of action. *Gesunde Pflanzen*, 64(4), 125–149.

²⁵ TANG, J.-J.; ZHANG, F.-Y.; WANG, D.-M.; TIAN, J.-M.; DONG, S.; GAO, J.-M. (2013). Semisynthesis and antifeedant activity of new derivatives of a dihydro- β -agarofuran from *Parnassia wightiana*. *Int. J. Mol. Sci.*, 14, 19484–19493.

²⁶ SCHALLER, M.; WEIGEL, H.-J. *Analyse des Sachstands zu Auswirkungen von Klimaveränderungen auf die deutsche Landwirtschaft und Maßnahmen zur Anpassung*. Special Issue 316. FAL Agricultural Research Ed., Braunschweig, 2007.

Azadirachta indica (Meliaceae). Otro ejemplo son las especies de la familia Celastraceae que han sido usadas en muchos países como plaguicidas, así, por ejemplo, las raíces molidas de *Tripterygium wilfordii* Hook y de *Celastrus angulatus* Max. son usadas tradicionalmente en China en la agricultura como insecticidas¹¹.

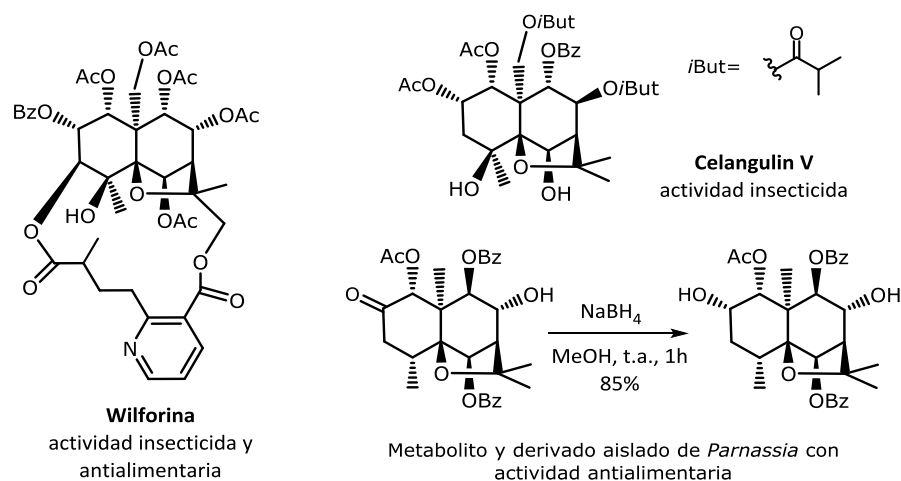


Fig. 3.9 | Sesquiterpenos agarofuranícos aislados de especies de la familia Celastraceae con actividad insecticida y/o antialimentaria.

En los años 50 y 60, ACREE, SWINGLE Y BEROZA^{27,28,29} reportan que los principios activos de la actividad insecticida de *T. wilfordii* eran alcaloides sesquiterpénicos como la wilforina (Fig. 3.9), que mostraba considerable actividad insecticida frente al taladro del maíz (*Pyrausta nubilalis*) y antialimentaria contra la blanquita de la col (*Pieris rapae*) y la langosta migratoria (*Locusta migratoria*). Por otra parte, sesquiterpenos dihidro-β-agarofuranos aislados de *Gymnospora cassinoides* (antes *Maytenus canariensis*) y *Maytenus magellanica* mostraron actividad insecticida y antialimentaria frente a *Spodoptera littoralis*^{19,30,31}. Recientemente, QI y col.³² aislaron el agarofurano celangulin V de *Celastrus angulatus* que mostró actividad frente a las larvas de la polilla *Mythimna separata*, plaga en maíz, sorgo y arroz. Asimismo, TANG y col.²⁵ prepararon una

²⁷ SWINGLE, W. T.; HALLER, H. L.; SIEGLER, E. H.; SWINGLE, M. C. (1941). A chinese insecticidal plant, *Tripterygium wilfordii*, introduced into the United States. *Science*, 93, 60-61.

²⁸ ACREE, F. JR.; HALLER, H. L. (1950). Wilfordine, an Insecticidal Alkaloid from *Tripterygium wilfordii* Hook. *J. Am. Chem. Soc.*, 72, 1608-1611.

²⁹ BEROZA, M. J. (1953). Alkaloids from *Tripterygium wilfordii* Hook: Wilforgine and Wilfortrine. *J. Am. Chem. Soc.*, 74(6), 1585-1588.

³⁰ GONZÁLEZ, A. G.; NÚÑEZ, M. P.; BAZZOCCHI, I. L.; RAVELO, A. G.; DÍAZ, A. J. (1993). Sesquiterpenes from *Maytenus magellanica* (Celastraceae). *Nat. Prod. Lett.*, 2(3), 163-170.

³¹ GONZÁLEZ, A. G.; JIMÉNEZ, I. A.; RAVELO, A. G.; COLL, J.; GONZÁLEZ, J. A.; LLORIA, J. (1997). Antifeedant activity of sesquiterpenes from Celastraceae. *Biochem. System. Ecol.*, 25(6), 513-519.

³² QI, Z.; SHI, B.; HU, Z.; ZHANG, Y.; WU, W. (2011). Ultrastructural effects of Celangulin V on midgut cells of the oriental armyworm, *Mythimna separata* Walker (Lepidoptera: Noctuidae). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 439-444.

serie de derivados de dihidro- β -agarofuranos aislados de *Parnassia wightiana* (Fig. 3.9), resultando en una actividad antialimentaria de hasta 80% superior al control, probenazol, actualmente de aplicación en la agricultura. Así, hasta la fecha, se han identificado más de 40 sesquiterpenos agarofuránicos con actividad antialimentaria, narcótica o insecticida frente a alguna de las plagas de mayor impacto en la agricultura, siendo los Lepidopteros los más sensibles a este tipo de compuesto³².

Actividad inhibidora de la activación del virus Epstein-Barr

El cáncer constituye la primera causa de mortalidad en los países occidentales entre los sujetos de 40 a 60 años³³. En 2012, ocasionó 8.2 millones de muertes en todo el mundo y este número está en aumento, estimándose que, para las siguientes dos décadas, este número llegará a los 22 millones. Así, la prevención y tratamiento del cáncer es un objetivo de máxima prioridad en Salud Pública, ya que podría evitar hasta un 30% de las muertes por esta enfermedad³⁴. En este sentido, la quimioprevención se presenta como una solución prometedora, siendo de especial interés la inhibición de promotores del cáncer en procesos carcinogénicos.

Hasta un 20% de la incidencia de cáncer a nivel mundial se correlaciona con agentes infecciosos, incluyendo virus. Entre estos, siete virus humanos se relacionan con la incidencia de cáncer en humanos, entre los cuales destaca el virus de Epstein-Barr (VEP), un virus linfotrópico de la familia herpesviridae. El VEP es el agente etiológico de la mononucleosis infecciosa³⁵ y del trastorno linfoproliferativo post trasplante, linfoma de Burkitt y de Hodgkin, y cáncer nasofaríngeo. Por otra parte, se considera un cofactor en varios carcinomas gástricos³⁶. Recientemente, se ha relacionado con enfermedades autoinmunes sistémicas como son la artritis reumatoide, síndrome de Sjögren, lupus eritematoso³⁷ o la esclerosis múltiple³⁸. Así, la inhibición de este virus se presenta como una excelente estrategia en la búsqueda de agentes quimiopreventivos o tratamiento de enfermedades inmunológicas³⁵.

³³ SHEWACH, D. S.; KUCHTA, R. D. (2009). Introduction to Cancer Chemotherapeutics. *Chem. Rev.*, 109(7), 2859–2861.

³⁴ *World Health Organization : Cancer (WHO, 2014)* [en línea]. [Fecha de consulta: 16 de mayo de 2014]. Disponible en internet: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>

³⁵ GOTTESMAN, M. M.; FOJO, T.; BATES, S. E. (2000). Multidrug Resistance in cancer: Role of ATP-dependent transporters. *Nat. Rev. Cancer*, 2, 48–58.

³⁶ ZHANG, X.; ZHANG, Z.; ZHENG, B.; HE, Z.; WINBERG, G.; ERNBERG, I. (2013). An update on viral association of human cancers. *Arch. Virol.*, 158, 1433–1443.

³⁷ DRABORG, A. H.; DUUS, K.; HOUEN, G. (2013). Epstein-Barr Virus in systemic autoimmune diseases. *Clin. Develop. Immun.*, vol. 2013, ID 535738, 9 páginas, doi:10.1155/2013/535738.

³⁸ PAKPOOR, J.; GIOVANNONI, G.; RAMAGOPALAN, S. V. (2013). Epstein-Barr virus and multiple sclerosis: association or causation. *Expert. Rev. Neurother.*, 13(3), 287–297.

En los últimos años, se han reportado estudios sobre la actividad inhibidora de la inducción de tumores de numerosos productos naturales, como los flavonoides, triterpenoides y quinonas³⁹. TAKASHI y col.⁴⁰ obtuvieron resultados excelentes ensayando sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos aislados de *Tripterygium wilfordii* por su actividad inhibidora de los antígenos tempranos del virus de Epstein-Barr, lo que se relaciona con una actividad quimiopreventiva (Fig. 3.10).

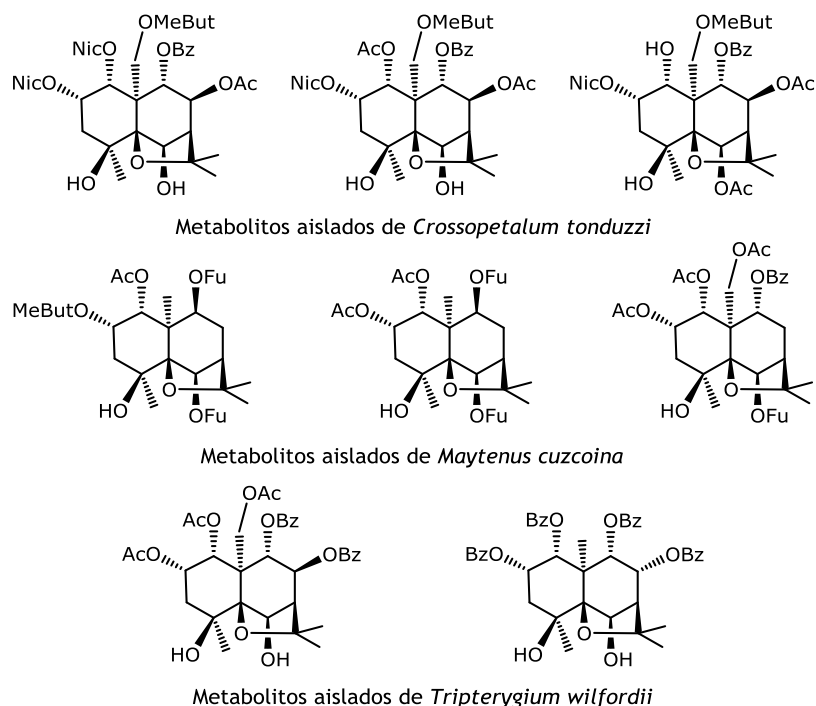


Fig. 3.10 | Sesquiterpenos con actividad inhibidora de la activación del virus de Epstein-Barr.

Nuestro grupo de investigación ha llevado a cabo estudios en colaboración con el Profesor H. TOKUDA de Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto (Japón), de la relación estructura-actividad de una serie de sesquiterpenos aislados de *Maytenus cuzcoina*⁴¹ y *Crossopetalum tonduzii*^{42,43} (Fig. 3.10). La actividad inhibidora de algunos de

³⁹ SACAU, E. P., ESTÉVEZ-BRAUN, A.; RAVELO, A. G.; FERRO, E. A.; TOKUDA, H.; MUKAINAKA, T.; NISHINO, H. (2003). Inhibitory effects of lapachol derivatives on epstein-barr virus activation. *Bioorg. Med. Chem.*, 11(4), 483–488.

⁴⁰ TAKAISHI, Y.; UJITA, K.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; IWASHIMA, A.; FUJITA, T. (1992). Inhibitory effects of dihydroagarofuran sesquiterpenes on Epstein-Barr virus activation. *Cancer Lett.*, 65(1), 19–26.

⁴¹ AKIHISA, T.; YASUKAWA, K.; TOKUDA, H. (2003). Potentially cancer chemopreventive and anti-inflammatory terpenoids from natural sources. En Atta-ur-Rahman (Ed.), *Studies in Natural Products Chemistry. Bioactive Natural Products (Parte J)*, Vol. 25. (pp. 73–126). Amsterdam: Elsevier.

⁴² JIMÉNEZ, I. A.; BAZZOCCHI, I. L.; NÚÑEZ, M. J.; MUKAINAKA, T.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; KONOSHIMA, T.; RAVELO, A. G. (2003). Absolute configuration of sesquiterpenes from *Crossopetalum tonduzii* and their inhibitory effects on Epstein-Barr virus early antigen activation in Raji cells. *J. Nat. Prod.*, 66, 1047–1050.

estos compuestos resultó mayor que la de glicirricina y el ácido retinoico⁴⁴, conocidos inhibidores de la activación tumoral. Los resultados obtenidos indican que este tipo de compuestos son prometedores como agentes quimiopreventivos.

Actividad revertidora de la multirresistencia a fármacos

Al impedir el éxito del tratamiento farmacológico de numerosas enfermedades, la aparición de multirresistencia a fármacos (MDR) es uno de los problemas más acuciantes en la Salud Pública a los que se enfrenta la medicina en la actualidad y en el futuro⁴⁵. Como ejemplos se pueden nombrar infecciones virales por el virus de herpes simplex⁴⁶ o el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)⁴⁷, infecciones parasitarias [leishmaniasis (*Leishmania donovani*)⁴⁸, enfermedad del sueño (*Trypanosoma brucei*)⁴⁹ o malaria (*Plasmodium falciparum*)⁵⁰] e infecciones bacterianas, incluyendo la intoxicación alimentaria (*Escherichia coli* y *Salmonella*), úlceras y gastritis (*Helicobacter pylori*), la gonorrea (*Neisseria gonorrhoea*), neumonía y envenenamiento por alimentos (*Staphylococcus aureus*)⁵¹ e incluso enfermedades que se creían bajo control, como la tuberculosis (*Mycobacterium tuberculosis*)⁵², el cólera (*Vibrio cholerae*)⁵³ o la peste (*Yersinia pestis*)⁵⁴.

⁴³ MENDOZA, C.; JIMÉNEZ, I. A.; TOKUDA, H.; KUSHIDA, H.; BAZZOCCHI, I. L. (2005). Antitumor-promoting effects of new sesquiterpenes from *Crossopetalum tonduzii*. *Chem. Biodivers.*, 2(2), 286–294.

⁴⁴ O'BRIAN, C. A.; WARD, N. E.; VOGEL, V. G. (1990). Inhibition of protein kinase C by the 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate antagonist glycyrrhetic acid. *Cancer Lett.*, 49(1), 9–12.

⁴⁵ SARASWATHY, M.; GONG, S. (2013). Different strategies to overcome multidrug resistance in cancer. *Biotechn. Adv.*, 31 (8), 1397–1407.

⁴⁶ KRAWCZYK, A.; ARNDT, M. A. E.; GROSSE-HOVEST, L.; WEICHERT, W.; GIEBEL, B.; DITTMER, U.; HENGEL, H.; JÄGER, D.; SCHNEWEIS, K. E.; EIS-HÜBINGER, A. M.; ROGGENDORF, M.; KRAUSS, J. (2013). Overcoming drug-resistant herpes simplex virus (HSV) infection by a humanized antibody. *PNAS*, 110 (17), 6760–6765.

⁴⁷ AGNISWAMY, J.; SHEN, C. H.; WANG, Y. F.; GOSH, A. K.; RAO, K. V.; XU, C. X.; SAYER, J. M.; LOUIS, J. M.; WEBER, I. T. (2013). Extreme multidrug resistant HIV-1 protease with 20 mutations is resistant to novel protease inhibitors with P1'-pyrrolidinone or P2-tris-tetrahydrofuran. *J. Med. Chem.*, 56(10), 4017–4027.

⁴⁸ CHOWDHURY, S.; MUKHOPADHYAY, R.; SAHA, S.; MISHRA, A.; SENGUPTA, S.; ROY, S.; MAJUMDER, H. K. (2014). Flavone resistant *Leishmania donovani* over expresses LdMRP2 transporter in the parasite and activates host MRP2 on macrophages to circumvent the flavone-mediated cell death. *J. Biol. Chem.*, doi: 10.1074/jbc.M113.539742.

⁴⁹ GOULD, M. K.; SCHNAUFER, A. (2014). Independence from kinetoplast DNA maintenance and expression is associated with Multidrug Resistance in *Trypanosoma brucei* in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 58 (5), 2925–2928.

⁵⁰ POESOPRODJO, J. R.; FOBIA, W.; KENANGALEM, E.; LAMPAH, D. A.; SUGIARTO, P.; TJITRA, E.; ANSTEY, N. M.; PRICE, R. N. (2014). Dihydroartemisinin-piperazine treatment of multidrug resistant *falciparum* and *vivax* malaria in pregnancy. *PLOS ONE*, 9(1): e84976. doi:10.1371/journal.pone.0084976.

⁵¹ KUMUR, S.; MUKHERJEE, M. M.; VARELA, M. F. (2013). Modulation of Bacterial Multidrug Resistance Efflux Pumps of the Major Facilitator Superfamily. *Int. J. Bacteriol.*, vol. 2013, ID 204141, 15 páginas, doi:10.1155/2013/204141.

⁵² MAGIORAKOS, A.-P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R. B.; CARMELI, Y.; FALAGAS, M. E.; GISKE, C. G.; HARBARTH, S.; HINDLER, J. F.; KAHLMEYER, G.; OLSSON-LILJEQUIST, B.; PATERSON, D. L.; RICE, L. B.; STELLING, J.; STRUELENS, M. J.; VATOPOULOS, A.; WEBER, J. T.; MONNET, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.*, 18, 268–281.

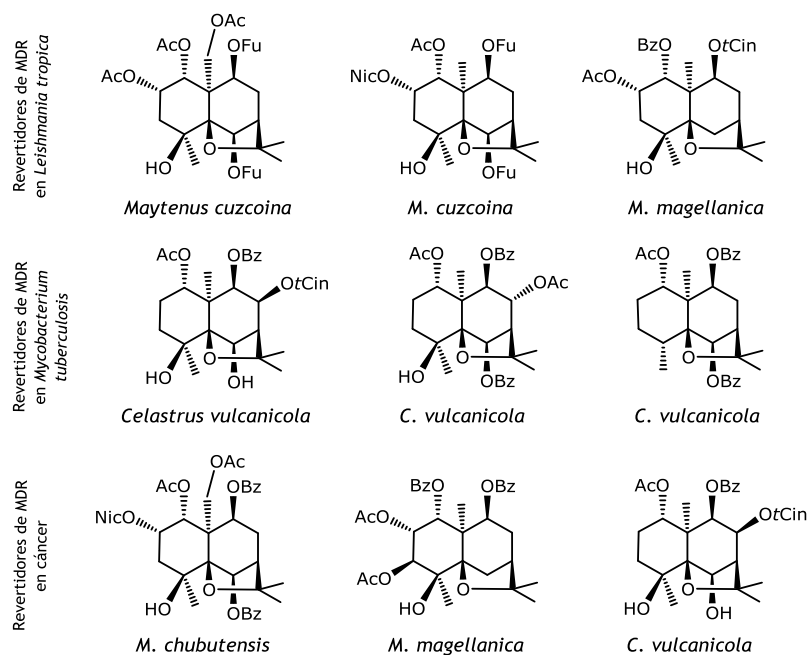


Fig. 3.11 | Sesquiterpenos con actividad revertidora de la MDR en *Leishmania tropica*, *Mycobacterium tuberculosis* y en células cancerígenas.

Los sesquiterpenos dihidro- β -agarofuránicos son capaces de revertir el fenómeno de MDR no sólo en cáncer, sino también en enfermedades parasitarias y bacterianas. Así, se han reportado este tipo de metabolitos aislados de *Gymnospora cassinoides* (antes: *Maytenus canariensis*), *Maytenus apurimacensis*, *M. chubutensis*, *M. cuzcoina* y *M. magellanica*, así como compuestos semisintéticos con actividad revertidora de la MDR en *Leishmania tropica* resistente a daunomicina^{55,56,57,58,59}, incluyendo estudios de

⁵³ AKOACHERE, J.-F. T. K.; MASALLA, T. N.; NJOM, H. A. (2013). Multi-drug resistant toxigenic *Vibrio cholerae* O1 is persistent in water sources in New Bell-Douala, Cameroon. *BMC Infectious Diseases* 2013, 13:366 doi:10.1186/1471-2334-13-366.

⁵⁴ ANDRIANAIVOARIMANANA, V.; KREPPPEL, K.; ELISSA, N. DUPLANTIER, J.-M.; CARNIEL, E.; RAJERISON, M.; JAMBOU, R. (2013). Understanding the persistence of plague loci in Madagascar. *PLOS Negl. Trop. Dis.* doi: 10.1371/journal.pntd.0002382.

⁵⁵ PÉREZ-VICTORIA J. M., TINCUSI B. M., JIMÉNEZ I. A., BAZZOCCHI I. L., GUPTA M. P., CASTANYS S., GAMARRO F., RAVELO A. G. (1999). New natural sesquiterpenes as modulators of daunomycin resistance in a multidrug-resistant *Leishmania tropica* Line., *J. Med. Chem.*, 42, 4388–4393.

⁵⁶ PÉREZ-VICTORIA, J. M.; PÉREZ-VICTORIA, F. J.; PARODI-TALICE, A.; JIMÉNEZ, I. A.; RAVELO, A. G.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F. (2001). Alkyl-lysophospholipid resistance in multidrug-resistant *Leishmania tropica* and chemosensitization by a novel P-glycoprotein-like transporter modulator. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 45 (9), 2468–2474.

⁵⁷ KENNEDY, M. L. CORTÉS-SELVA, F. PÉREZ-VICTORIA, J. M.; JIMÉNEZ, I. A., GONZÁLEZ, A. G., MUÑOZ, O. M.; GAMARRO, F.; CASTANYS, S.; RAVELO, A. G. (2001). Chemosensitization of a multidrug-resistant *Leishmania tropica* line by new sesquiterpenes from *Maytenus magellanica* and *Maytenus chubutensis*. *J. Med. Chem.*, 44, 4668–4676.

⁵⁸ CORTÉS-SELVA, F.; CAMPILLO, M.; REYES, C. P.; JIMÉNEZ, I. A.; CASTANYS, S.; BAZZOCCHI, I. L.; PARDO, L.; GAMARRO, F.; RAVELO, A. G. (2004). SAR studies of dihydro-beta-agarofuran sesquiterpenes as inhibitors of the multidrug-resistance

modelización molecular 3D-QSAR⁶⁰ (Fig. 3.11). Por otra parte, metabolitos de este tipo aislados de *Celastrus vulanicola*, se revelaron como revertidores de la MDR en *Mycobacterium tuberculosis*⁶¹.

Sin embargo, la actividad revertidora de la MDR más estudiada ha sido en cáncer. Así, estos sesquiterpenos han mostrado ser potentes inhibidores de la P-glicoproteína (Pgp), uno de los transportadores de fármacos implicados en la aparición de MDR en cáncer. Son capaces de revertir este fenómeno en células multirresistentes MDR1 frente a daunomicina e vinblastina, fármacos usados en clínica, exhibiendo una actividad comparable a verapamilo, un quimiosensibilizador de primera generación⁶². Los metabolitos ensayados se han aislado de varias especies de la familia Celastraceae, incluyendo *Celastrus vulcanicola*⁶³, *Gymnosporia cassinoides* (antes *Maytenus canariensis*), *Maytenus chubutensis*, *M. cuzcoina*, *M. magellanica*⁶⁴, *M. jelskii*⁶⁵, y sesquiterpenos agarofuránicos semisintéticos. Basándose en los datos obtenidos, se ha realizado un estudio del mecanismo molecular de los sesquiterpenos como inhibidores específicos, no transportados de la Pgp⁶⁶.

phenotype in a *Leishmania tropica* line overexpressing a P-glycoprotein-like transporter. *J. Med. Chem.*, 47 (3), 576–587.

⁵⁹ DELGADO-MÉNDEZ, P.; HERRERA, N.; CHAVEZ, H.; ESTÉVEZ-BRAUN, A.; RAVELO, A. G.; CORTÉS, F.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F. (2008) New terpenoids from *Maytenus apurimacensis* as MDR reversal agents in the parasite *Leishmania*. *Bioorg. Med. Chem.*, 16, 1425–1430.

⁶⁰ REYES, C. P.; MUÑOZ-MARÍNEZ, F.; TORRECILLAS, I. R.; MENDOZA, C. R.; GAMARRO, F.; BAZZOCCHI, I. L.; NÚÑEZ, M. J.; PARDO, L.; CASTANYS, S.; CAMPILLO, M.; JIMÉNEZ, I. A. (2007). Biological evaluation, structure-activity relationships and three-dimensional quantitative structure-activity relationship studies of dihydro- β -agarofuran sesquiterpenes as modulators of P-glycoprotein-dependent multidrug resistance. *J. Med. Chem.*, 2007, 50(20), 4808–4817.

⁶¹ TORRES-ROMERO, D.; JIMÉNEZ, I. A.; ROJAS, R.; GILMAN, R.; LÓPEZ, M.; BAZZOCCHI, I. L. (2011). Dihydro- β -agarofuran sesquiterpenes isolated from *Celastrus vulcanicola* as potential anti-*Mycobacterium tuberculosis* multidrug-resistant agents. *Bioorgan. Med. Chem.*, 19, 2182–2189.

⁶² TSURUO, T.; IIDA, H.; TSUKAGOSHI, S.; SAKURAI, Y. (1981). Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Cancer Res.*, 41(5), 1967–1972.

⁶³ TORRES-ROMERO, D.; MUÑOZ-MARTÍNEZ, F.; JIMÉNEZ, I. A.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F.; BAZZOCCHI, I. L. (2009). Novel dihydro- β -agarofuran sesquiterpenes as potent modulators of human P-glycoprotein dependent multidrug resistance. *Org. Biomol. Chem.*, 7, 5166–5172.

⁶⁴ MUÑOZ-MARTÍNEZ, F.; LU, P.; CORTÉS-SELVA, F.; PÉREZ-VICTORIA, J. M.; JIMÉNEZ, I. A.; RAVELO, A. G.; SHAROM, F. J.; GAMARRO, F.; CASTANYS, S. (2004). Celastraceae sesquiterpenes as a new class of modulators that bind specifically to human P-glycoprotein and reverse multidrug resistance. *Cancer Res.*, 64, 7130–7138.

⁶⁵ PERESTELO, N. R.; SÁNCHEZ-CAÑETE, M. P.; GAMARRO, F.; JIMÉNEZ, I. A.; CASTANYS, S.; BAZZOCCHI, I. L. (2011). Overcoming human P-glycoprotein-dependent multidrug resistance with novel dihydro- β -agarofuran sesquiterpenes. *Eur. J. Med. Chem.*, 46, 4915–4923.

⁶⁶ MUÑOZ-MARTÍNEZ, F.; REYES, C. P.; PÉREZ-LOMAS, A. L.; JIMÉNEZ, I. A.; GAMARRO, F.; CASTANYS, S. (2006). Insights into the molecular mechanism of action of *Celastraceae* sesquiterpenes as specific, non-transported inhibitors of human P-glycoprotein. *Biochim. Biophys. Acta*, 1758, 98–110.

3.2 | RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.2.1 | Sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos aislados de las hojas de *Celastrus vulcanicola*

Con los antecedentes descritos y con el objeto de obtener cantidad suficiente de producto de partida para preparar una quimioteca de sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos y, posteriormente, determinar su influencia en la reversión del fenómeno de la multirresistencia (MDR) a fármacos en cáncer, se realizó el estudio fitoquímico de los hojas de *Celastrus vulcanicola*. El estudio de las hojas de esta especie ya había sido realizado con anterioridad en nuestro grupo de investigación^{61,67,68,69}, resultando ser una extraordinaria fuente de este tipo de metabolitos.

Siguiendo la metodología establecida en nuestro laboratorio, se aislaron treinta y dos sesquiterpenos poliesterificados con esqueleto de dihidro- β -agarofurano que hemos denominado de **A1–A32** (Fig. 3.12). Dieciocho de ellos resultaron nuevos en la bibliografía química (**A1–A4**, **A7–A10**, **A12**, **A14**, **A15**, **A20–A25**, **A28** y **A30**) y siete se reportan por primera vez en *C. vulcanicola* (**A5**, **A6**, **A11**, **A13**, **A26**, **A27**, **A29** y **A32**), mientras que los compuestos restantes, **A16–A19** y **A31**^{61,67}, se habían aislado en el estudio anterior. Por otra parte, con el objetivo de determinar la configuración absoluta de **A1**, se preparó el derivado benzoilado **1a**.

Las estructuras de los nuevos metabolitos aislados fueron determinadas mediante técnicas espectroscópicas de RMN, incluyendo experimentos de ¹H y ¹³C homo- (COSY, NOESY, ROESY) y heteronucleares (HSQC, HSQC editado, HMBC), IR, UV y espectrometría de masas. Por otra parte, las estructuras de los compuestos reportadas anteriormente fueron caracterizadas basándose en sus datos físicos, espectroscópicos y espectrométricos y comparación de los mismos con los datos existentes en la bibliografía química, siendo:

A5: 1 α ,2 α ,6 β ,8 β ,13-pentaacetiloxi-9 β -benzoiloxi-4 β -hidroxi-dihidro- β -agarofurano⁷⁰.

⁶⁷ TORRES-ROMERO, D.; KING-DÍAZ, B.; JIMÉNEZ, I. A.; LOTINA-HENNSEN, B.; BAZZOCCHI, I. L. (2008). Sesquiterpenes from *Celastrus vulcanicola* as photosynthetic inhibitors. *J. Nat. Prod.*, 71(8), 1331–1335.

⁶⁸ TORRES-ROMERO, D.; KING-DÍAZ, B.; STRASSER, R. J.; JIMÉNEZ, I. A.; LOTINA-HENNSEN, B.; BAZZOCCHI, I. L. (2010). Friedelane triterpenes from *Celastrus vulcanicola* as photosynthetic inhibitors. *J. Agric. Food Chem.*, 58, 10847–10854.

⁶⁹ NÚÑEZ, M. J.; ARDILES, A. E.; MORENA, M. L.; TORRES-ROMERO, D.; JIMÉNEZ, I. A.; BAZZOCCHI, I. L. (2013). Triterpenoids from *Cassine xylocarpa* and *Celastrus vulcanicola* (Celastraceae). *Phytochem. Lett.*, 6, 148–151.

⁷⁰ WU, W.; WANG, M.; ZHU, J.; ZHOU, W.; HU, Z.; JI, Z. (2001). Five new insecticidal sesquiterpenoids from *Celastrus angulatus*. *J. Nat. Prod.*, 64, 364–367.

- A6:** 1 α ,2 α ,8 β ,15-pentaacetiloxi-9 β -benzoiloxi-6 β ,4 β -dihidroxi-dihidro- β -agarofurano⁷¹.
- A11:** (1*R*,2*S*,4*S*,5*S*,6*R*,7*R*,8*S*,9*R*,10*S*)-1,8-diacetiloxi-6,9-dibenzoiloxi-2,4-dihidroxi-dihidro- β -agarofurano⁷².
- A13:** 1 α ,2 α ,8 β ,14-tetraacetiloxi-9 β -benzoiloxi-dihidro- β -agarofurano⁷³.
- A16:** (1*S*,4*S*,5*S*,6*R*,7*S*,8*S*,9*R*,10*S*)-1-acetiloxi-9-benzoiloxi-8-cis-cinamoiloxi-4,6-dihidroxi-dihidro- β -agarofurano⁷².
- A17:** (1*S*,4*S*,5*S*,6*R*,7*S*,8*S*,9*R*,10*S*)-1-acetiloxi-9-benzoiloxi-8-cinamoiloxi-4,6-dihidroxi-dihidro- β -agarofurano⁶⁷.
- A18:** (1*S*,4*S*,5*S*,6*R*,7*R*,8*S*,9*R*,10*S*)-1,6-diacetiloxi-9-benzoiloxi-8-cinamoiloxi-4-hidroxi-dihidro- β -agarofurano⁶⁷.
- A19:** (1*S*,4*S*,5*S*,6*R*,7*R*,8*S*,9*R*,10*S*)-1,8-diacetiloxi-9-benzoiloxi-4-hidroxi-6-nicotinoiloxi-dihidro- β -agarofurano⁷².
- A26:** 1 α ,2 α ,6 β ,15-tetraacetiloxi-9 β -benzoiloxi-4 β -hidroxi-dihidro- β -agarofurano⁷⁴.
- A27:** 1 α ,6 β ,15-triacetiloxi-2 α ,9 β -dibenzoilozidihidro- β -agarofurano⁷⁵.
- A29:** (1*S*,4*S*,5*S*,6*R*,7*R*,9*S*,10*S*)-9-benzoiloxi-1,6,15-triacetiloxi-4-hidroxi-dihidro- β -agarofurano⁷⁶.
- A31:** (1*S*,4*S*,5*S*,6*R*,7*R*,8*R*,9*R*,10*S*)-1,8-diacetiloxi-9-benzoiloxi-4-hidroxi-6-nicotinoiloxi-dihidro- β -agarofurano⁷².
- A32:** 1 α ,6 β -diacetiloxi-9 β -cinamoiloxi-dihidro- β -agarofurano (triptogelin F-2)⁷⁷.

⁷¹ WEI, S.-P.; JI, Z.-Q.; ZHANG, H.-X.; ZHANG, J.-W.; WANG, Y.-H.; WU, W.-J. (2011). Isolation, biological evaluation and 3D-QSAR studies of insecticidal/narcotic sesquiterpene polyol esters. *J. Mol. Model*, 17, 681-693.

⁷² TORRES-ROMERO, D.; MUÑOZ-MARTÍNEZ, F.; JIMÉNEZ, I. A.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F.; BAZZOCCHI, I. L. (2009). Novel dihydro- β -agarofuran sesquiterpenes as potent modulator of human P-glycoprotein dependent multidrug resistance. *Org. Biomol. Chem.*, 7, 5166-5172.

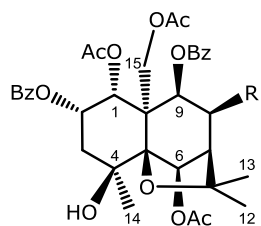
⁷³ WENG, J.-R.; YEN, M.-H. (2010). New dihydroagarofuranoid sesquiterpenes from *Celastrus paniculatus*. *Helv. Chim. Acta*, 93, 1716-1724.

⁷⁴ HOHMANN, J.; DINI, Z.; PELCZER, I.; JERKOVICH, G. (1994). Sesquiterpene esters from *Euonymus nanus*. *Pytochem.*, 35 (5), 1267-1270.

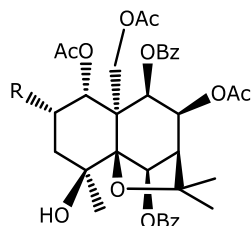
⁷⁵ HOHMANN, J.; GÁBOR, N.; DINI, Z.; GÜNTHER, G. (1995). New Sesquiterpene polyesters from *Euonymus* species. *J. Nat. Prod.*, 58 (8), 1192-1199.

⁷⁶ GONZÁLEZ, A. G.; JIMÉNEZ, I. A.; RAVELO, A. G.; BAZZOCCHI, I. L. (1993). Minor sesquiterpenes from *Maytenus canariensis* with insecticidal and antifeedant activity. *Tetrahedron*, 49 (30), 6637-6644.

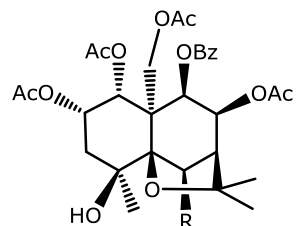
⁷⁷ TAKAISHI, Y.; AIHARA, F.; SHOUJI, T.; NAKANO, K.; TOMIMATSU, T. (1992). Sesquiterpene esters from *Tripterygium wilfordii*. *Phytochem.*, 31 (11), 3943-3947.



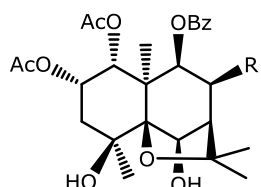
A1* R = OH
A2* R = OAc



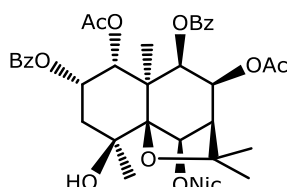
A3* R = OAc
A4* R = ONic



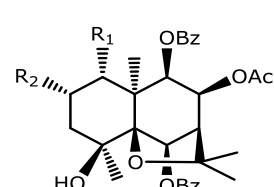
A5 R = OAc
A6 R = OH



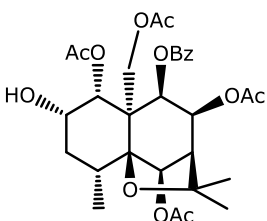
A7* R = OtCin
A8* R = OAc



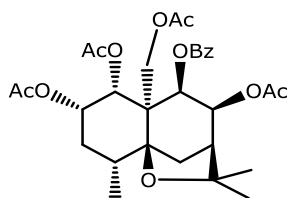
A9*



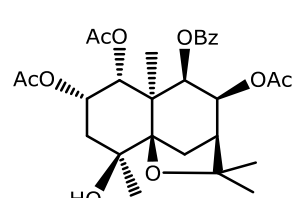
A10* R₁=OH, R₂=OAc
A11 R₁=OAc, R₂=OH



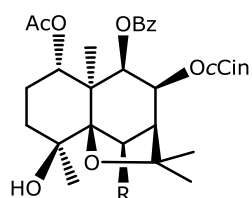
A12*



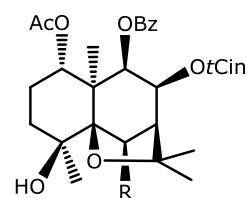
A13



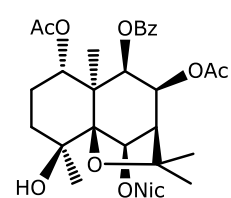
A14*



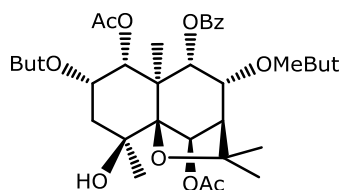
A15* R = OAc
A16 R = OH



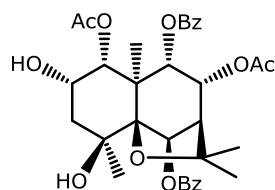
A17 R = OH
A18 R = OAc



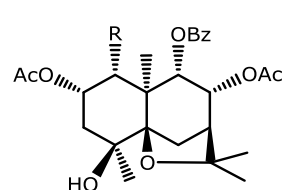
A19



A20*



A21*



A22* R = OH
A23* R = OAc

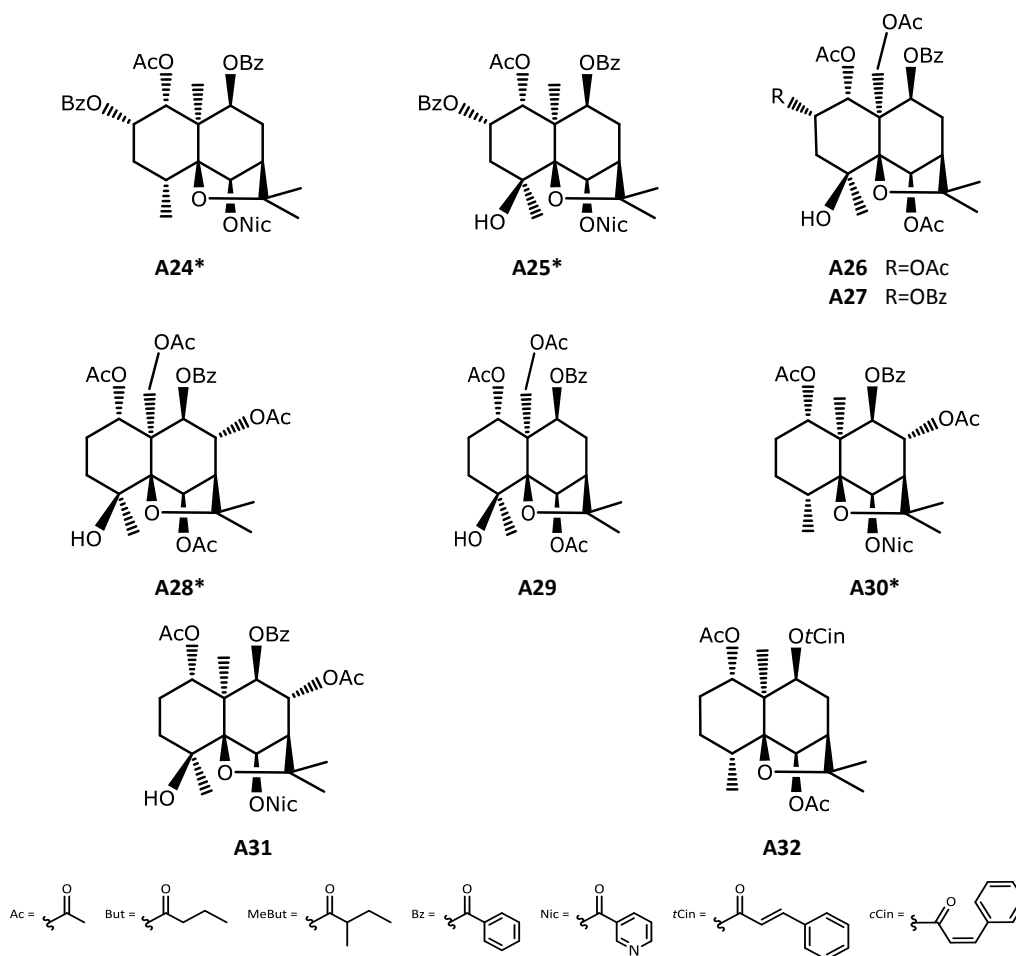


Fig. 3.12 | Sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos aislados de las hojas de *Celastrus vulcanicola*. Los compuestos que resultaron nuevos en la bibliografía química se indican con un asterisco.

A continuación, se describirá el aislamiento y la elucidación estructural de aquellos compuestos que no han sido reportados en la bibliografía hasta la fecha.

Sesquiterpeno A1

Al compuesto que hemos denominado A1, le hemos asignado la fórmula molecular $C_{35}H_{40}O_{13}$, basándonos en sus datos de masas de alta resolución. En su espectro de infrarrojo se observaron bandas correspondientes a grupo hidroxilo a 3518 cm^{-1} y a grupo éster a 1743 y 1726 cm^{-1} . Su espectro de masas muestra fragmentos correspondientes a pérdidas de metilo [M^+-15 , 653 m/z , CH_3], agua [M^+-18 , 650 m/z , H_2O], ácido acético [M^+-60 , 608 m/z , CH_3COOH] y ácido benzoico [$M^+-15-122$, 531 m/z , CH_3 , $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_2$, 105 m/z , $\text{C}_7\text{H}_5\text{O}^+$]. En su espectro de RMN de ^1H (Fig. 3.13 y Tabla 3.) se

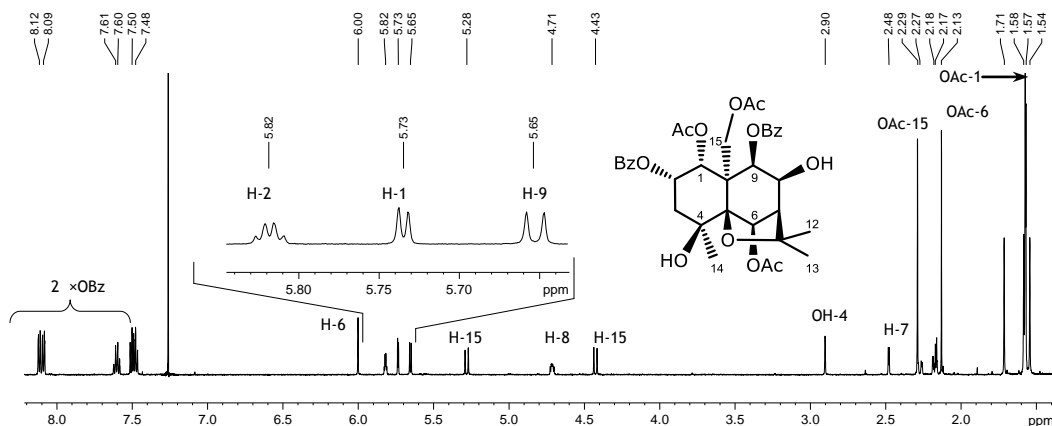


Fig. 3.13 | Espectro de RMN de ^1H del compuesto A1 (CDCl_3 , 400 MHz).

observó la presencia de tres singuletes a δ_{H} 1.57, 2.13 y 2.29 δ que integran para tres protones cada uno, correspondiendo a tres grupos acetato, así como señales que integran para diez protones entre δ_{H} 7.48 y 8.12, cuya forma y desplazamiento indican la presencia en la molécula de dos grupos benzoato. La presencia de dichos ésteres fue confirmada mediante RMN de ^{13}C . En su espectro de RMN de ^1H (Fig. 3.13), además, se observaron tres sistemas de espines, el primero de ellos un sistema ABX_2 formado por un doblete a δ_{H} 5.73 δ ($J = 3.4$ Hz, H-1), un doblete a δ_{H} 5.82 ($J = 3.4, 6.8$ Hz, H-2) y un doblete a δ_{H} 2.27 ($J = 3.4, 15.1$, H-3 β) y doblete a δ_{H} 2.18 ($J = 2.9, 15.1$, H-3 α), que integran para un protón cada uno. El segundo sistema AMX presentó señales a δ_{H} 5.65 (d, $J = 6.5$ Hz, H-9), 4.71 (ddd, $J = 3.4, 4.9, 6.5$, H-8) y 2.48 (d, $J = 3.4$ Hz, H-7) y un sistema AB a δ_{H} 4.43 y 5.28 (2H, $J = 12.8$ Hz, H₂-15). Además, se observó un singulete a δ_{H} 6.00 (H-6), así como señales correspondientes a tres metilos como singulete a δ_{H} 1.54 (Me-14), 1.58 (Me-12) y 1.71 (Me-13). Su espectro de RMN de ^{13}C (Fig. 3.14) mostró señales para 35 carbonos, los cuales fueron clasificados en 6 metilos, 2 metilenos,

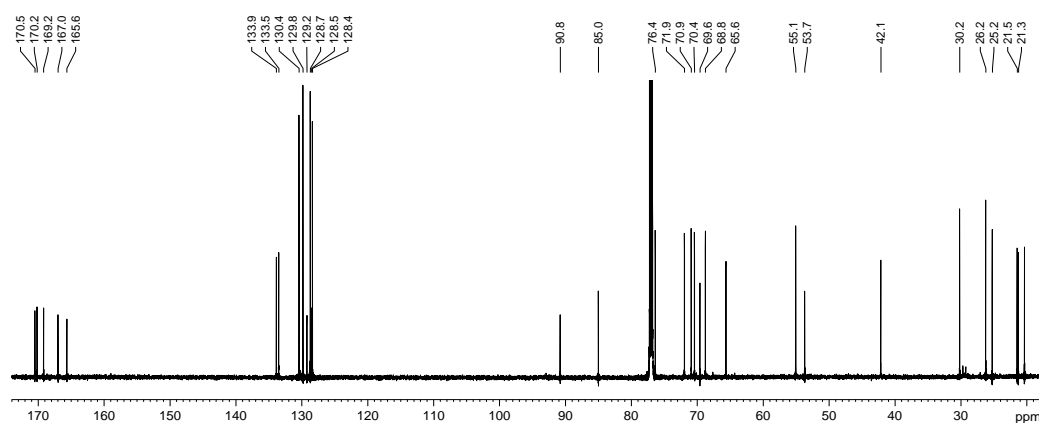


Fig. 3.14 | Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto A1 (CDCl_3 , 150 MHz).

16 metinos y 11 carbonos cuaternarios mediante el análisis de su espectro de RMN bidimensional tipo HSQC editado (Fig. 3.15). El conjunto de estos datos está de acuerdo con que el compuesto que hemos denominado **A1** es un sesquiterpeno poliesterificado que posee dos grupos benzoato, tres grupos acetatos y dos grupos hidroxilo, siendo uno secundario y el otro terciario, en las posiciones 1, 2, 4, 6, 8, 9 y 15.

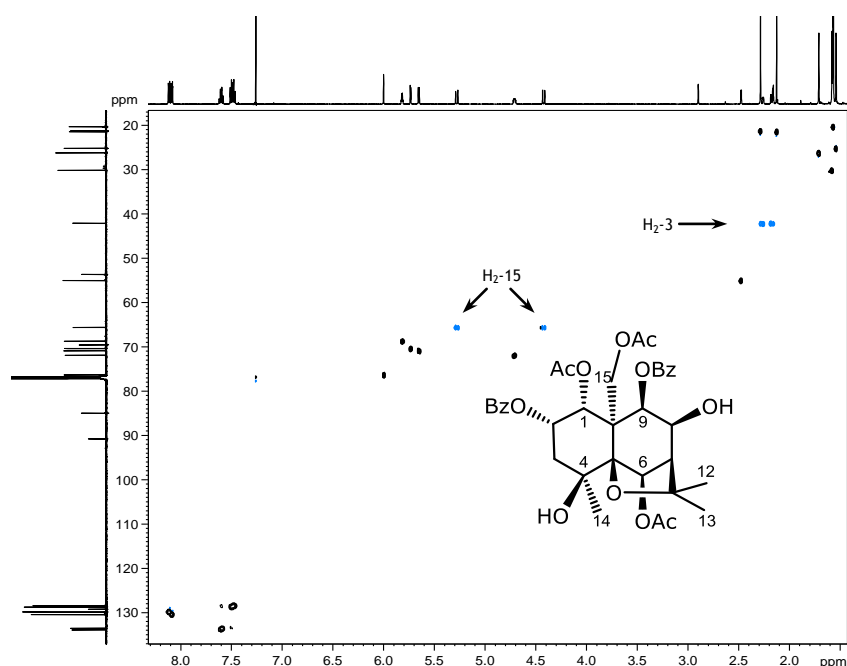


Fig. 3.15 | Experimento HSQC editado del compuesto A1. Las señales correspondientes a grupos metilénicos se indican en azul.

Con la finalidad de confirmar esta propuesta, se llevó a cabo un estudio de experimentos de RMN bidimensionales. Así, al objeto de determinar la regiosustitución del compuesto, se realizó un experimento HMBC (Fig. 3.16), donde se observaron correlaciones a tres enlaces entre las señales a δ_H 5.73 (H-1), 6.00 (H-6) y 4.43, 5.28 (H₂-15) con los carbonos carboxílicos de los grupos acetato a δ_C 169.2, 170.2 y 170.5, respectivamente. Así mismo, se observó correlación de la señal a δ_H 5.82 (H-2) y 5.65 (H-9) con los carbonos carboxílicos de los grupos benzoatos a δ_C 165.6 y 167.0, respectivamente. Además, el experimento HMBC nos permitió determinar la posición del alcohol secundario sobre C-8 y el terciario sobre C-4, al presentar correlación de la señal a δ_H 2.17 (OH-8) con el C-7 (δ_C 55.1) y C-8 (δ_C 71.9) y correlación de la señal a δ_H 2.90 (OH-4) con C-4 (δ_C 69.6) y el Me-14 (δ_C 25.2).

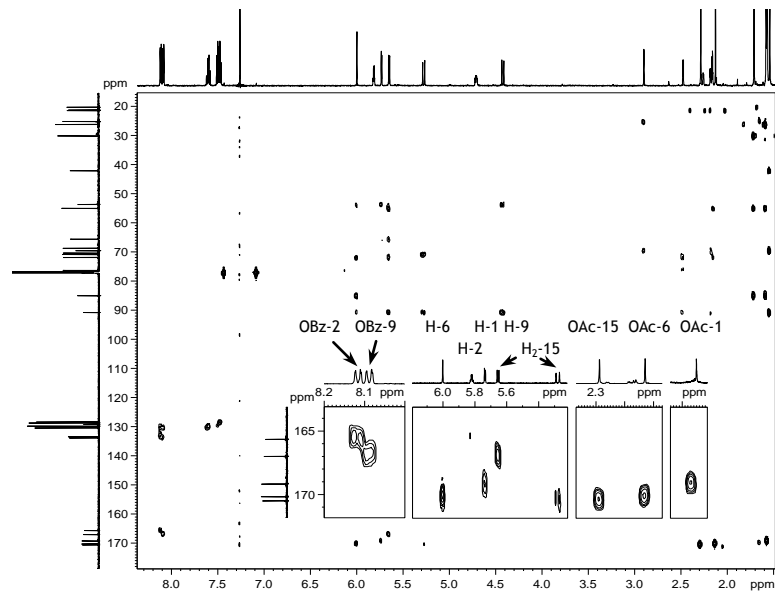


Fig. 3.16 | Experimento HMBC del compuesto A1. En la ampliación se presenta la región correspondiente a las señales correspondientes a los carbonilos entre δ_c 162 y 172, lo que permitió determinar la regiosustitución de los grupos acetatos (C-1, C-6 y C-15) y benzoatos (C-2 y C-9).

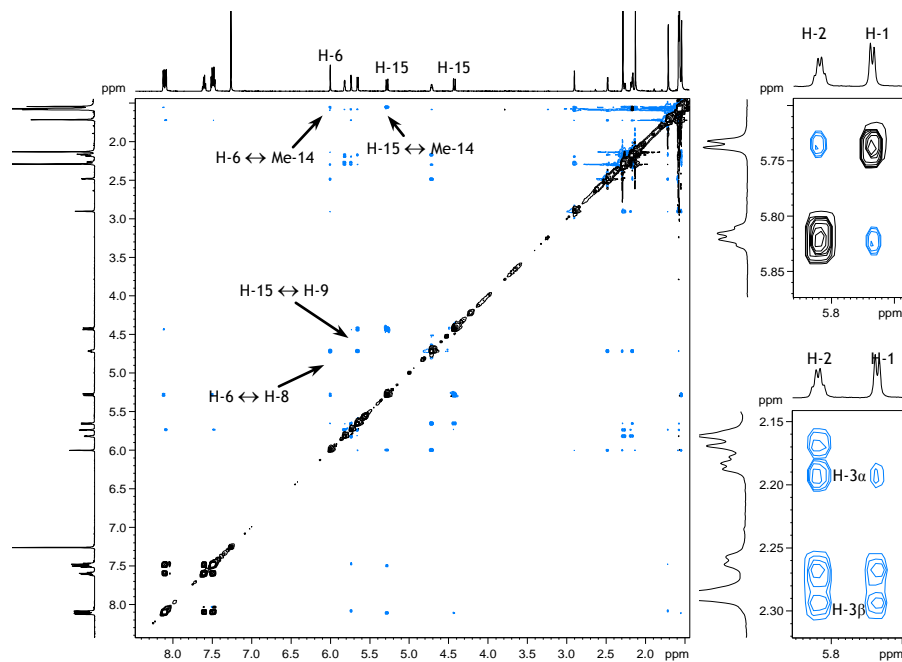


Fig. 3.17 | Correlaciones observadas en el experimento ROESY del compuesto A1.

La configuración relativa fue establecida mediante el estudio de las constantes de acoplamiento $J_{H1,H2}$ y $J_{H8,H9}$ que indicaron una disposición *cis* de H-1–H-2 y H-8–H-9, lo que fue confirmado mediante un experimento ROESY (Fig. 3.17), donde se observó correlación espacial del Me-15 con H-9/Me-14, correlación de H-6 con H-8/Me-14, así como de H-1 β con H-2 β /H3 β .

La determinación de la configuración absoluta de **A1** se estableció basándose en el estudio de la curva de dicroísmo circular de su derivado **1a**, debido a que la interacción del par de cromóforos situados en C-2 y C-9 en **A1** es coplanar, por lo que fue necesario la introducción de un tercer grupo cromóforo. Por ello, se preparó un derivado por benzoilación del carbono C-8 en las condiciones habituales tal como se detalla en la parte experimental de esta Memoria, lo que rindió el tribenzoato **1a**. Su estructura fue establecida basándose en sus datos espectrométricos y espectroscópicos.

Así, en el espectro de ^1H del derivado **1a** (Fig. 3.18), se observó como principales diferencias con el producto de partida **A1** la ausencia de las señales correspondientes al grupo hidroxilo sobre C-8 a δ_{H} 2.17 (1H, d, $J = 4.9$ Hz, OH-8) en **A1** y el desplazamiento de la señal asignada a H-8 de δ_{H} 4.71 a 6.10, indicando la esterificación en esta posición. Para confirmar esta propuesta y determinar la configuración relativa sobre C-8, se llevaron a cabo experimentos de RMN bidimensionales. Así, en el experimento HMBC, se observan correlaciones a larga distancia del carbono carboxílico de un grupo benzoato a δ_{C} 164.8 con el H-8 a δ_{H} 6.10, y en un experimento ROESY se observó NOE entre H-8 y H-6. Estos datos nos confirman la estructura propuesta para el derivado que hemos denominado **1a**.

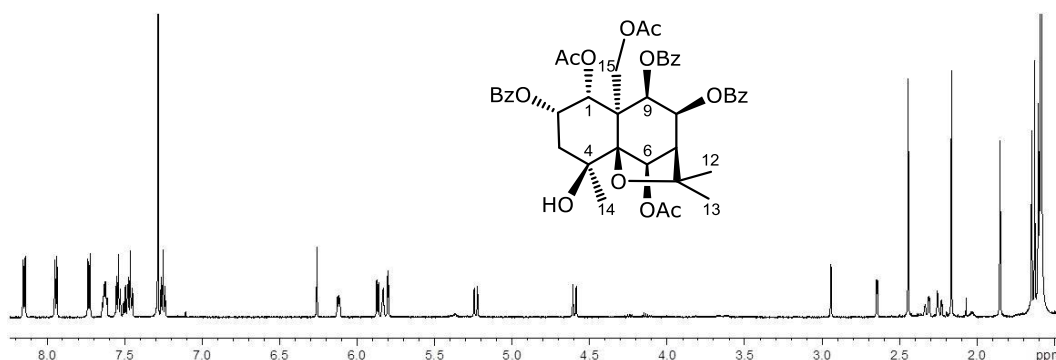


Fig. 3.18 | Espectro de RMN de ^1H del derivado **1a (CDCl_3 , 600 MHz).**

Su espectro de dicroísmo circular (Fig. 3.19) presenta una curva bisignada, con un primer efecto Cotton negativo a 241.6 nm ($\Delta\epsilon = -6.0$) y un segundo efecto Cotton positivo a 225.8 nm ($\Delta\epsilon = +9.3$), debido al acoplamiento de los dos grupos cromóforos benzoatos situados en los carbonos C-8 y C-9. Los ángulos diedros fueron calculados utilizando un programa de mecánica molecular (PC Model 9.200), lo que nos indicó que los dos benzoatos en C-8 y C-9 forman un ángulo diedro aproximado de 32.5° , lo que nos permitió determinar la configuración absoluta del derivado **1a** utilizando el método de la quiralidad del benzoato^{67,78}. Así, la configuración absoluta del metabolito **A1** se determinó como (1*S*,2*S*,4*S*,5*S*,6*R*,7*S*,8*S*,9*R*,10*S*)-1,6,15-triacetoxi-2,9-dibenzoiloxi-4,8-dihidroxi-dihidro- β -agarofurano mediante correlación química con **1a**.

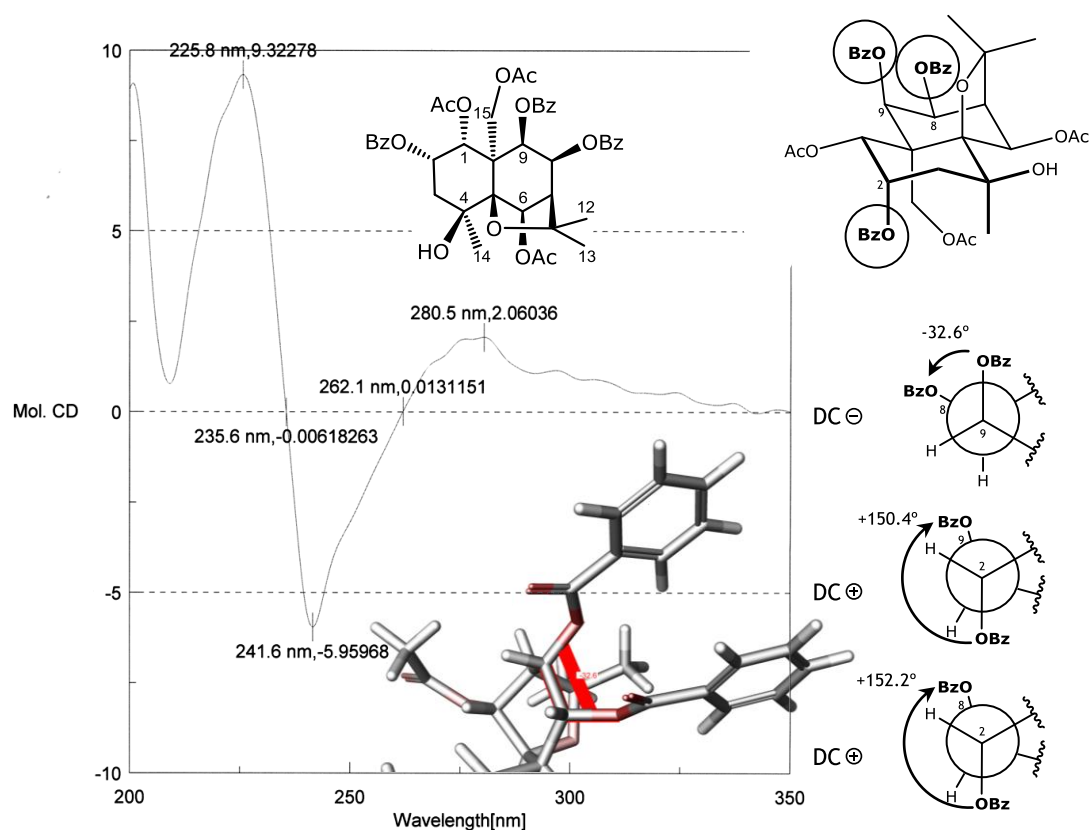


Fig. 3.19 | Curva de dicroísmo circular del derivado **1a**. Las proyecciones de Newman indican los ángulos entre los diferentes grupos benzoato que fueron determinados mediante mecánica molecular (PC Model 9.200).

⁷⁸ HARADA, N.; NAKANISHI, K. (1983). *Circular dichroism spectroscopy exciton coupling in organic stereochemistry*, Mill Valley, CA, University Science Books.

Sesquiterpeno A2

El metabolito **A2** presentó una fórmula molecular de $C_{37}H_{42}O_{14}$, determinada mediante espectrometría de masas de alta resolución. El estudio de sus datos físicos y espectroscópicos mostró que estaba relacionado con **A1**. Así, la principal diferencia en su espectro de RMN de 1H (Fig. 3.20), con respecto a **A1**, es la presencia adicional de la señal correspondiente a un grupo acetato (δ_H 1.89, 3H, s) y el desplazamiento de la señal asignada a H-8 ($4.71 \delta_H$) en **A1** a δ_H 5.87 en **A2** (Tabla 3.2), datos que están de acuerdo con una estructura de 8-*O*-acetil derivado de **A1**. Esto fue confirmado mediante un cuidadoso estudio de los experimentos bidimensionales (COSY, ROESY, HSQC y HMBC), lo que nos permitió establecer la posición y estereoquímica relativa de los diferentes grupos sobre el esqueleto sesquiterpénico como 1 α ,6 β ,8 β ,15-tetraacetiloxi-2 α ,9 β -dibenzoiloxi-4 β -hidroxi-dihidro- β -agarofurano.

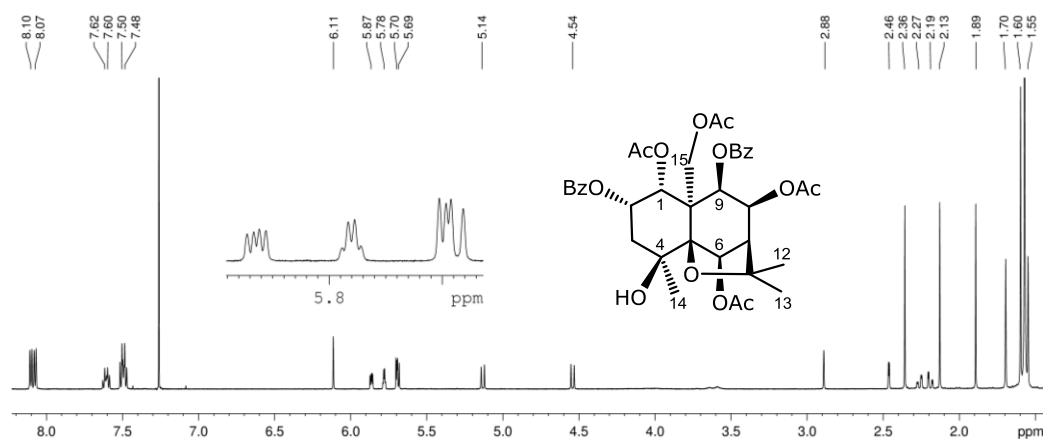


Fig. 3.20 | Espectro de RMN de 1H del compuesto **A2** ($CDCl_3$, 600 MHz).

Sesquiterpenos A3 y A4

Las estructuras de los compuestos **A3** y **A4** fueron establecidas en base a sus datos espectroscópicos y espectrométricos que indicaron que ambos poseen el mismo esqueleto polihidroxílico base. En sus espectros de RMN de 1H y ^{13}C (Fig. 3.21 y Fig. 3.22, Tabla 3.2 y Tabla 3.3) se observaron señales asignadas a grupos acetato, benzoato, nicotinato y un alcohol terciario, en los dos compuestos, siendo la única diferencia estructural el sustituyente situado sobre C-2. Así, en los espectros del compuesto **A3**, se observaron señales características de un grupo acetato a δ_H 2.10 (3H, s) y δ_C 21.1 (c), 169.6 (s), mientras que los del compuesto **A4** presentaron señales asignables a un grupo nicotinato [δ_H 7.44 (1H, dd, $J = 2.9, 7.9$ Hz), 8.37 (1H, td, $J = 1.8, 8.1$ Hz), 8.81 (1H, dd,

$J = 1.4, 5.1$ Hz), 9.29 (1H, d, $J = 1.8$ Hz) y δ_c 123.6 (d), 125.1 (s), 137.1 (d), 151.2 (d), 154.0 (d), 164.4 (s)]. Ello está de acuerdo con las fórmulas moleculares de $C_{37}H_{42}O_{14}$ y $C_{41}H_{43}NO_{14}$ determinadas por EMAR para **A3** y **A4**, respectivamente.

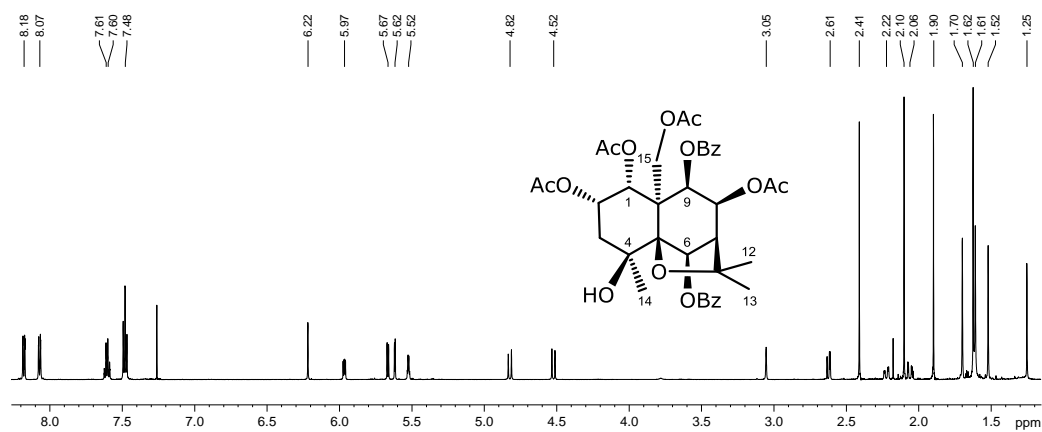


Fig. 3.21 | Espectro de RMN de 1H ($CDCl_3$, 600 MHz) del compuestos **A3**.

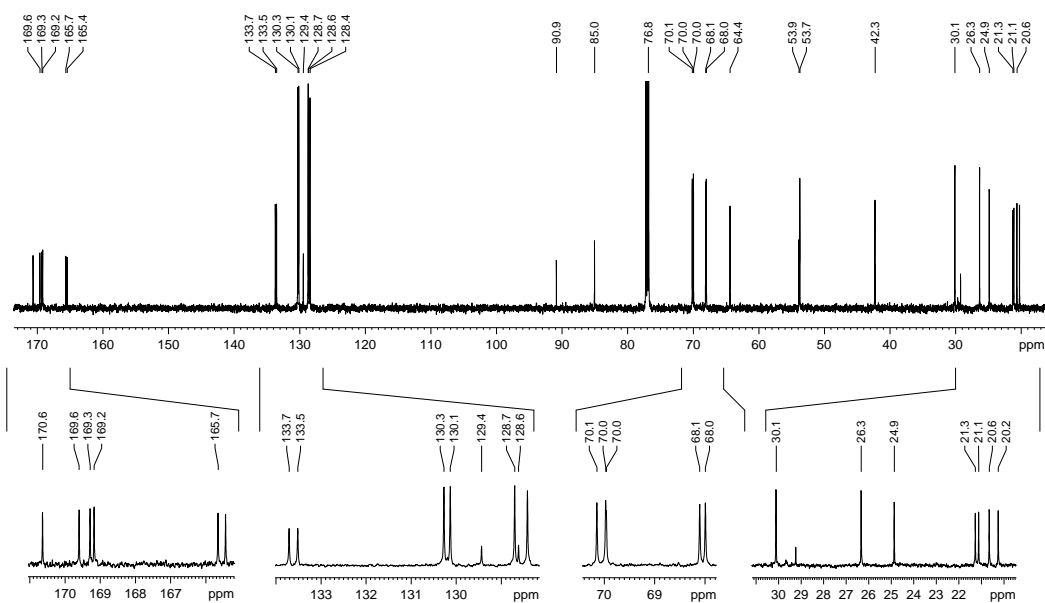


Fig. 3.22 | Espectro de RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 150 MHz) del compuesto **A3** con ampliaciones.

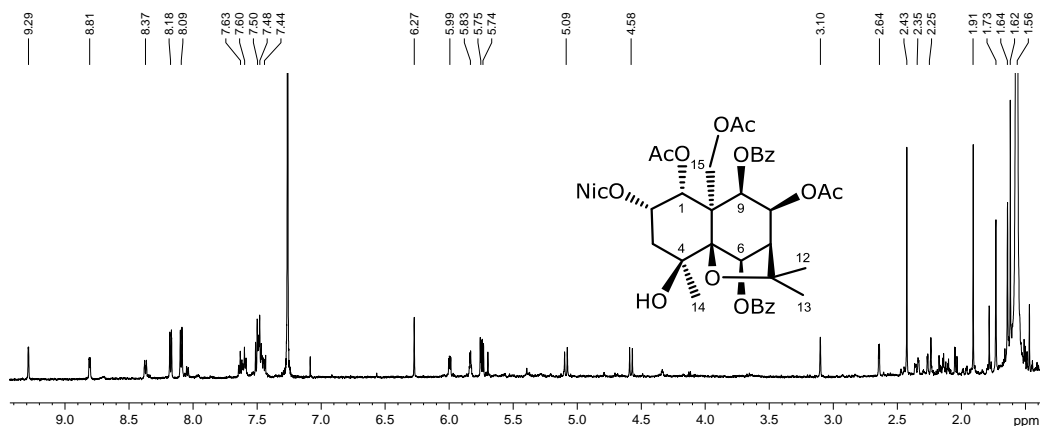


Fig. 3.23 | Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 600 MHz) del compuestos **A4**.

Un cuidadoso estudio de los experimentos bidimensionales (COSY, HSQC, HMBC y ROESY) nos permitió establecer la posición y la estereoquímica relativa de los diferentes grupos sobre el esqueleto sesquiterpénico, destacando que el experimento HMBC nos permitió determinar la regiosustitución de los diferentes grupos funcionales en el sistema decalínico. Así, por ejemplo, para el compuesto **A3** (Fig. 3.24), se observó

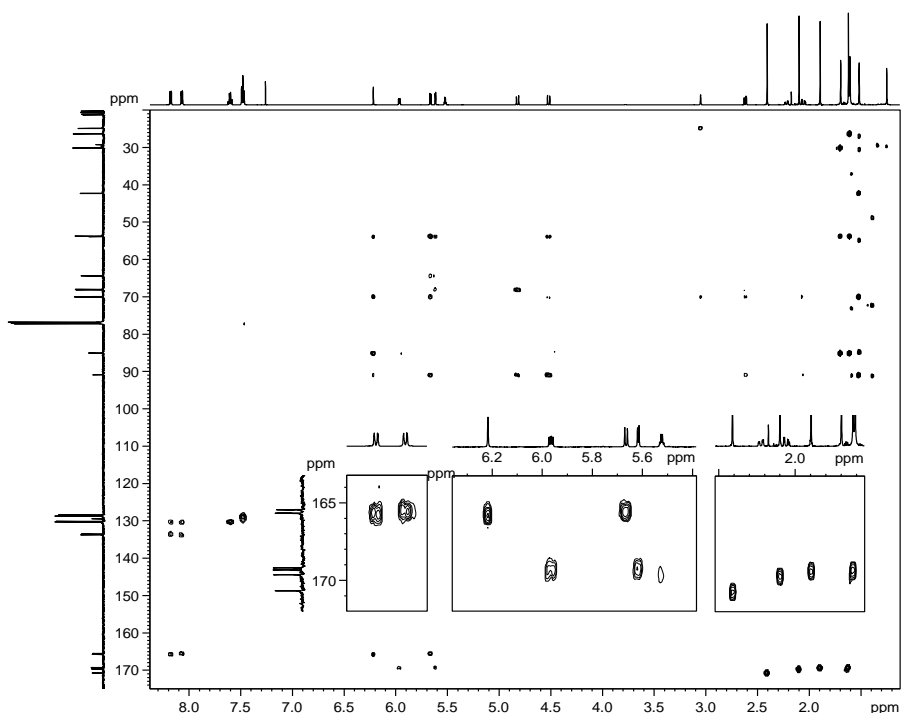


Fig. 3.24 | Experimento HMBC de **A3** (500 MHz) con ampliación.

correlación a larga distancia entre los carbonos carboxílico de los acetatos a δ_C 169.2, 169.3, 169.6 y 170.6 con las señales a δ_H 5.62 (H-1), 5.97 (H-8), 5.52 (H-2), 4.52 y 4.82 (H-15), respectivamente, así como entre los carbonos carboxílicos del benzoato a δ_C 165.4 y 165.7 con las señales a δ_H 5.67 (H-9) y 6.22 (H-6), respectivamente.

La estereoquímica relativa de ambos compuestos fue determinada mediante un estudio de las constantes de acoplamiento y confirmada mediante un experimento ROESY, observándose, como correlaciones más significativas, NOE de 1 β con 2 β /3 β ; H-15 con H-6/ H-9/Me-14 y H-8 con H-6/H-9 (Fig. 3.25). Estos datos nos permitieron establecer las estructuras de **A3** y **A4** como 1 α ,2 α ,8 β ,15-tetraacetiloxi-6 β ,9 β -dibenzoiloxi-4 β -hidroxi-dihidro- β -agarofurano y 1 α ,8 β ,15-triacetiloxi-6 β ,9 β -dibenzoiloxi-4 β -hidroxi-2 α -nicotinoiloxi-dihidro- β -agarofurano, respectivamente.

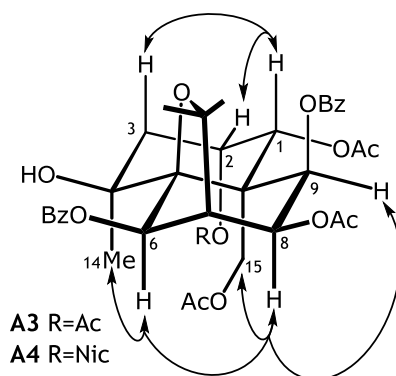


Fig. 3.25 | Correlaciones más significativas observadas en los espectros de RMN de ROESY de los compuestos **A3** y **A4**.

La estereoquímica absoluta de los compuestos **A2**, **A3** y **A4** fue establecida en base a consideraciones biogénicas, ya que estos compuestos presentan el mismo esqueleto polihidroxfílico base que el compuesto **A1**, cuya configuración absoluta determinamos mediante dicroísmo circular.

Sesquiterpeno A7

Al compuesto que hemos denominado **A7**, se le asignó la fórmula molecular $C_{35}H_{38}O_{11}$, basándose en sus datos de masas de alta resolución junto con los de RMN de 1H y ^{13}C . En su espectro de infrarrojo se observaron bandas correspondientes a grupo hidroxilo (3437 cm^{-1}) y a grupo éster (1744 y 1723 cm^{-1}) y su espectro de masas mostró fragmentos correspondientes a pérdidas de metilo [$M^+ - 15$, 621 m/z , CH_3], agua [$M^+ - 15 - 18$, 603 m/z , CH_3 , H_2O], ácido benzoico [$M^+ - 15 - 122$, 499 m/z , CH_3 , $C_7H_6O_2$, 105 m/z , $C_7H_5O^+$], ácido acético [$M^+ - 15 - 122 - 60$, 439 m/z , CH_3 , $C_5H_6CO_2H$, CH_3CO_2H] y ácido cinámico [131 m/z , $C_8H_6CO^+$].

En su espectro de RMN de ^1H (Fig. 3.26) se observó la presencia de dos singuletes a δ_{H} 2.07 y 1.65 que integran para tres protones cada uno, correspondiendo a dos grupos acetato, así como señales a δ_{H} 7.44 (2H, t, $J = 7.8$ Hz), 7.60 (1H, t, $J = 7.4$ Hz) y 8.03 (2H, d, $J = 8.1$ Hz) asignadas a un grupo benzoato y señales a δ_{H} 6.20 (1H, d, $J = 16.1$ Hz), 7.21 (2H, d, $J = 7.5$ Hz), 7.30 (2H, t, $J = 7.6$ Hz), 7.34 (1H, t, $J = 7.1$ Hz) y 7.35 (1H, d, $J = 16.1$ Hz), cuya forma y desplazamiento indican la presencia en la molécula de un grupo *trans*-cinamato. La presencia de estos ésteres fue confirmada mediante RMN de ^{13}C .

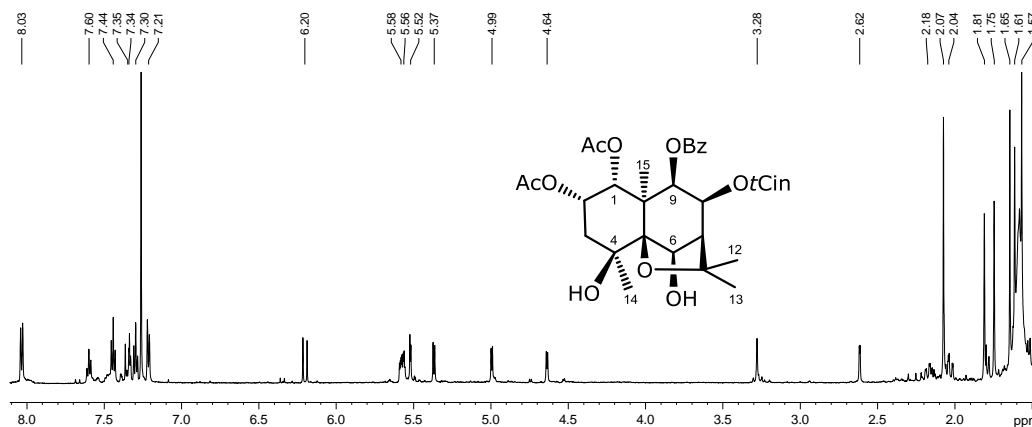


Fig. 3.26 | Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) del compuesto A7.

Asimismo, se observó, la presencia de tres sistemas de espines, un sistema ABM formado por un doblete a δ_{H} 2.62 (1H, $J = 3.2$ Hz, H-7), un doblete a δ_{H} 5.58 (1H, $J = 3.2, 6.6$ Hz, H-8) y un doblete a δ_{H} 5.37 (1H, d, $J = 6.6$ Hz, H-9); un sistema ABX_2 que presentó un doblete a δ_{H} 5.52 (1H, $J = 3.7$ Hz, H-1), un doblete a δ_{H} 5.56 (1H, $J = 3.7, 6.8$ Hz, H-2), un doblete a δ_{H} 2.04 (1H, $J = 3.3, 15.0$ Hz, H-3 α) y un doblete a δ_{H} 2.18 (1H, $J = 3.6, 14.9$ Hz, H-3 β), y un sistema AB a δ_{H} 4.64 (1H, d, $J = 5.3$ Hz, H-6) y 4.99 (1H, d, $J = 5.3$ Hz, OH-6). Además, se observó un singulete a δ_{H} 3.28 (OH-4) y señales singuletes correspondientes a cuatro metilos a δ_{H} 1.57 (3H, Me-15), 1.61 (3H, Me-12), 1.75 (3H, Me-13) y 1.81 (3H, Me-14), datos que fueron confirmados en su espectro de RMN de ^{13}C (Tabla 3.3). El conjunto de estos datos está de acuerdo con que el compuesto que hemos denominado A7 es un sesquiterpeno poliesterificado que posee un grupo benzoato, un grupo *trans*-cinamato, dos grupos acetatos y dos grupos hidroxilo, uno secundario y el otro terciario, en las posiciones 1, 2, 4, 6, 8 y 9.

Al objeto de determinar la regiosustitución del compuesto, se realizó un experimento de RMN bidimensional heteronuclear carbono-protón tipo HMBC, donde se observó correlación a larga distancia ($^2,3J_{\text{C,H}}$) de las señales correspondientes a H-1 (δ_{H} 5.52) y H-2 (δ_{H} 5.56) con los carbonos carboxílicos de los grupos acetato a δ_{C} 169.6 y

169.7, respectivamente. Asimismo, se observó correlación de la señal asignada a H-8 (δ_H 5.58) y H-9 (δ_H 5.37) con las señales de los carbonos carboxílicos del grupo cinamato (δ_C 165.0) y del grupo benzoato (δ_C 165.4), respectivamente. Además, al presentar correlación de la señal a δ_H 4.99 (H-6) con el carbono C-5 y C-6 (δ_C 77.9 y 91.1, respectivamente) y correlación de la señal a δ_H 3.28 (OH-4) con C-4 (δ_C 72.4) y el Me-14 (δ_C 25.0), determinamos la posición de los alcoholes secundario y terciario sobre los carbonos C-8 y C-4, respectivamente.

La configuración relativa fue establecida mediante el estudio de las constantes de acoplamiento en su espectro de RMN de 1H indicando una disposición *cis* entre los correspondientes núcleos ($J_{1,2} = 3.7$ Hz y $J_{8,9} = 6.6$ Hz). Estos datos fueron confirmados mediante experimentos de correlación espacial tipo NOESY-1D (Fig. 3.27), al observarse NOE de la señal correspondiente a H-6 con H-8/Me-15; H-7 con H-6/H-8/Me-12; H-8 con H-6/H-7/H-9 y correlación del Me-15 con H-6/H-9/Me-14.

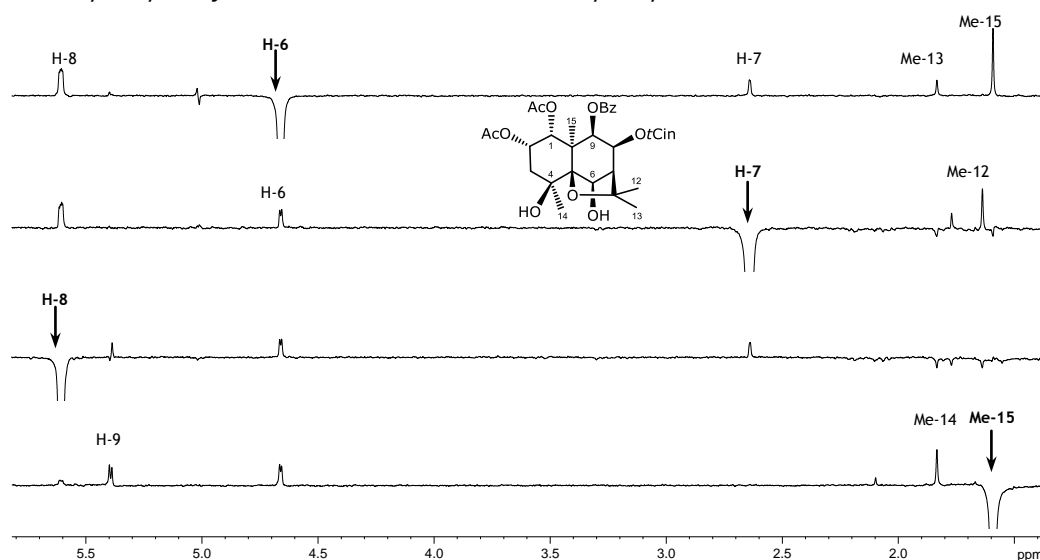


Fig. 3.27 | Experimentos NOESY-1D del compuesto A7. Irradiación selectiva de los protones H-6, H-7, H-8 y Me-15 (de arriba hacia abajo). Las señales correspondientes a las frecuencias de la irradiación se indican con flechas.

La determinación de la configuración absoluta de **A7** se realizó basándonos en el análisis de la curva de dicroísmo circular, la cual presentó un primer efecto Cotton negativo a 261.4 ($\Delta\epsilon = -4.0$) y un segundo efecto Cotton positivo a 224.8 ($\Delta\epsilon = +3.5$), debido a los cromóforos benzoato y cinamato. La aplicación del método de la quiralidad del benzoato^{67,78} nos permitió determinar la configuración absoluta del compuesto **A7** como (1*R*,2*S*,4*S*,5*R*,6*R*,7*S*,8*S*,9*S*,10*S*)-1,2-diacetiloxi-9-benzoiloxi-8-(*E*)-cinamoiloxi-4,6-dihidroxi-dihidro- β -agarofurano.

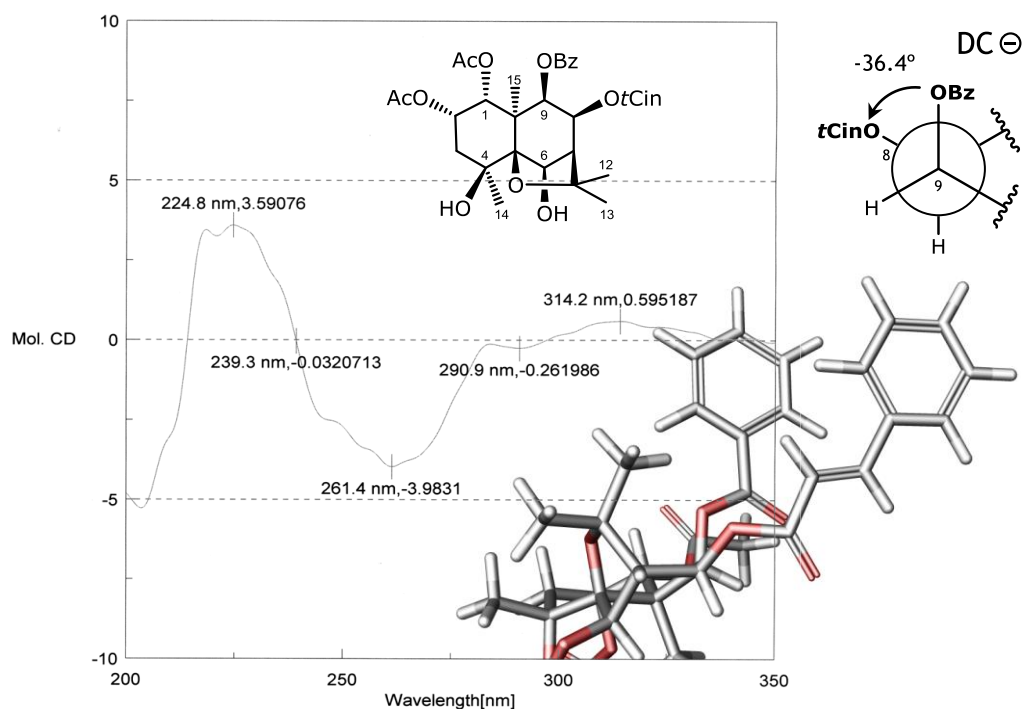


Fig. 3.28 | Curva de dicroísmo circular del sesquiterpeno **A7**. La proyección de Newman indica el ángulo entre los dos cromóforos que fue determinado mediante mecánica molecular (PC Model 9.200).

Sesquiterpenos A8–A10

Los productos **A8**, **A9** y **A10** presentaron fórmulas moleculares de $C_{28}H_{36}O_{11}$, $C_{39}H_{41}NO_{12}$ y $C_{33}H_{38}O_{11}$, respectivamente, determinadas mediante espectrometría de masas de alta resolución (EMAR). El estudio de sus espectros de IR, UV, RMN de 1H (Fig. 3.29) y ^{13}C (Tabla 3.2 y Tabla 3.3) y experimentos 2D, nos indicó que se trataba de tres sesquiterpenos con el mismo patrón de sustitución del sistema dihidro- β -agarofurano que **A7**, que presentan:

- tres grupos acetato, un benzoato, dos alcoholes (uno secundario y otro terciario) para el compuesto **A8**,
- con dos grupos acetato, dos benzoato, un nicotinato y un alcohol terciario para el compuesto **A9** y
- con dos grupos acetato, dos benzoato, un alcohol secundario y un alcohol terciario para el compuesto **A10**,

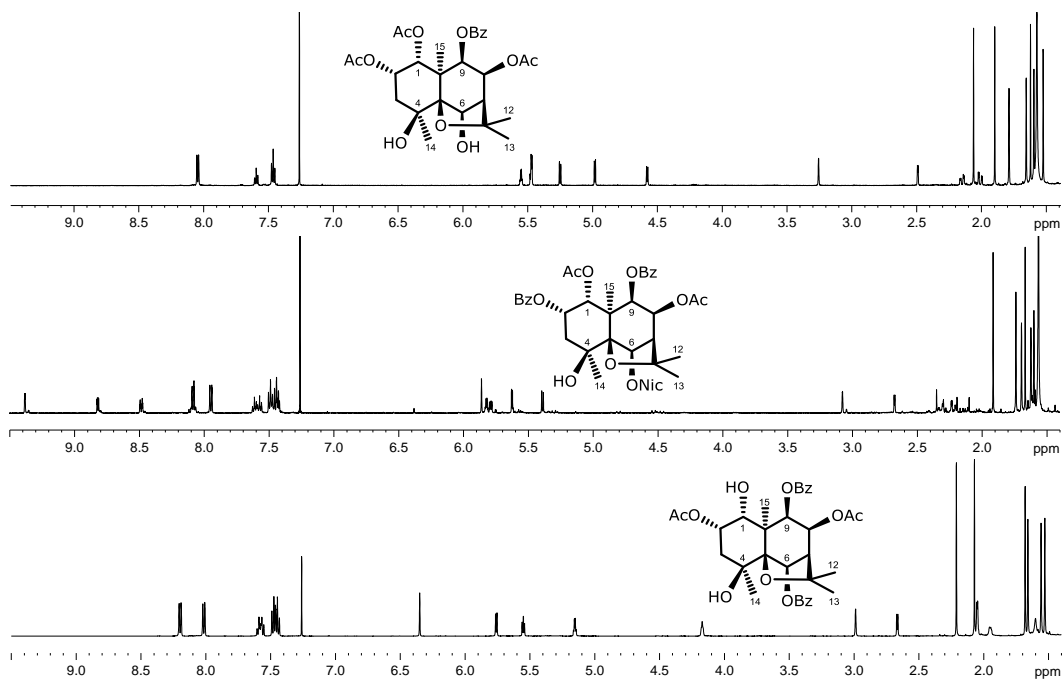


Fig. 3.29 | Espectros de RMN de ¹H (CDCl₃, 400 MHz) de los compuestos **A8**, **A9** y **A10** (de arriba hacia abajo).

Un experimento HMBC nos permitió asignar de forma inequívoca la posición de los distintos sustituyentes en las moléculas y la estereoquímica relativa fue establecida por medio de un experimento ROESY, lo que nos permitió determinar las estructuras de **A8–A10**. La configuración absoluta de dichos compuestos, fue establecida como *1R,2S,4S,5R,6R,7S,8S,9S,10S* (**A8**) y *1R,2S,4S,5R,6R,7R,8S,9S,10S* (**A9** y **A10**) en base a consideraciones biogénicas, puesto que presentan el mismo esqueleto polihidroxiílico base que el compuesto **A7** cuya configuración absoluta determinamos por dicroísmo circular.

Sesquiterpeno **A12**

La estructura del compuesto **A12** fue establecida mediante el análisis de sus datos espectroscópicos y espectrométricos, tal como se muestra a continuación. Su fórmula molecular C₃₀H₃₈O₁₂ fue fijada basándonos en sus datos de espectrometría de masas de alta resolución. Su espectro de RMN de ¹H (Fig. 3.30 y Tabla 3.) presentó señales singuletes asignables a cuatro grupo acetato a δ_H 1.58 (3H, OAc-1), 2.04 (3H, OAc-8), 2.12 (3H, OAc-6) y 2.28 (3H, OAc-15) y un grupo benzoato [δ_H 7.46 (2H, t, *J* = 7.9 Hz), 7.58 (1H, tt, *J* = 1.2, 7.5 Hz) y 8.03 (2H, dd, *J* = 1.1, 8.4 Hz)]. Asimismo, presentó señales correspondientes a cuatro protones geminales a grupos ésteres secundarios a δ_H 5.52 (d, *J* = 3.7 Hz, H-1), 5.60 (d, *J* = 6.3 Hz, H-9), 5.63 (dd, *J* = 4.0, 6.3 Hz, H-8) y 6.74 (s,

H-6), dos protones geminales a un grupo éster primario a δ_H 4.94 y 5.32 (d_{AM} , $J = 13.2$ Hz, H-15) y un protón geminal a un alcohol secundario a δ_H 4.17 (1H, m, H-2), datos que fueron confirmados en su espectro de RMN de ^{13}C (Tabla 3.3).

El conjunto de estos datos mostró que el producto **A12** estaba relacionado con el producto **A2**, siendo las principales diferencias en sus espectros de RMN de 1H la ausencia de las señales correspondientes al alcohol terciario sobre C-4 a δ_H 2.88 (1H, s, OH-4) y al grupo benzoato sobre C-2 a δ_H 7.50 (2H, t, $J = 8.0$ Hz), 7.60 (1H, t, $J = 7.6$ Hz) y 8.10 (2H, d, $J = 8.0$ Hz) presentes en el compuesto **A2**, observándose, por otra parte, en el espectro de **A12** la señal asignada al metilo Me-14 como un doblete a δ_H 1.24 (3H, d, $J = 7.7$ Hz) y el protón metínico H-4 a δ_H 2.29 como multiplete, lo que está de acuerdo con su espectro de RMN de ^{13}C .

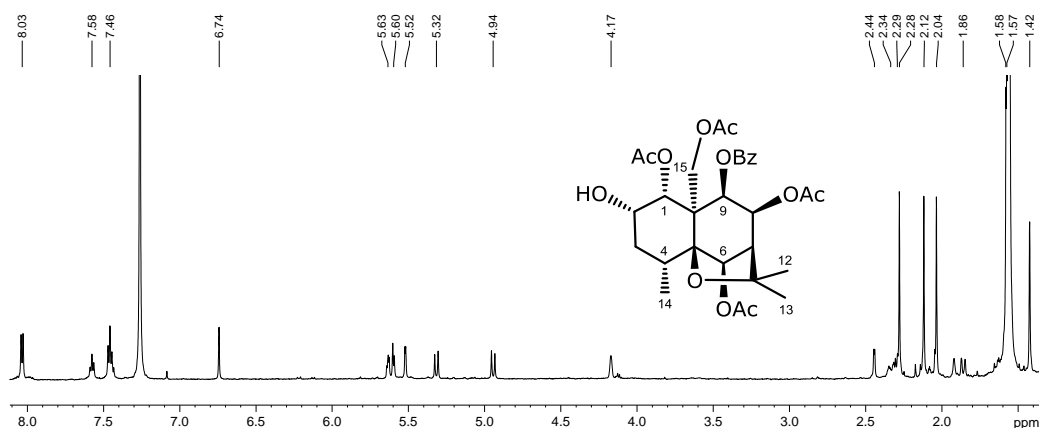


Fig. 3.30 | Espectro de RMN de 1H ($CDCl_3$, 400 MHz) del compuesto **A12**.

El análisis de estos datos indican que el compuesto que hemos denominado **A12** es un sesquiterpeno poliesterificado que posee cuatro grupos acetatos, un grupo benzoato y un alcohol secundario en las posiciones 1, 2, 6, 8, 9 y 15. Un cuidadoso estudio de los experimentos de RMN bidimensionales (COSY, ROESY y HMBC) nos permitió establecer la regiosustitución y estereoquímica relativa de los diferentes grupos sobre el esqueleto agarofuránico, destacando las correlaciones observadas en el experimento bidimensional de RMN tipo HMBC (Fig. 3.31). Así, se observó correlación a larga distancia de los carbonos carboxílicos de los grupos acetatos a δ_C 169.7, 169.8, 170.0 y 170.4 con las señales a δ_H 5.52 (H-1), 6.74 (H-6), 5.63 (H-8), 4.94 y 5.32 (H₂-15), respectivamente, así como correlación entre el carbono carboxílico del benzoato a δ_C 164.8 con la señal a δ_H 5.60 (H-9).

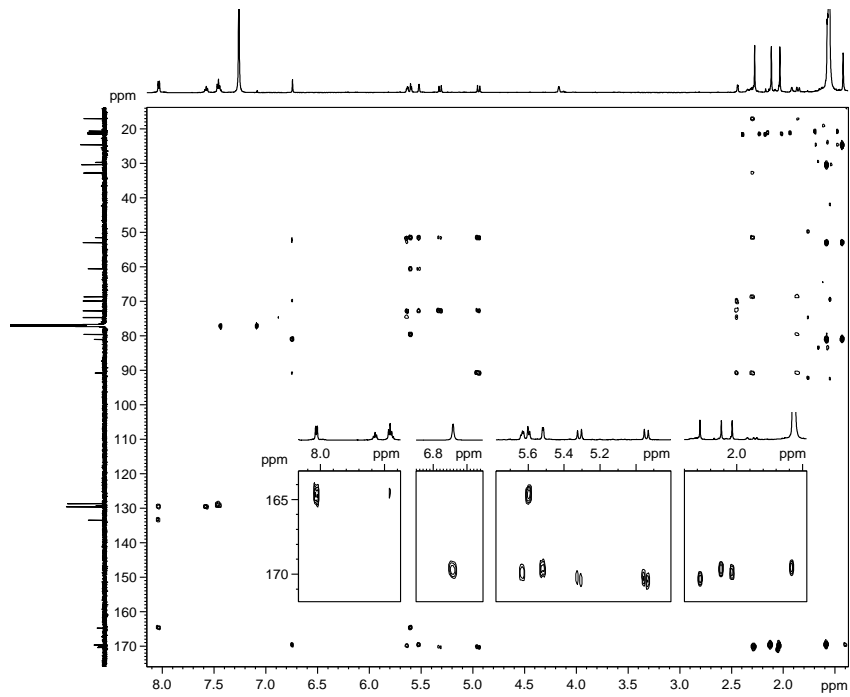


Fig. 3.31 | Experimento de RMN tipo HMBC (600 MHz) del sesquiterpeno A12.

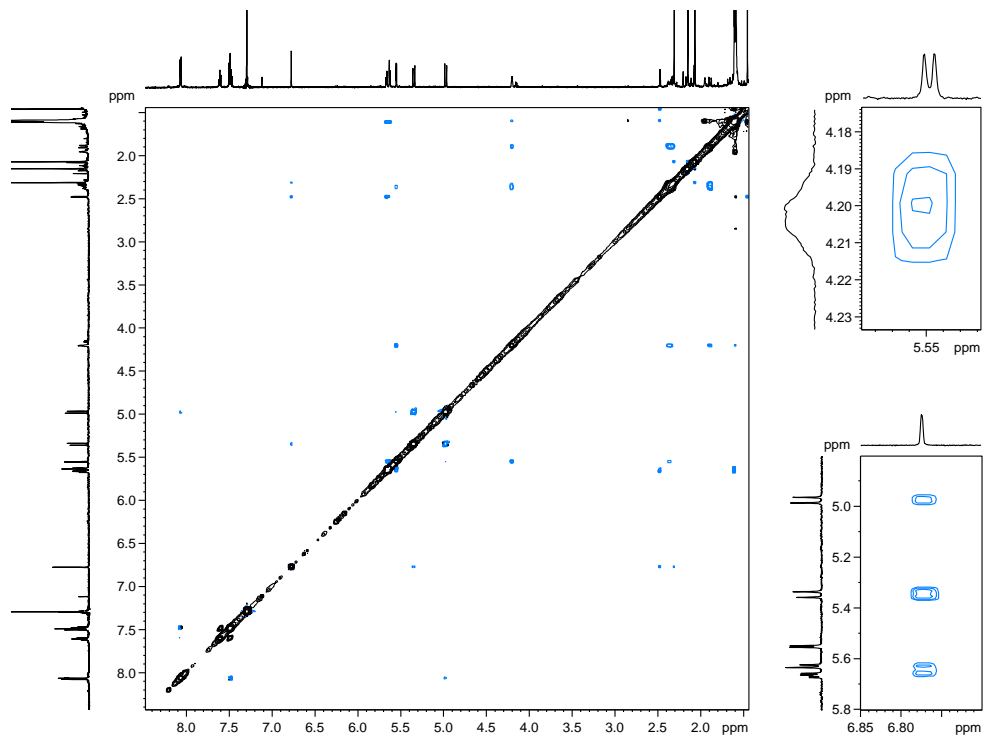


Fig. 3.32 | Espectro de RMN tipo ROESY (600 MHz) del sesquiterpeno A12 con ampliación de las correlaciones más significativas (derecha).

La estereoquímica relativa del sesquiterpeno **A12** fue determinada mediante un estudio de las constantes de acoplamiento y confirmada mediante un experimento ROESY (Fig. 3.32), observándose, como correlaciones más significativas, NOE de 1 β con 2 β /3 β ; H-15 con H-6/Me-14 y H-6 con H-8/H-9/Me-14/Me15. Estos datos nos permitieron establecer la estructura de **A12** como 1 α ,6 β ,8 β ,15-tetraacetiloxi-9 β -benzoiloxi-2 α -hidroxi-dihidro- β -agarofurano.

Sesquiterpeno A14

El compuesto **A14** se aisló como sólido amorfo de fórmula molecular C₂₈H₃₆O₁₀ determinada por espectrometría de masas de alta resolución. Su elucidación estructural se basó en datos físicos y espectroscópicos, incluyendo estudios de RMN mono- (¹H y ¹³C) y bidimensionales, tanto homo- como heteronucleares.

Así, en su espectro de RMN de ¹H (Fig. 3.33 y Tabla 3.), se observaron señales correspondientes a tres grupos acetato a δ_H 1.67, 1.91 y 2.05, un grupo benzoato [δ_H 7.46 (2H, t, $J = 7.8$ Hz), 7.58 (1H, t, $J = 7.4$ Hz) y 8.06 (2H, d, $J = 8.1$ Hz)] y un grupo hidroxilo terciario a δ_H 2.70. Estos datos están de acuerdo con las señales observadas en su espectro de RMN de ¹³C (Tabla 3.3).

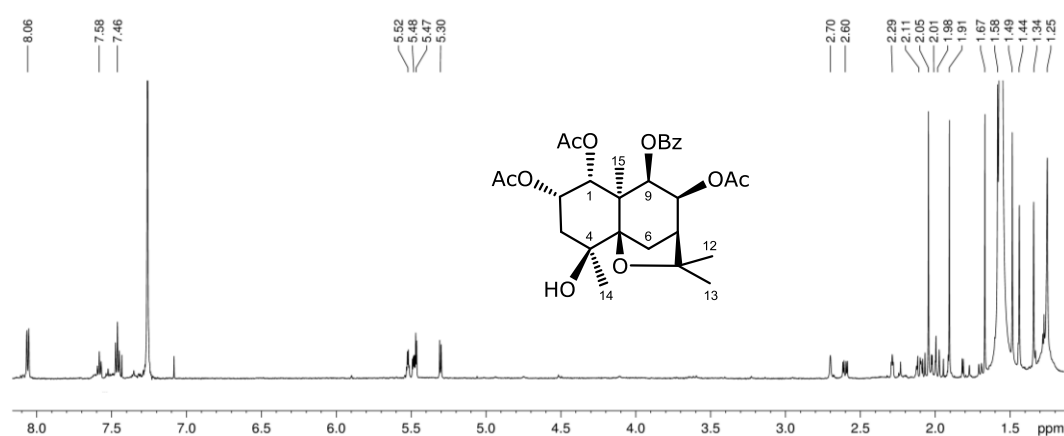


Fig. 3.33 | Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 600 MHz) del compuesto **A14**.

El estudio de un experimento HMBC nos permitió establecer la posición de cada uno de los grupos ésteres y alcoholes en las moléculas de forma inequívoca. Así, se observó correlación ³J_{C,H} entre los carbonos carboxílicos de los grupos acetatos a δ_C 169.6 (s), 169.8 (s) y 169.9 (s) con las señales a δ_H 5.47 (H-1), 5.48 (H-8) y 5.52 (H-2), respectivamente, así como entre el carbono carboxílico del benzoato a δ_C 165.8 con la señal a δ_H 5.30 (H-9).

La configuración relativa del metabolito **A14** fue establecida mediante el estudio de las constantes de acoplamiento en su espectro de RMN de ^1H indicando una disposición *cis* entre los correspondientes núcleos ($J_{1,2} = 3.4$ Hz y $J_{8,9} = 6.0$ Hz). Estos datos fueron confirmados mediante un experimento ROESY, observándose NOE entre la señal correspondiente al H-8 con H-6 α , H-9 y Me-15, así como de H-1 β con H-2 β /H-3 β y de H-6 β con H-6 α /Me-12 (Fig. 3.36). Estos datos nos confirmaron la propuesta de un esqueleto de dihidro- β -agarofurano y nos permitieron establecer la estereoquímica relativa de todos los sustituyentes como 1 α , 2 α , 4 β , 8 β y 9 β para el compuesto **A14**, resultando así su estereoquímica relativa coincidente con la de los compuestos que hemos descrito anteriormente (**A1–A13**).

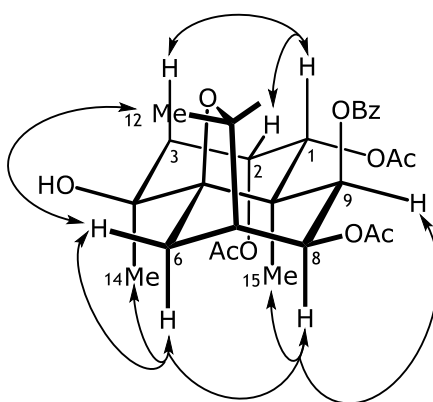


Fig. 3.34 | Correlaciones espaciales observadas en un experimento de RMN tipo ROESY (CDCl_3 , 600 MHz) del compuesto **A14**.

La configuración absoluta de **A12** y **A14** se estableció en base a consideraciones biogénicas, dado que los centros estereogénicos del esqueleto polihidroxílico base en estos compuestos se encuentran presentes en **A1** y **A7**, cuya configuración absoluta determinamos por dicroísmo circular. Así quedaron establecidas las estructuras de **A12** y **A14** como (1*R*,2*S*,4*R*,5*R*,6*R*,7*R*,8*S*,9*S*,10*S*)-1,6,8,15-tetraacetoxi-9-benzoiloxi-2-hidroxi-dihidro- β -agarofurano y (1*R*,2*S*,4*S*,5*R*,7*S*,8*S*,9*S*,10*S*)-1,2,8-triacetoxi-9-benzoiloxi-4-hidroxi-dihidro- β -agarofurano, respectivamente.

Tabla 3.2 | Datos de RMN de ^1H (CDCl_3 , a 600 MHz, b 500 MHz) de los compuestos A1–A4, A7–A10, A12 y A14. Los valores de desplazamiento δ se basan en experimentos de RMN tipo COSY y HSQC editado. La multiplicidad y las constantes de acoplamiento J en Hz se indican en paréntesis. Los valores que se indican sin multiplicidad corresponden a señales cuya multiplicidad no se logró determinar por solapamiento completo. El * indica señales que presentan el mismo centro de la señal, pero cuya multiplicidad se podía determinar.

	A1 ^a	A2 ^a	A3 ^a	A4 ^a	A7 ^a	A8 ^a	A9 ^b	A10 ^b	A12 ^a	A14 ^a
1β	5.73 (d, 3.4)	5.70 (d, 3.7)	5.62 (d, 3.3)	5.75 (d, 3.3)	5.52 (d, 3.7)	5.47 (d, 3.9)	5.63 (dd, 3.7)	4.17 (t, 3.4)	5.52 (dd, 3.7)	5.47 (d, 3.7)
OH-1	—	—	—	—	—	—	—	1.95 (d, 4.8)	—	—
2β	5.82 (dd, 3.4, 6.8)	5.78 (dd, 3.7, 6.5)	5.52 (dd, 3.4, 6.7)	5.83 (dd, 3.3, 6.7)	5.56 (dd, 3.7, 6.8)	5.55 (dd, 3.4, 6.8)	5.82 (dd, 3.4, 7.0)	5.15 (dd, 3.4, 6.9)	4.17 (m)	5.52 (dd, 3.3, 6.8)
3α	2.18 (dd, 2.9, 15.5)	2.19 (dd, 3.2, 15.3)	2.06 (dd, 3.1, 15.0)	2.35 (dd, 3.6, 15.8)	2.04 (dd, 3.3, 15.0)	2.01 (dd, 3.0, 14.8)	2.22 (dd, 3.1, 15.3)	2.05 (d, 3.1)	1.86 (d _v , 14.6)	2.01 (dd, 3.1, 15.2)
3β	2.27 (dd, 3.4, 15.1)	2.27 (dd, 3.7, 15.3)	2.22 (dd, 3.7, 15.0)	2.25 (dd, 3.1, 15.8)	2.18 (dd, 3.6, 14.9)	2.15 (dd, 3.8, 14.8)	2.32 (dd, 3.4, 15.3)	2.05 (d, 3.1)	2.34 (m)	2.11 (dd, 3.6, 15.2)
4β	—	—	—	—	—	—	—	—	2.29 (m)	—
OH-4	2.90 (s)	2.88 (s)	3.05 (d, 0.9)	3.10 (s)	3.28 (s)	3.26 (s)	3.08 (s)	2.99 (s)	—	2.70 (s)
6α	6.00 (s)	6.11 (s)	6.22 (s)	6.27 (s)	4.64 (d, 5.3)	4.58 (d, 5.4)	5.86 (s)	6.35 (s)	6.74 (s)	1.98 (d, 13.1)
6β	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2.60 (dd, 5.0, 13.1)
OH-6	—	—	—	—	4.99 (d, 5.3)	4.98 (d, 5.4)	—	—	—	—
7α	2.48 (d, 3.4)	2.46 (d, 3.4)	2.61 (d, 3.3)	2.64 (d, 3.3)	2.62 (d, 3.2)	2.49 (d, 3.2)	2.68 (d, 3.2)	2.67 (d, 4.2)	2.44 (d, 4.0)	2.29 (t, 3.9)
8α	4.71 (m)	5.87 (dd, 3.4, 6.4)	5.97 (dd, 3.5, 6.5)	5.99 (dd, 3.5, 6.4)	5.58 (dd, 3.2, 6.6)	5.48	5.79 (dd, 3.2, 6.2)	5.55 (t, 4.7)	5.63 (dd, 4.0, 6.3)	5.48 (dd, 3.9, 6.1)
OH-8	2.17	—	—	—	—	—	—	—	—	—
9α	5.65 (d, 6.5)	5.69 (d, 6.4)	5.67 (d, 6.4)	5.74 (d, 6.4)	5.37 (d, 6.6)	5.25 (d, 6.5)	5.39 (d, 6.2)	5.76 (d, 5.4)	5.60 (d, 6.3)	5.30 (d, 6.1)
12	1.58 (s)	1.60* (s)	1.61 (s)	1.64 (s)	1.61 (s)	1.60 (s)	1.60 (s)	1.56 (s)	1.42 (s)	1.34 (s)
13	1.71 (s)	1.70 (s)	1.70 (s)	1.73 (s)	1.75 (s)	1.65 (s)	1.69 (s)	1.66 (s)	1.57 (s)	1.58 (s)
14	1.54 (s)	1.55 (s)	1.52 (s)	1.56 (s)	1.81 (s)	1.79 (s)	1.62 (s)	1.53 (s)	1.24 (d, 7.7)	1.44 (s)
15	4.43, 5.28 (d, 12.8)	4.54, 5.14 (d, 12.7)	4.52, 4.82 (d, 13.1)	4.58, 5.09 (d, 12.7)	1.57 (s)	1.52 (s)	1.74 (s)	1.68 (s)	4.94, 5.32 (d, 13.2)	1.49 (s)

Tabla 3.3 | Datos de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 150 MHz) de los compuestos A1–A4, A7–A10, A12 y A14. Los valores de desplazamiento δ se basan en experimentos de RMN HMBC y HSQC editado. El * indica señales que presentaron el mismo desplazamiento.

	A1	A2	A3	A4	A7	A8	A9	A10	A12	A14
1	70.4 (d)	70.1* (d)	70.1 (d)	70.0* (d)	69.8 (d)	71.9 (d)	69.9 (d)	74.2 (d)	79.6 (d)	69.8 (d)
2	68.8 (d)	68.8 (d)	68.0 (d)	69.6 (d)	68.2 (d)	68.2 (d)	69.2 (d)	62.5 (d)	68.7 (d)	69.1 (d)
3	42.1 (t)	42.1 (t)	42.3 (t)	42.3 (t)	40.9 (t)	40.9 (t)	42.5 (t)	42.3 (t)	32.7 (t)	40.5 (t)
4	69.6 (s)	69.6 (s)	69.9 (s)	69.8 (s)	72.4 (s)	72.4 (s)	70.1 (s)	69.9 (s)	32.8 (d)	69.6 (s)
5	90.8 (s)	91.0 (s)	90.9 (s)	90.9 (s)	91.1 (s)	91.0 (s)	91.2 (s)	92.2 (s)	90.8 (s)	89.8 (s)
6	76.4 (d)	76.1 (d)	76.8 (d)	77.0 (d)	77.9 (d)	77.9 (d)	78.3 (d)	76.0 (d)	74.7 (d)	31.1 (t)
7	55.1 (d)	53.8 (d)	53.7 (d)	53.8* (d)	54.9 (d)	54.9 (d)	53.8 (d)	52.5 (d)	53.0 (d)	48.2 (d)
8	71.9 (d)	70.1* (d)	70.0 (d)	70.0* (d)	69.0 (d)	68.7 (d)	68.3 (d)	71.5 (d)	69.9 (d)	69.7 (d)
9	70.9 (d)	68.1 (d)	68.1 (d)	68.1 (d)	72.0 (d)	69.8 (d)	71.8 (d)	74.4 (d)	72.7 (d)	72.3 (d)
10	53.7 (s)	53.7 (s)	53.9 (s)	53.8* (s)	48.9 (s)	48.7 (s)	49.8 (s)	50.7 (s)	51.5 (s)	48.3 (s)
11	85.0 (s)	85.0 (s)	85.0 (s)	85.3 (s)	85.0 (s)	85.2 (s)	85.2 (s)	83.2 (s)	81.0 (s)	84.0 (s)
12	30.2 (c)	30.0 (c)	30.1 (c)	30.1 (c)	30.6 (c)	30.7 (c)	30.4 (c)	29.5 (c)	30.3 (c)	30.9 (c)
13	26.2 (c)	26.3 (c)	26.3 (c)	26.4 (c)	27.2 (c)	27.1 (c)	26.4 (c)	23.8 (c)	24.6 (c)	25.1 (c)
14	25.2 (c)	25.3 (c)	24.9 (c)	25.3 (c)	25.0 (c)	25.0 (c)	25.4 (c)	24.8 (c)	17.0 (c)	25.4 (c)
15	65.6 (t)	65.1 (t)	64.4 (t)	64.9 (t)	21.4 (c)	21.3 (c)	21.6 (c)	13.2 (c)	60.5 (t)	20.7 (c)

Sesquiterpeno A15

La estructura del compuesto **A15** fue establecida en base a sus datos espectroscópicos y espectrométricos. Así, presentó una fórmula molecular de $\text{C}_{33}\text{H}_{38}\text{O}_9$, determinada mediante espectrometría de masas de alta resolución (EMAR). El estudio de sus datos de IR, UV, RMN de ^1H y de ^{13}C (Tabla 3.5 y Tabla 3.4) y experimentos 2D, nos indicó que el esqueleto de dihidro- β -agarofurano estaba sustituido con dos grupos acetatos, un benzoato, un *cis*-cinamato y un alcohol terciario.

Un estudio comparativo de los datos espectroscópicos de **A15** con el compuesto **A18**, aislado anteriormente en nuestro grupo de investigación⁶⁷ y que hemos aislado, además, en el estudio objeto de esta Memoria, mostró que ambos productos estaban relacionados estructuralmente. Así, la principal diferencia fue la estereoquímica del grupo cinamato, tal y como se observó en la variación de los desplazamientos y constante de acoplamiento de los protones en sus espectros de RMN de ^1H (Fig. 3.35) y ^{13}C (Fig. 3.36) del sistema cinámico a δ_{H} 6.20 y 7.38 ($J = 16.0$ Hz) y δ_{C} 117.1 (d), 145.6 (d) en el compuesto **A18** con respecto a δ_{H} 5.67 y 6.90 ($J = 12.6$ Hz) y δ_{C} 118.5 (d), 145.1 (d) en el metabolito **A15**. Estos datos están de acuerdo con un éster tipo *cis*-cinamato sobre el carbono C-8 para nuestro compuesto **A15**.

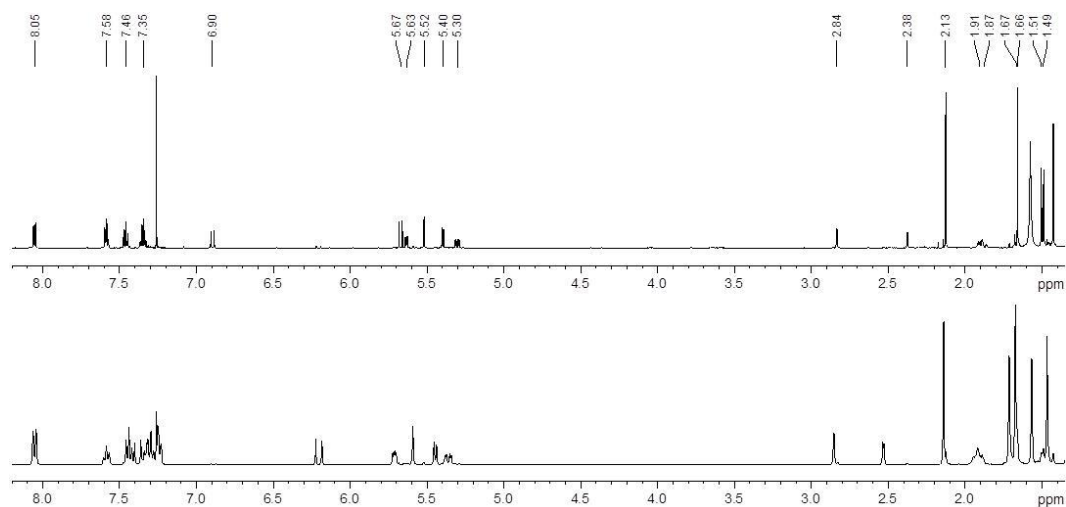


Fig. 3.35 | Espectro de RMN de ^1H de los compuestos A15 (arriba) y A18 (CDCl₃, 600 y 400 MHz, respectivamente).

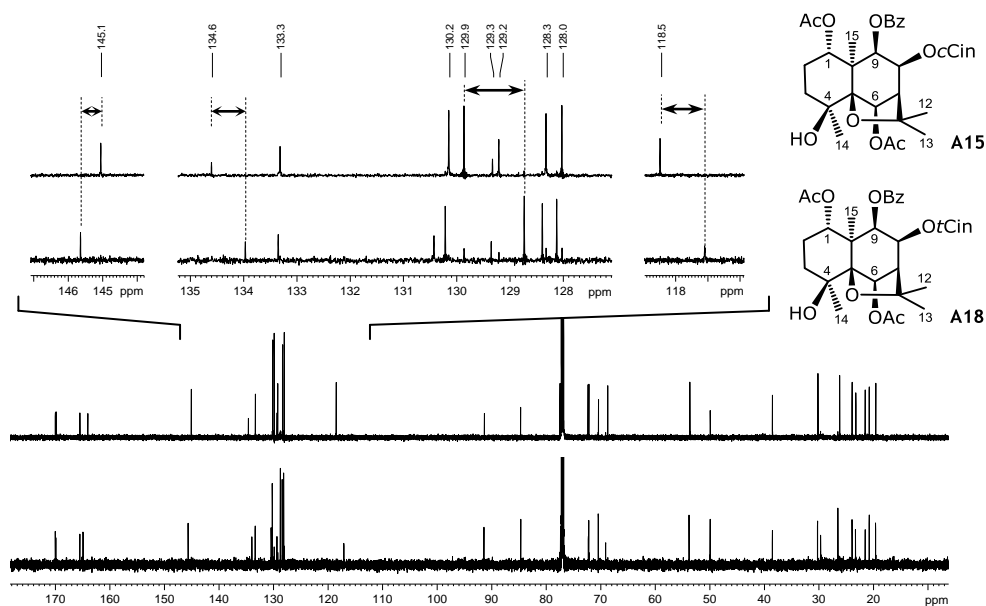


Fig. 3.36 | Espectros de RMN de ^{13}C (CDCl₃, 150 MHz) de los compuestos A15 y A18.

Con la finalidad de confirmar esta propuesta, se llevó a cabo un estudio de experimentos de RMN bidimensionales, mediante los cuales confirmamos la estructura propuesta. Así, el experimento HMBC nos permitió asignar de forma inequívoca la posición de los distintos ésteres en la estructura, el grupo *cis*-cinamato fue localizado sobre C-8, el benzoato sobre C-9, y los acetatos sobre C-1 y C-6. La estereoquímica relativa fue establecida por medio de un experimento ROESY, en el que se observó NOE del Me-15 con H-6, H-8, H-9 y Me-14, además de correlación de H-1 con H-2 β y H-3 β .

Estos datos nos permitieron determinar la estructura de **A15** como 9 β -benzoiloxi-8 β -*cis*-cinamoiloxi-1 α ,6 β -diacetoxi-4 β -hidroxi-dihidro- β -agarofurano.

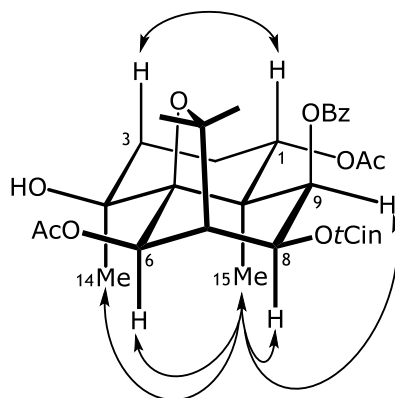


Fig. 3.37 | Correlaciones espaciales observadas en un experimento de RMN tipo ROESY (CDCl_3 , 600 MHz) del compuesto **A15**.

La configuración absoluta del compuesto **A15** (1*R*,4*S*,5*R*,6*R*,7*R*,8*S*,9*S*,10*S*), fue establecida en base a consideraciones biogenéticas, puesto que presenta el mismo esqueleto polihidrofilico base que el compuesto **A17**. La configuración absoluta de este metabolito **A17**, fue determinada mediante dicroísmo circular y confirmada mediante difracción de rayos X de su esqueleto polihidrofilico en trabajos anteriores de nuestro grupo⁶¹. Cabe reseñar que **A17** fue aislado en cantidades considerables en el estudio fitoquímico realizado como parte de este trabajo de Tesis Doctoral, lo que nos permitió desarrollar una quimioteca de sesquiterpenos como se describe en el Apartado 3.3.2 de esta Memoria.

Sesquiterpenos **A20** y **A21**

Los metabolitos **A20** y **A21** se aislaron como sólidos amorfos. Sus datos físicos y espectroscópicos, incluyendo experimentos de RMN mono y bidimensionales, indicaron que corresponden a sesquiterpenos con esqueleto de dihidro- β -agarofurano funcionalizados en 1, 2, 4, 6, 8 y 9. Así, en sus correspondientes espectros de RMN de ^1H (Fig. 3.38 y Fig. 3.39) y de ^{13}C (Tabla 3.5 y Tabla 3.4), se observaron señales correspondientes a dos grupos acetato, un benzoato, un butirato, un metilbutirato y un alcohol terciario en el compuesto **A20** y dos grupos acetato, dos benzoatos, un alcohol secundario y un alcohol terciario en el compuesto **A21**. El análisis de un experimento HMBC nos permitió determinar la regiosustitución sobre el esqueleto agarofuránico de estos sustituyentes de forma inequívoca.

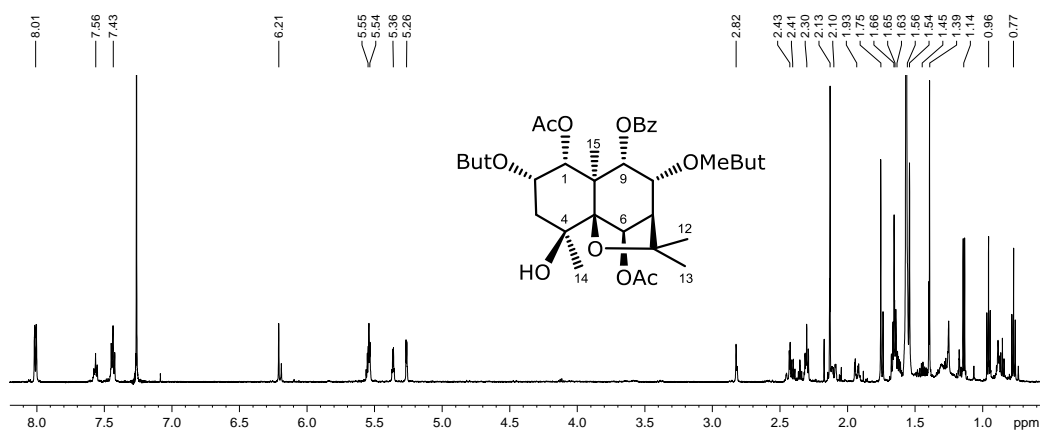


Fig. 3.38 | Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 600 MHz) del compuesto **A20**.

La configuración relativa fue establecida mediante el estudio de las constantes de acoplamiento en su espectro de RMN de ^1H . Así, el análisis de las constantes de acoplamiento indica, en ambos productos, una disposición *cis* entre H-1/H-2 y entre H-8/H-9, lo que fue confirmado mediante experimentos de RMN de correlación espacial (Fig. 3.40). Así, se observó NOE del Me-15 con H-6/Me-14, correlación del Me-13 con H-8/H-9 y de H-1 β con H-2 β /H-3 β en el compuesto **A20**. Por otra parte, en un experimento NOESY-1D del compuesto **A21**, se observaron las siguientes correlaciones espaciales: Me-13/H-8/H-9, Me-15/H-6/Me-14 y H-1 β /H-2 β /H-3 β .

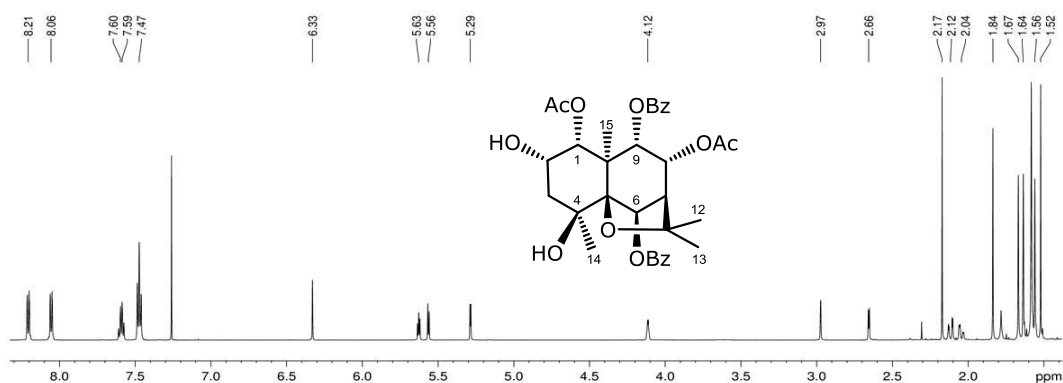


Fig. 3.39 | Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 600 MHz) del compuesto **A21**.

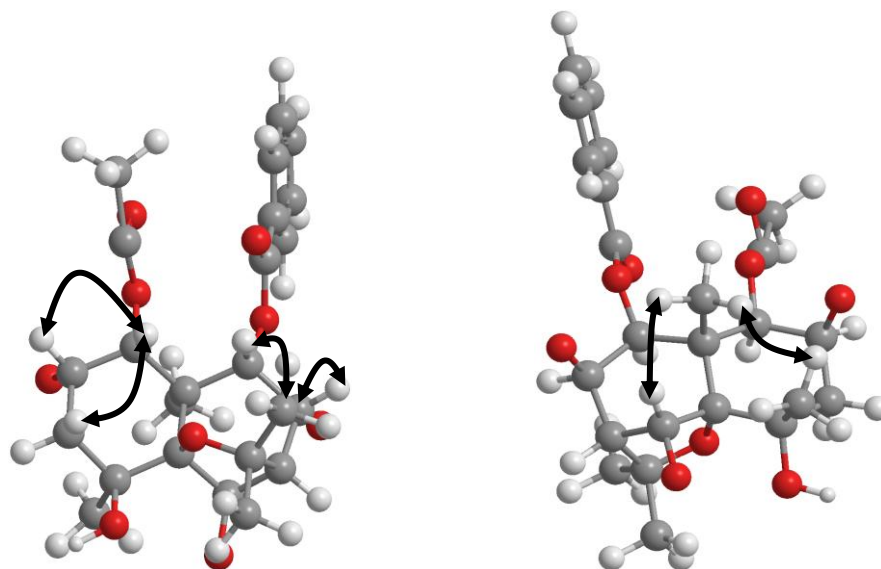


Fig. 3.40 | Correlaciones espaciales observadas en un experimento ROESY de los metabolitos **A20** y **A21**. Los sustituyentes sobre C-1, C-6 y C-9 no se incluyen en la figura con objeto de simplificarla.

Sesquiterpenos **A22** y **A23**

El estudio de los datos espectroscópicos de los agarofuranos **A22** y **A23** indicó que poseen un esqueleto polihidroxílico base muy similar a los compuestos descritos anteriormente, **A20** y **A21**. Así, en sus espectros de RMN de ^1H (Fig. 3.41) y ^{13}C (Tabla 3.5 y Tabla 3.4), se observaron como principales diferencias la ausencia de la señal correspondiente al protón metínico H-6 y la presencia de señales asignables a un grupo metileno (δ_{H} 2.34, 2.43 y δ_{C} 25.9, **A22**; δ_{H} 2.36, 2.43 y δ_{C} 25.7, **A23**), así como señales asignadas a dos grupos acetato, un grupo benzoato y un alcohol terciario en ambos compuestos.

La única diferencia estructural entre estos compuestos está en el sustituyente situado sobre C-1. Así, en el espectro de RMN de ^1H de **A22** se observó un sistema hidroximetínico [δ_{H} 1.80 (d_{A} , $J = 3.6$ Hz, OH-1), 4.11 (t_{A} , $J = 3.6$ Hz, H-1)], y en del compuesto **A23**, la señal correspondiente a un grupo acetato (δ_{H} 1.41) y el desplazamiento de H-1 a campo más bajo (δ_{H} 5.23, d , $J = 3.7$ Hz). Estos datos están de acuerdo con sus fórmulas moleculares, $\text{C}_{26}\text{H}_{34}\text{O}_9$ y $\text{C}_{28}\text{H}_{36}\text{O}_{10}$, respectivamente.

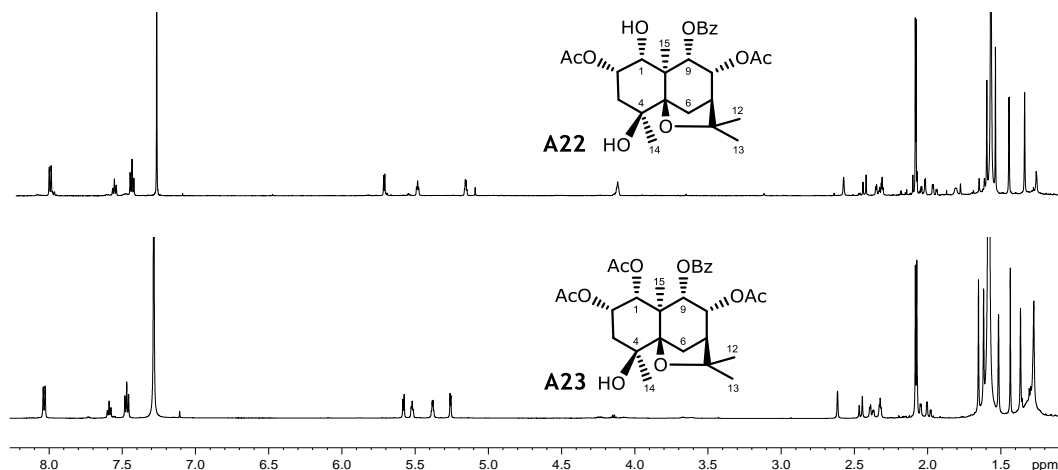


Fig. 3.41 | Espectros de RMN de ^1H (CDCl_3 , 600 MHz) de **A22** (arriba) y **A23** (abajo).

Un cuidadoso estudio de los experimentos bidimensionales (COSY, HSQC, HMBC y ROESY) nos permitió establecer la posición y estereoquímica relativa de los diferentes grupos sobre el esqueleto sesquiterpénico, destacando el experimento HMBC que nos permitió determinar la regiosustitución de los diferentes grupos funcionales en el sistema decalínico. La estereoquímica relativa fue determinada mediante un estudio de las constantes de acoplamiento y confirmada mediante un experimento de correlación espacial tipo ROESY.

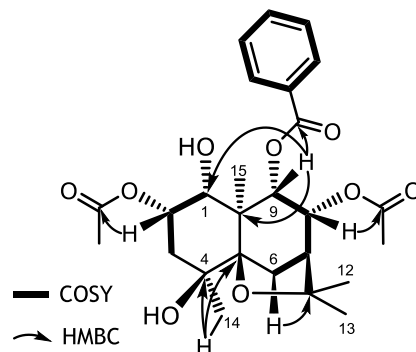


Fig. 3.42 | Correlaciones homonucleares y heteronucleares a larga distancia $^{2,3}J_{\text{C,H}}$ observadas en experimentos de RMN bidimensionales tipo COSY y HMBC, respectivamente, del metabolido **A22**, (CDCl_3 , 600 MHz).

Con el objetivo de determinar la configuración absoluta del alcohol secundario sobre C-2 nos planteamos la preparación de un derivado de **A22** con ácido 2-fenil-2-metoxiacético y posterior aplicación del método de Riguera⁷⁹. Así, a una disolución de **A22**,

⁷⁹ SECO, J. M.; QUIÑOÁ, E.; RIGUERA, R. (2004). The assignment of absolute configuration by NMR. *Chem. Rev.*, 104, 17–117.

Et₃N y DMAP en diclorometano seco, a temperatura ambiente y bajo atmósfera de argón, se le añadió una disolución de ácido 2-fenil-2-metoxi-acético tratado anteriormente con DCC para formar el correspondiente anhídrido. Sin embargo, tras 10 días de agitación, se recuperó el producto de partida, por lo cual nos fue imposible determinar su configuración absoluta mediante esta metodología.

La configuración absoluta de los metabolitos **A20**, **A21** (1*R*,2*S*,4*S*,5*R*,6*R*,7*R*,8*R*,9*R*,10*S*) y **A22**, **A23** (1*R*,2*S*,4*S*,5*R*,7*S*,8*R*,9*R*,10*S*), fue establecida en base a consideraciones biogenéticas, puesto que presentan el mismo esqueleto polihidroxílico base de 4β-hidroxi-atalol⁸⁰, cuya configuración absoluta había sido establecida mediante dicroísmo circular.

Sesquiterpenos A24 y A25

A los compuestos que se denominaron **A24** y **A25**, se les asignó la fórmula molecular de C₃₇H₃₉NO₉ y C₃₇H₃₉NO₁₀, respectivamente, basándonos en sus datos de masas de alta resolución. Ambos compuestos presentaron señales en sus espectros de RMN de ¹H (Fig. 3.43, y ¹³C (Tabla 3.5 y Tabla 3.4), asignables a un grupo nicotinato, dos benzoatos y un acetato.

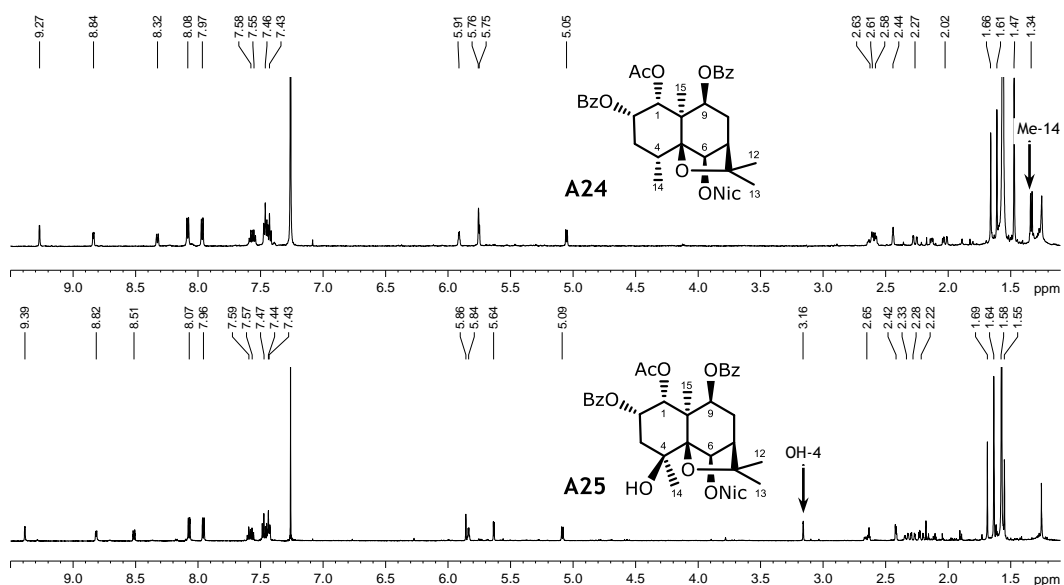


Fig. 3.43 | Espectros de RMN de ¹H (CDCl₃, 600 MHz) de **A24** (arriba) y **A25** (abajo).

⁸⁰ GONZÁLEZ, A. G.; JIMÉNEZ, I. A.; RAVELO, A. G.; BAZZOCCHI, I. L. (1993). Minor sesquiterpenes from *Maytenus canariensis* with insecticidal and antifeedant activity. *Tetrahedron*, 49(30), 6637–4433.

Estos datos indicaron que los dos compuestos están relacionados estructuralmente, observándose como principal diferencia en sus espectros de RMN de ^1H y ^{13}C la ausencia de la señal correspondiente al grupo hidroxilo terciario sobre C-4 (δ_{H} 3.16, δ_{C} 70.1 d) presente en **A25** y la presencia de un doblete a (δ_{H} 1.34, δ_{C} 34.0 s) asignado al Me-14 en **A24**.

El análisis de los datos obtenidos a partir de experimentos de RMN tipo HMBC nos permitió asignar de forma inequívoca la posición de los distintos ésteres en las moléculas. Por otra parte, la estereoquímica relativa de 1α , 2α , 6β , 9β y 14α fue establecida mediante el análisis de las constantes de acoplamiento y experimentos de correlación espacial. Así, en el experimento ROESY de **A24** se observó correlación espacial de H-9 con H-6/Me-15 y correlación entre H- 1β y H- 2β /H- 3β . Por otra parte, en el experimento NOESY-1D de **A25**, se observó NOE de H- 1β con H- 2β /H- 3β y correlación del Me-15 con H-6/H-9/Me-14. La estereoquímica relativa de **A24** y **A25** quedó fijada así como $1\alpha, 2\alpha, 9\beta, 6\beta$.

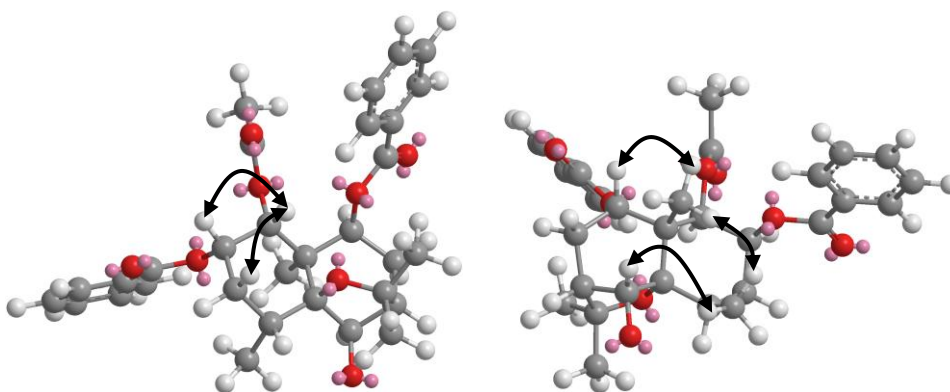


Fig. 3.44 | Correlaciones espaciales observadas en las estructuras de los metabolitos **A24** y **A25** en un experimento ROESY. Los sustituyentes sobre C-4, C-6 y C-15 no se incluyen en la figura a fin de simplificarla.

La configuración absoluta de **A24** y **A25** se estableció como $(1R,2S,4R,5R,6R,7R,9S,10R)$ -1-acetiloxi-2,9-dibenzoiloxi-6-nicotinoiloxi-dihidro- β -agarofurano y $(1R,2S,4S,5R,6R,7R,9S,10R)$ -1-acetiloxi-2,9-dibenzoiloxi-4-hidroxi-6-nicotinoiloxi-dihidro- β -agarofurano, respectivamente, basándonos en consideraciones biogénicas, dado que estos compuestos poseen el mismo esqueleto polihidroxílico base que **A7**, cuya configuración absoluta determinamos por dicroísmo circular.

Sesquiterpenos A28 y A30

Los compuestos **A28** y **A30** se aislaron como sólidos amorfos de fórmula molecular $C_{30}H_{38}O_{12}$ y $C_{32}H_{37}NO_9$, respectivamente, determinada por espectrometría de masas de alta resolución. Sus datos físicos y espectroscópicos, incluyendo experimentos de RMN indicaron que corresponden a sesquiterpenos con esqueleto de dihidro- β -agarofurano poliesterificados.

En el espectro de RMN de 1H (Fig. 3.45) del sesquiterpeno **A28** se observaron señales singuletos que integran para tres protones cada una (δ_H 1.49, 2.11, 2.20 y 2.28) asignadas a cuatro grupos acetato, señales a δ_H 7.46 (2H, t, $J = 7.7$ Hz), 7.60 (1H, t, $J = 7.3$ Hz), 8.02 (2H, dd, $J = 1.2, 8.3$ Hz) correspondientes a un grupo benzoato y una señal a δ_H 2.66 (1H, s) característica de un alcohol terciario. Asimismo, en el espectro de RMN de 1H de **A30**, se observaron señales asignables a dos grupos acetato [δ_H 1.61 (3H, s), 2.28 (3H, s)], un grupo benzoato [δ_H 7.46 (2H, t, $J = 7.8$ Hz), 7.58 (1H, t, $J = 7.4$ Hz), 8.07 (2H, dd, $J = 1.3, 8.5$ Hz)] y un nicotinato [δ_H 7.45 (1H, señal solapada), 8.30 (1H, td, $J = 1.7, 7.9$ Hz), 8.83 (1H, s_A), 9.24 (1H, s_A)].

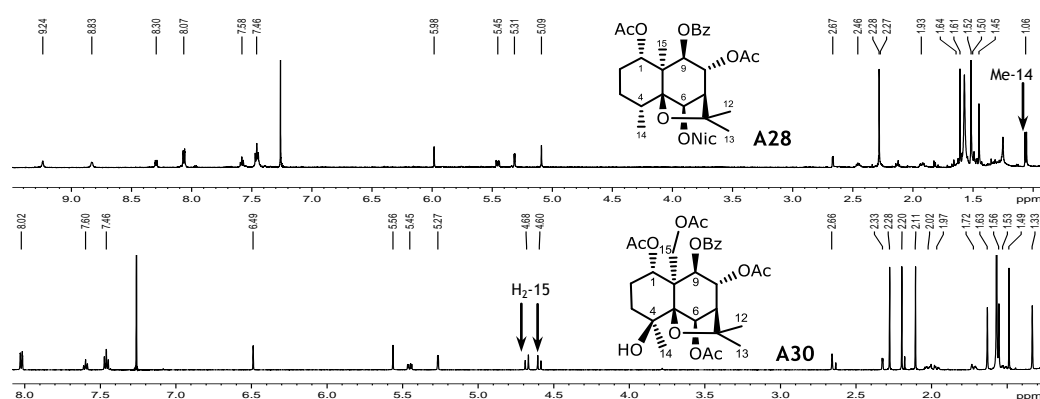


Fig. 3.45 | Espectros de RMN de 1H ($CDCl_3$, 600 MHz) de **A28** (arriba) y **A30** (abajo).

El estudio de un experimento HMBC nos permitió establecer la posición de cada uno de los grupos funcionales en las moléculas de forma inequívoca. Así, en el espectro de **A28**, se observó correlación a larga distancia entre los carbonos carboxílicos de los acetatos a δ_C 169.6 ($2 \times s$), 170.0 (s) y 170.6 (s) con las señales a δ_H 5.45 (H-1), 6.49 (H-6), 5.27 (H-8) y 4.60, 4.68 (H₂-15), respectivamente, así como correlación del carbono carboxílico del benzoato a δ_C 164.6 con la señal a δ_H 5.56 (H-9). De igual manera, en el metabolito **A30**, el análisis de las correlaciones carbono-protón a tres enlaces permitió determinar la posición de los grupos acetatos sobre los carbonos C-1 y C-8, nicotinato sobre C-6 y benzoato sobre C-9.

La configuración relativa fue establecida mediante el estudio de las constantes de acoplamiento en sus espectros de RMN de ^1H , que indicaron una disposición *trans* H-8/H-9, lo que fue confirmado mediante un experimento ROESY (Fig. 3.46), observándose NOE de las señales correspondientes a los protones H-6 con H-9, Me-14 y H-15, correlación de H-8 con Me-13, así como de H-1 β con H-2 β y H-3 β .

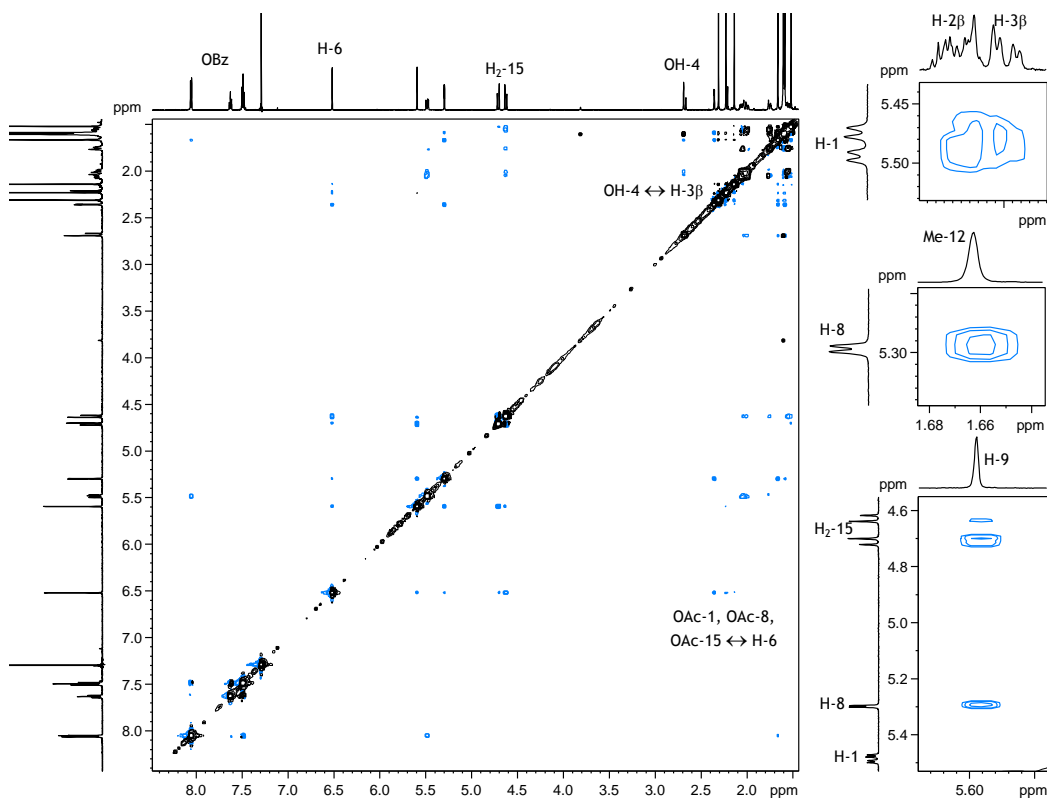


Fig. 3.46 | Espectro de RMN de ROESY (CDCl_3 , 600 MHz) de **A28** con ampliaciones (derecha).

La configuración absoluta de **A28** y **A30** se estableció en base a consideraciones biogenéticas, dado que estos compuestos poseen los mismos centros estereogénicos que el compuesto **A17** aislado en el estudio fitoquímico de esta Memoria, siendo la única diferencia la epimerización en el carbono C-8. Así, queda establecida la estructura de **A28** y **A30** como $(1R,4S,5R,6R,7R,8R,9S,10S)$ -1,6,8,15-tetraacetiloxi-9-benzoiloxi-4-hidroxi-dihidro- β -agarofurano y $(1R,4R,5R,6R,7R,8R,9S,10S)$ -1,8-diacetiloxi-6-nicotinoiloxi-9-benzoiloxi-dihidro- β -agarofurano, respectivamente.

Tabla 3.4 | Datos de RMN de ^1H (CDCl_3 , a 600 MHz, b 500 MHz) de los compuestos A15, A20–A25, A28 y A30. Los valores de desplazamiento δ se basan en experimentos de RMN tipo COSY y HSQC editado. La multiplicidad y las constantes de acoplamiento J en Hz se indican en paréntesis. Los valores que se indican sin multiplicidad corresponden a señales cuya multiplicidad no se logró determinar por solapamiento completo. El * indica señales que presentan el mismo centro de la señal, pero cuya multiplicidad se podía determinar.

	A15 ^a	A20 ^a	A21 ^b	A22 ^a	A23 ^a	A24 ^a	A25 ^a	A28 ^a	A30 ^a
1β	5.30 (dd, 4.1, 12.1)	5.26 (d, 3.7)	5.29 (d, 3.4)	4.11 (t _A , 3.6)	5.23 (d, 3.7)	5.75 (d, 3.8)	5.64 (d, 3.6)	5.45 (dd, 4.5, 12.1)	5.45 (dd, 4.2, 11.8)
OH-1	—	—	—	1.80 (d _A , 3.6)	—	—	—	—	—
2α	1.45	—	—	—	—	—	—	1.53 (m)	1.64
2β	1.91 (m)	5.36 (dd, 3.5, 6.8)	4.12 (dd _A , 3.4, 6.5)	5.15 (dd, 3.6, 6.8)	5.35 (dd, 3.7, 7.0)	5.91 (dd, 3.4, 6.9)	5.84 (dd, 3.6, 7.0)	2.02 (m)	1.93 (m)
3α	1.67	1.93 (dd, 3.0, 15.1)	2.12 (dd, 2.8, 14.5)	1.95 (dd _A , 3.7, 15.0)	2.04 (dd, 3.8, 15.1)	2.02 (ddd, 0.8, 2.6, 14.7)	2.22 (dd, 3.3, 15.3)	1.72 (td, 3.5, 14.0)	1.50
3β	1.87 (m)	2.10 (dd, 3.4, 15.1)	2.04 (dd, 3.5, 14.5)	2.03 (dd, 3.0, 15.0)	1.97 (dd, 3.0, 15.1)	2.62 (m)	2.33 (dd, 3.8, 15.3)	1.97 (dt, 4.6, 14.0)	2.27
4β	—	—	—	—	—	2.59 (m)	—	—	2.46 (m)
OH-4	2.84 (s)	2.82 (s)	2.97 (s)	2.57 (s)	2.59 (d, 1.3)	—	3.16 (s)	2.66 (s)	—
6α	5.52 (s)	6.21 (s)	6.33 (s)	2.34 (dd, 4.5, 12.6)	2.43 (d, 12.7)	5.76 (d, 0.7)	5.86 (s)	6.49 (s)	5.98 (s)
6β	—	—	—	2.43 (d, 12.6)	2.36 (ddd, 1.2, 4.0, 12.7)	—	—	—	—
7α	2.38 (d, 3.2)	2.43 (d, 4.0)	2.66 (d, 4.4)	2.31 (t, 4.0)	2.30 (t, 3.8)	2.44 (t, 3.2)	2.42 (t, 3.4)	2.33 (d, 2.9)	2.67 (d, 3.2)
8α	5.63 (dd, 3.2, 6.3)	—	—	—	—	2.61 (m)	2.65 (ddd, 3.4, 7.0, 16.8)	—	—
8β	—	5.55 (dd, 4.0, 5.2)	5.63 (t, 4.9)	5.48 (t, 4.7)	5.49 (t, 4.4)	2.27 (dd, 3.2, 16.5)	2.28 (dd, 3.4, 16.8)	5.27 (dd, 2.9)	5.31 (d, 3.3)
9α	5.40 (d, 6.3)	—	—	—	—	5.05 (d, 7.0)	5.09 (d, 6.8)	5.56 (s)	5.09 (s)
9β	—	5.54 (dd, 5.2)	5.56 (d, 5.3)	5.71 (d, 5.1)	5.55 (d, 5.2)	—	—	—	—
12	1.49 (s)	1.56	1.56 (s)	1.33 (s)	1.34 (s)	1.47* (s)	1.58	1.56 (s)	1.45 (s)
13	1.51 (s)	1.66 (s)	1.67 (s)	1.59 (s)	1.59 (s)	1.47* (s)	1.55 (s)	1.63 (s)	1.52* (s)
14	1.31 (s)	1.54 (s)	1.64 (s)	1.44 (s)	1.49 (s)	1.34 (d, 7.5)	1.64* (s)	1.33 (s)	1.06 (d, 7.6)
15	1.43 (s)	1.75 (s)	1.84 (s)	1.53 (s)	1.63 (s)	1.66 (s)	1.69 (s)	4.60, 4.68 (d, 12.9)	1.52* (s)

Tabla 3.5 | Datos de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 150 MHz) de los compuestos A15, A20–A25, A28 y A30. Los valores de desplazamiento δ se basan en experimentos de RMN, HSQC editado y HMBC. El * indica señales que presentaron el mismo desplazamiento químico.

	A15	A20	A21	A22	A23	A24	A25	A28	A30
1	72.3 (d)	75.2 (d)	77.4 (d)	74.3 (d)	75.3 (d)	71.2 (d)	70.2 (d)	72.6 (d)	73.5 (d)
2	23.2 (t)	68.5 (d)	68.9 (d)	72.8 (d)	69.2 (d)	70.6 (d)	69.4 (d)	23.7 (t)	21.2 (t)
3	38.5 (t)	42.0 (t)	44.0 (t)	40.5 (t)	40.5 (t)	31.1 (t)	42.5 (t)	37.8 (t)	26.7 (t)
4	70.4 (s)	69.6 (s)	69.9 (s)	69.2 (s)	69.1 (s)	34.0 (d)	70.1 (s)	70.3 (s)	34.2 (d)
5	91.3 (s)	92.3 (s)	92.7 (s)	91.8 (s)	91.7 (s)	89.7 (s)	91.4 (s)	91.6 (s)	90.5 (s)
6	77.5 (d)	74.9 (d)	75.9 (d)	25.9 (t)	25.7 (t)	80.5 (d)	80.4 (d)	75.3 (d)	77.1 (d)
7	53.7 (d)	52.8 (d)	52.4 (d)	47.6 (d)	47.7 (d)	49.0 (d)	49.1 (d)	53.2 (d)	53.1 (d)
8	68.7 (d)	70.5 (d)	70.9 (d)	70.5 (d)	70.1 (d)	31.8 (t)	31.3 (t)	76.5 (d)	76.1 (d)
9	72.2 (d)	74.6 (d)	74.8 (d)	75.3 (d)	74.9 (d)	72.9 (d)	72.5 (d)	73.5 (d)	76.9 (d)
10	49.9 (s)	49.8 (s)	50.1 (s)	48.5 (s)	47.5 (s)	50.0 (s)	51.3 (s)	53.6 (s)	50.1 (s)
11	84.7 (s)	83.5 (s)	83.3 (s)	82.0 (s)	82.3 (s)	83.0 (s)	85.0 (s)	83.0 (s)	81.9 (s)
12	30.2 (c)	29.4 (c)	29.5 (c)	29.5 (c)	29.4 (c)	30.9 (c)	29.8 (c)	29.5 (c)	31.2 (c)
13	26.2 (c)	23.9 (c)	23.9 (c)	22.6 (c)	22.7 (c)	26.0 (c)	25.9 (c)	25.5 (c)	25.6 (c)
14	23.9 (c)	25.2 (c)	25.2 (c)	24.9 (c)	25.0 (c)	19.1 (c)	25.5 (c)	23.1 (c)	17.4 (c)
15	19.6 (c)	14.5 (c)	15.0 (c)	12.7 (c)	13.9 (c)	20.8 (c)	21.8 (c)	65.2 (t)	18.7 (c)

3.2.2 | Modificaciones estructurales: Preparación de una quimioteca de sesquiterpenos

En este apartado de esta Memoria se describe la preparación de una quimioteca de sesquiterpenos agarofuránicos, con la finalidad de profundizar en la relación estructura-actividad (SAR), determinando el papel que juegan los diferentes sustituyentes, y optimizar la bioactividad. Como plataformas se utilizaron los sesquiterpenos agarofuránicos naturales **A17** y **A18**, aislados de las hojas de *Celastrus vulcanicola*. Éstos fueron seleccionados no sólo por su perfil farmacológico como revertidores de la MDR en cáncer, sino también dado que representan metabolitos secundarios mayoritarios en la planta.

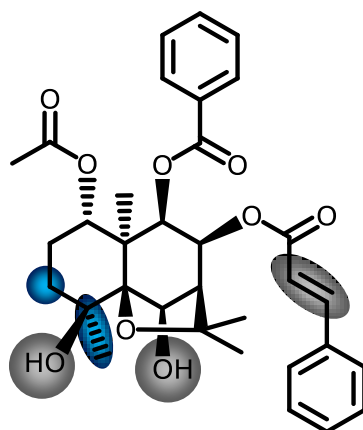


Fig. 3.47 | Estructura de **A17**, cabeza de serie usado en la preparación de una quimioteca en la que se evalúa la influencia de los diferentes grupos funcionales en su actividad revertidora.

Al analizar la estructura del *cabeza de serie* **A17**, podemos identificar varios motivos estructurales capaces de interactuar con una molécula diana, ya sea a través de enlaces de hidrógeno o enlaces tipo Van der Waals (Fig. 3.47). Por otra parte, la molécula posee grupos que, una vez modificados, introducen nuevas interacciones con el receptor, como son las posiciones C-3 y C-4.

Teniendo en cuenta estos aspectos estructurales del *cabeza de serie*, llevamos a cabo modificaciones químicas siguiendo la estrategia que se detalla a continuación (Fig. 3.48):

- Se llevaron a cabo reacciones de oxidación, esterificación, cloración y eliminación, a fin de profundizar en su implicación en la actividad. Las esterificaciones, además, nos sirvieron como método para introducir nuevos grupos funcionales con

diferentes características estéreoeléctricas o solubilidad en la estructura del *cabeza de serie*. Por otra parte, dado que, como queda reflejado en la bibliografía Química Médica, las aminas terciarias juegan un importante papel en la actividad revertidora de la MDR, nos planteamos la preparación de aminas o sistemas heteroaromáticos.

- Se llevó a cabo la hidrogenación de dobles enlaces en la molécula para evaluar la importancia de las **insaturaciones en la bioactividad**.
- Se llevó a cabo como aproximación al diseño de nuevos fármacos, la preparación de compuestos híbridos, estrategia que permite aumentar la bioactividad de un *cabeza de serie* dado. Así, llevamos a cabo la preparación de homo- y heterodímeros con diferentes tipos de espaciadores.

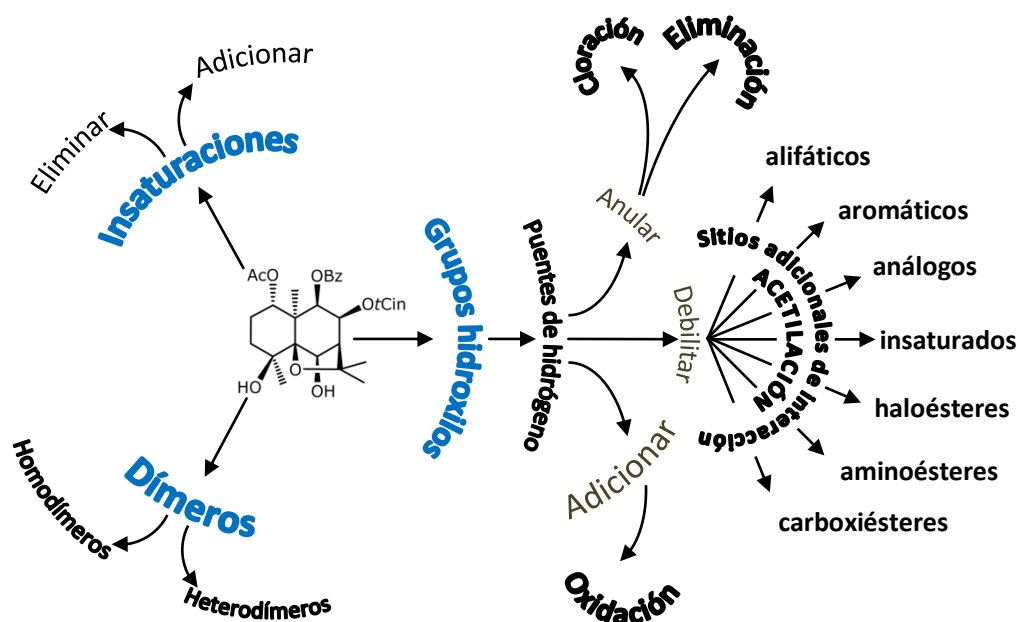


Fig. 3.48 | Esquema de las estrategias planteadas para la preparación de una quimioteca de sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos.

Las estructuras de los derivados fueron elucidadas mediante técnicas espectrométricas y espectroscópicas de RMN de ^1H y ^{13}C , incluyendo experimentos homo- (COSY y ROESY) y heteronucleares (HSQC y HMBC), en aquellos casos en los que fue necesario para determinar la estructura del derivado de manera inequívoca.

A | Transformación de los grupos hidroxilos

I. Reacciones de Oxidación

La oxidación de un grupo hidroxilo a su correspondiente cetona anula su carácter dador de enlaces de hidrógeno sin afectar, por otra parte, su capacidad de actuar comoceptor⁸¹. Así, para evaluar el efecto dador de enlaces de hidrógeno del alcohol secundario en posición C-6 de compuesto **A17**, se llevó a cabo la oxidación con clorocromato de piridinio (PCC) en CH₂Cl₂, a temperatura ambiente y bajo atmósfera de argón, obteniéndose el derivado oxidado **2a**, con un rendimiento del 23.0%.

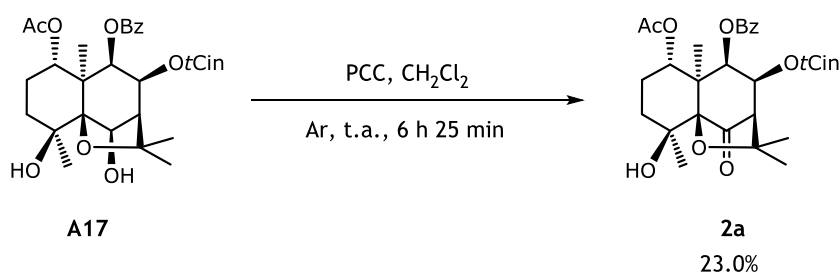


Fig. 3.49 | Oxidación del compuesto **A17** en posición C-6.

Los espectros de RMN de ¹H (Fig. 3.50) y ¹³C (Fig. 3.51) del derivado **2a** presentaron, como principales diferencias con respecto a los del productos de partida **A17**, la desaparición de las señales correspondientes al grupo hidroximetino en C-6 (δ_H 4.53 y 5.10 y δ_C 78.0) y la presencia de una señal a δ_C 206.4 de un grupo carbonilo.

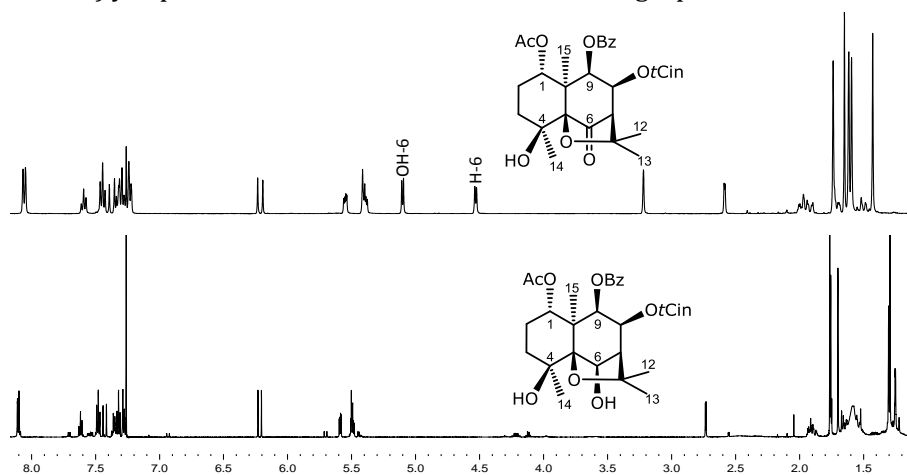


Fig. 3.50 | Espectros de RMN de ¹H del compuesto de partida, **A17** (CDCl₃, 400 MHz), y de su derivado, **2a** (CDCl₃, 600 MHz). Se observa la desaparición de las señales del hidroximetino sobre el carbono C-6.

⁸¹ PATRICK, G. L. (2013). *An introduction to Medicinal Chemistry*. 5ª ed. Oxford: Oxford University Press.

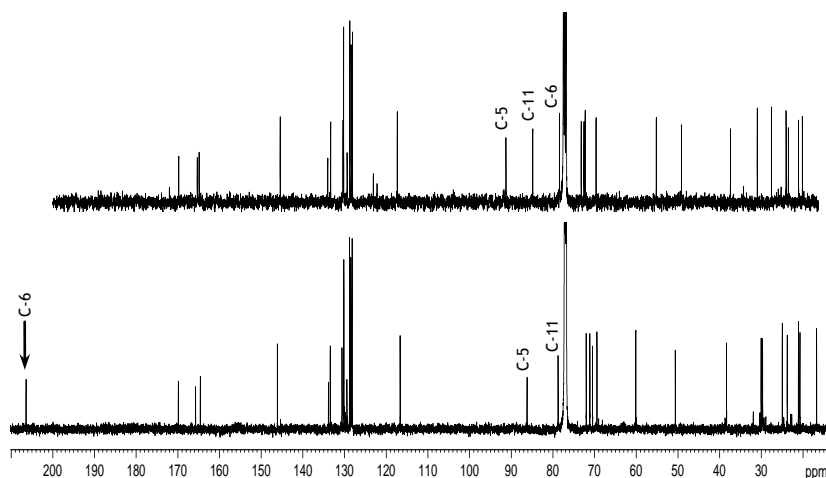


Fig. 3.51 | Espectro de de RMN de ^{13}C del producto de partida, **A17** (CDCl_3 , 100 MHz, arriba), y de su derivado, **2a** (CDCl_3 , 150 MHz, abajo).

II. Reacciones de Acilación

Para ampliar el conocimiento de la implicación de los grupos hidroxilos en la actividad revertidora de la MDR de estos sesquiterpenos, se transformó el/los grupos hidroxilos en éster, capaces de actuar como aceptores de enlaces de hidrógeno, aunque las interacciones sean más débiles debido a los efectos estéricos del grupo acilo. Por otra parte, los efectos electrónicos del grupo carboxílico reducen su posible participación en la formación de enlaces de hidrógeno, ya que los electrones libres del oxígeno se encuentran comprometidos en una estructura resonante.

Se planificó la preparación de ésteres alifáticos, olefínicos, acetilénicos, aromáticos, análogos de ésteres, haloésteres, carboxiésteres y aminoésteres. Los agentes acilantes utilizados fueron seleccionados para conferir diferentes propiedades estéreo-electrónicas y lipofílicas a la plataforma sesquiterpénica.

Las acilaciones se llevaron a cabo bajo diferentes condiciones de reacción a fin de obtener el monoéster y/o el diéster, teniendo presente la mayor reactividad que presenta el alcohol secundario en la posición C-6 frente al alcohol terciario en C-4.

Como método general, las reacciones se realizaron, en primer lugar a $0\text{ }^\circ\text{C}$ en CH_2Cl_2 con Et_3N y DMAP, para favorecer la formación del monoéster en C-6, teniendo en cuenta la reactividad del acilante⁸². En los casos en los que la reacción no evolucionaba se llevó a cabo a temperatura ambiente o incluso a reflujo con CH_2Cl_2 , CHCl_3 o tolueno. Además, en las esterificaciones se usaron como reactivo un ácido carboxílico en presencia de

⁸² OTERA, J. (2003). *Esterification*. Weinheim, Alemania: Wiley-VHC Verlag GmbH & Co. KGaA.

DCC, siguiendo el método de Steglich⁸³, cloruro de ácido o anhídrido simple o mixto, así como agentes de acoplamiento como el hidroxibenzotriazol (HOBt), siguiendo la metodología propuesta por CHAN y col.⁸⁴. En la formación de los carboxiésteres, las reacciones se llevaron a cabo usando 2,6-lutidina como disolvente, siguiendo el procedimiento reportado por NWANNE y col.⁸⁵ En la esterificación del alcohol terciario sobre C-4, el uso de ZnO o ZnCl₂, modificando el método reportado por REZA y col.⁸⁶, dio los mejores resultados, además, sin necesidad de trabajar bajo atmósfera inerte o con disolventes excesivamente secos. Los disolventes usados en las reacciones llevadas a cabo en ausencia de humedad, se secaron con microsieb A4, según el método descrito por WILLIAMS & LAWTON⁸⁷. Las condiciones específicas de cada reacción se indican en la parte experimental de esta Memoria de Tesis.

La introducción de **ésteres alifáticos** de diferentes tamaños influye en la lipofilia de una molécula, modificando su capacidad de atravesar las membranas celulares. Por otra parte, los sustituyentes voluminosos pueden conferir selectividad a la molécula, impidiendo o facilitando su entrada al sitio activo de un enzima⁸¹. Así, se llevó a cabo la acetilación del sesquiterpeno **A17** con anhídrido acético, rindiendo el compuesto monoacetilado en C-6 con un rendimiento del 81.8%, cuyos datos físicos, espectrométricos y espectroscópicos fueron superponibles con los datos de **A18**, obtenido de forma natural y descrito en la bibliografía⁶¹. Ello nos permitió obtener cantidad de **A18** para usar como producto de partida en las esterificaciones del alcohol terciario sobre C-4.

Los derivados **3a-9a** se obtuvieron por tratamiento de **A17** con diferentes ácidos carboxílicos, cloruros de ácidos ó anhídridos alifáticos, tanto lineales como ramificados (Fig. 3.52). Cabe destacar, que al tratar **A17** con cloruro de pivaloilo, se obtuvo, además del derivado monoesterificado en C-6, el monoéster en C-4 y el correspondiente diéster. Sin embargo, tratamiento de **A17** con ácido fórmico, usando como catalizador ZnO,

⁸³ NEISES, B.; STEGLICH, W. (1978). Simple method for the esterification of carboxylic acids. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 17(7), 522-524.

⁸⁴ CHAN, LAI C.; COX, BRIAN G. (2007). Kinetics of Amide Formation through Carbodiimide/*N*-Hydroxybenzotriazole (HOBt) Couplings. *J. Org. Chem.* (2007), 72, 8863-8869.

⁸⁵ Nwanne, O. A.; Davisson, V. J. ; Cushman, M. (2006). Synthesis and anticancer activity of brefeldin A ester derivatives. *J. Med. Chem.*, 49, 3897-3905.

⁸⁶ REZA, T.; FATEMEH, C.; MEHDI, M.; MOJTABA, A. (2010). Commercial zinc oxide (Zn²⁺) as an efficient and environmentally benign catalyst for homogeneous benzoylation of hydroxyl functional groups. *Chin. J. Chem.*, 28, 1247-1252.

⁸⁷ WILLIAMS, D. B. G.; LAWTON, M. (2010). Drying of organic solvents: Quantitative evaluation of the efficiency of several desiccants. *J. Org. Chem.*, 75(24), 8351-8354

ZnCl₂, DMAP o DCC y diferentes condiciones de reacción, no rindió el producto deseado y el producto de partida se recuperó inalterado.

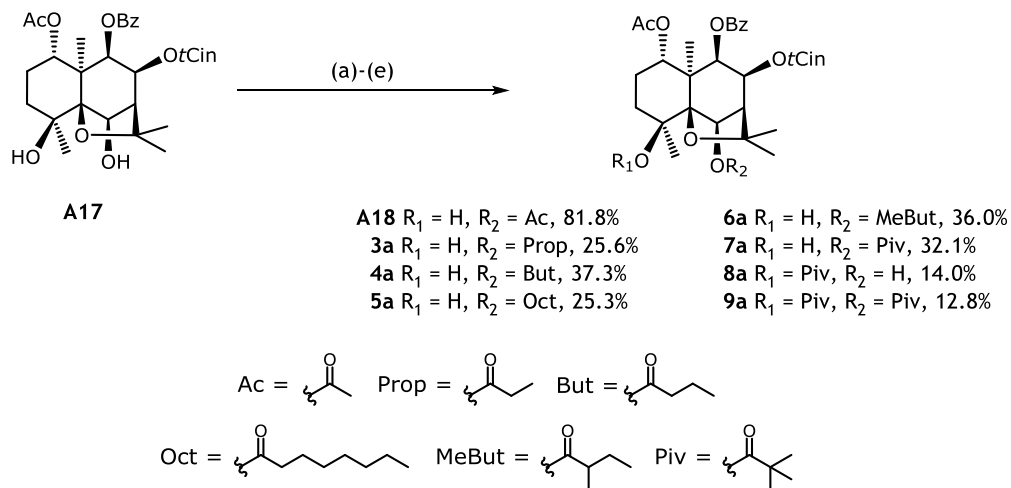


Fig. 3.52 | Preparación de **A18** y de los derivados **3a-9a** a partir de **A17**. Las condiciones de reacción correspondiente se indican en la parte experimental de esta Memoria de Tesis.

En el análisis de los datos de RMN de ¹H de estos derivados se observó, como principal diferencia con los del producto de partida, el desplazamiento de la señal correspondiente a H-6 a campo más bajo, la desaparición de la señal asignable al OH-6 y la presencia de las señales del correspondiente éster.

Así, por ejemplo, en el espectro de RMN de ¹H de **4a**, se observó como diferencia más significativa con el de **A17**, el desplazamiento de la señal del protón H-6 de δ_H 4.53 (1H, s) a δ_H 5.61 (1H, s) y la presencia de señales a δ_H 0.96 (3H, t, $J = 7.7$ Hz), 1.72 (2H, señal solapada) y 2.37 (2H, m), correspondientes al grupo butirato (Fig. 3.53).

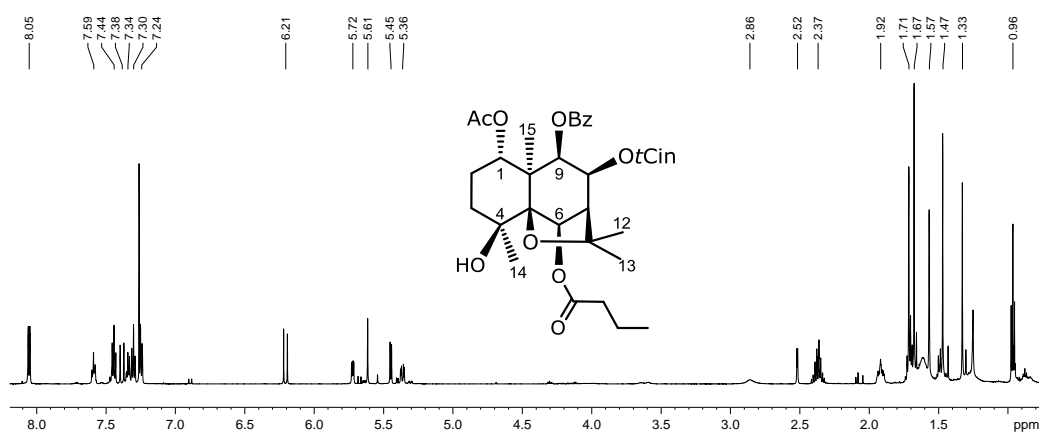


Fig. 3.53 | Espectro de RMN de ¹H del derivado **4a** (600 MHz, CDCl₃).

Se llevó a cabo la **preparación de ésteres cíclicos de anillos** de 3 y 6-miembros, usando las condiciones de reacción que se recogen en la Fig. 3.54.

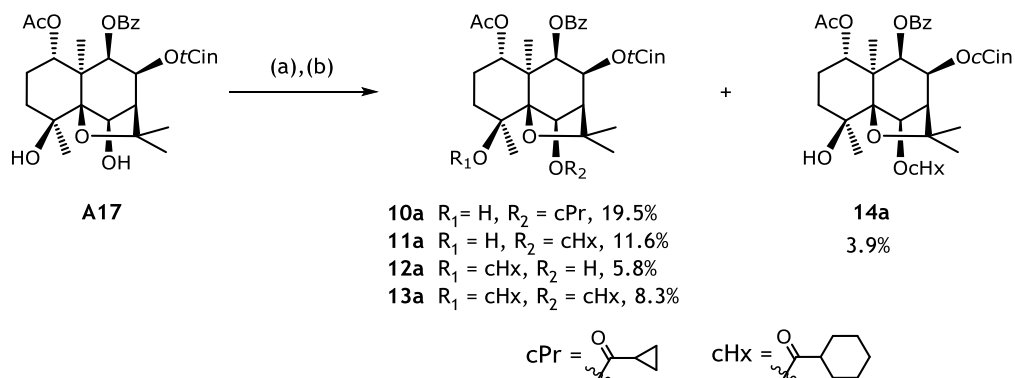


Fig. 3.54 | Preparación de ésteres cíclicos a partir del sesquiterpeno A17. Condiciones de reacción: (a) cHxCl (19.9 eq.), py, DMAP, ZnCl₂, PhMe, 0 °C→t.a. (3h); 80 °C (60 h). (b) cPrCl (3.8 eq.), DMAP, py, PhMe, 0 °C→t.a., Ar, 72 h.

Así, al tratar una disolución de **A17** en tolueno con cloruro de ciclohexilcarbonilo, piridina y DMAP, se obtuvieron como productos de reacción los derivados **11a–14a**. Cabe destacar, que al modificar las condiciones de reacción, usando el doble de equivalentes de reactivo y adición de ZnCl₂, rindió exclusivamente el diéster con un rendimiento de 23.1%.

El derivado **13a** presentó como principal diferencia en su espectro de RMM de ¹H (Fig. 3.55), con respecto al producto de partida, la desaparición de las señales correspondientes a los protones de los grupos hidroxilos en C-4 y C-6 a δ_H 3.22 y 5.10, respectivamente, y la presencia de señales correspondientes a dos grupos ciclohexilcarboxilato [δ_H 1.25 (10H, m), 1.42 (4H, m), 1.79 (4H, m), 1.91 (2H, m) y 2.28 (2H, dt, $J = 3.3, 11.6$ Hz)].

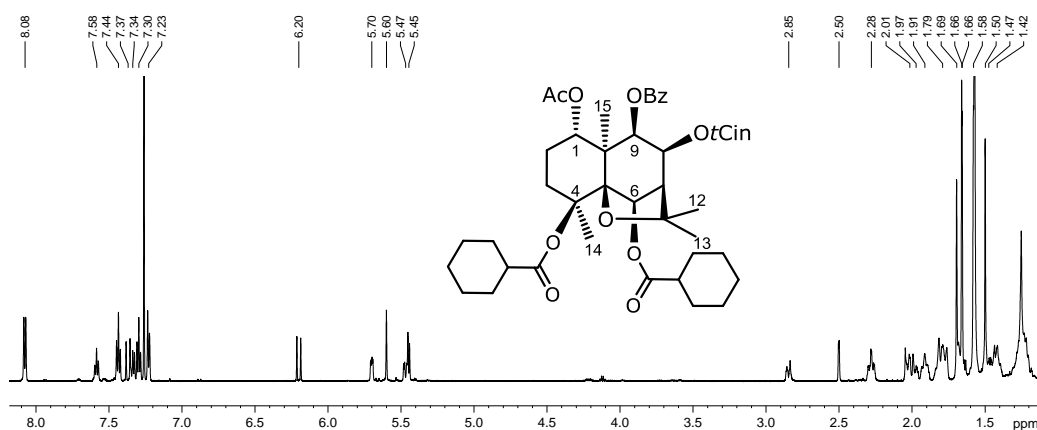


Fig. 3.55 | Espectro de RMN de ¹H del producto **13a** (CDCl₃, 600 MHz).

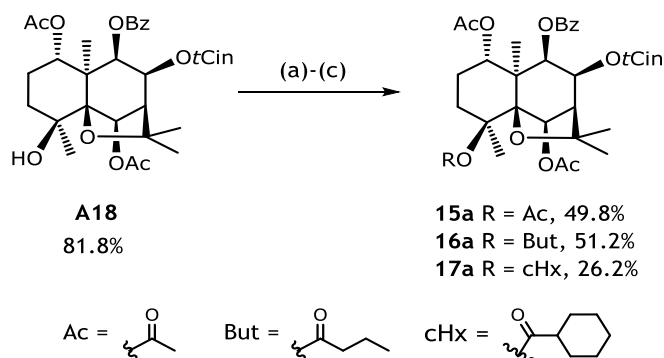


Fig. 3.56 | Preparación de ésteres alifáticos sobre C-4 a partir de A18. Condiciones de reacción (a),(b): AcO₂, ZnCl₂, CH₂Cl₂, t.a., Ar, 40 min. (b): But₂O, ZnCl₂, CH₂Cl₂, t.a., Ar, 7 h. (c) PhMe, py, DMAP, ZnCl₂, 0 °C→t.a., 63 h.

Con el objetivo de preparar **ésteres de cadena alifática en el alcohol terciario** sobre el carbono C-4, se llevaron a cabo acilaciones del sesquiterpene **A18** con anhídrido acético (**15a**), anhídrido butírico (**16a**) y cloruro de ciclohexilcarbonilo (**17a**), bajo las condiciones de reacción indicadas en la Fig. 3.56.

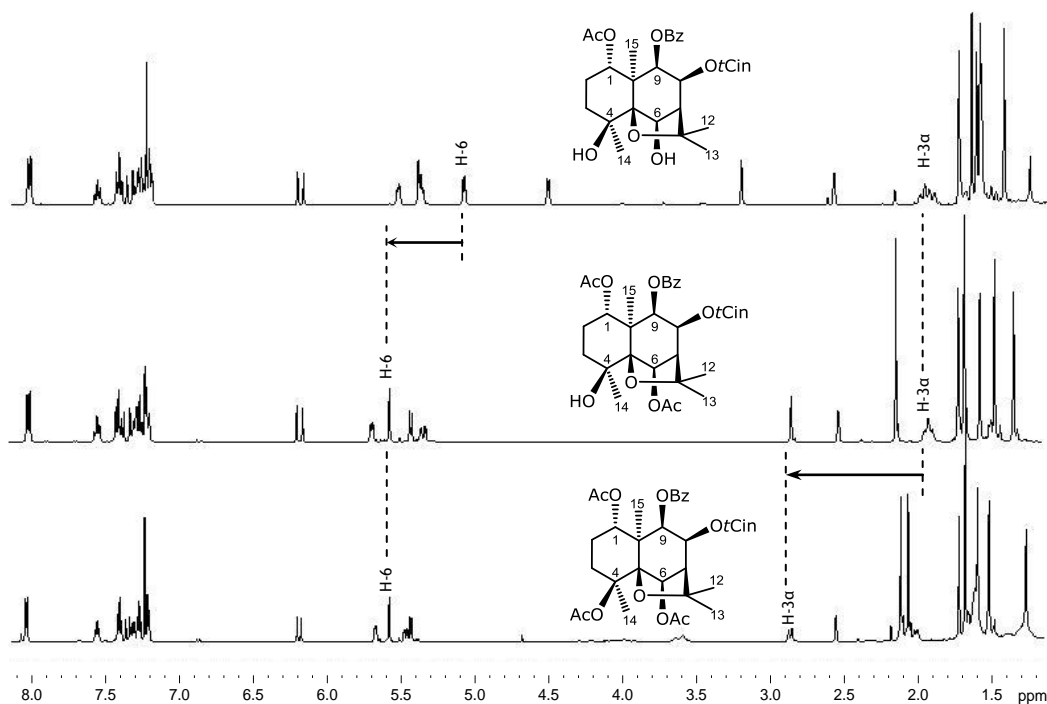


Fig. 3.57 | Espectro de RMN de ¹H de los metabolitos **A17**, **A18** y del derivado **15a** (CDCl₃, 600 MHz).

En el espectro de RMN de ¹H del derivado **15a** (Fig. 3.57) se observó como diferencia con el de **A18**, el desplazamiento de la señal asignada al protón H-3α de δH 1.70 a δH 2.86 (1H, d_A, J = 14.5 Hz), la desaparición de la señal correspondiente al grupo

hidroxilo en C-4 (δ_H 2.85) y la presencia de señales correspondientes al grupo acetato sobre el carbono C-4 a δ_H 2.05 (Fig. 3.57).

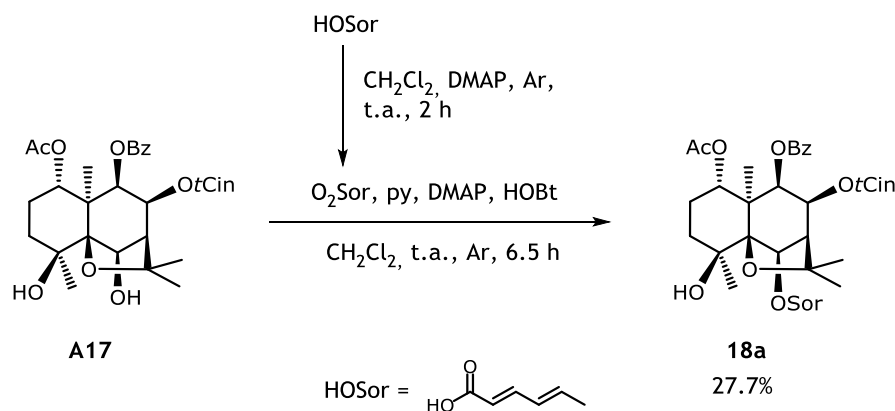


Fig. 3.58 | Preparación del análogo 18a.

En la siguiente estrategia nos planteamos la preparación de **ésteres insaturados**, utilizando como reactivos el ácido sórbico, ácido propiólico y ácido butinoico. Para ello, se trató el sesquiterpeno **A17** con anhídrido sórbico, previamente preparado *in situ* a partir del correspondiente ácido carboxílico por tratamiento con DCC en CH_2Cl_2 y bajo diferentes condiciones de reacción. Así, cuando se llevó a cabo la reacción en CH_2Cl_2 , Et_3N , reflujo durante 180 h y DMAP o HOBT, no se obtuvo el producto deseado, mientras que el uso de una mezcla de ambos, DMAP/HOBT y piridina rindió el derivado **15a**, con un 27.7% de rendimiento (Fig. 3.58).

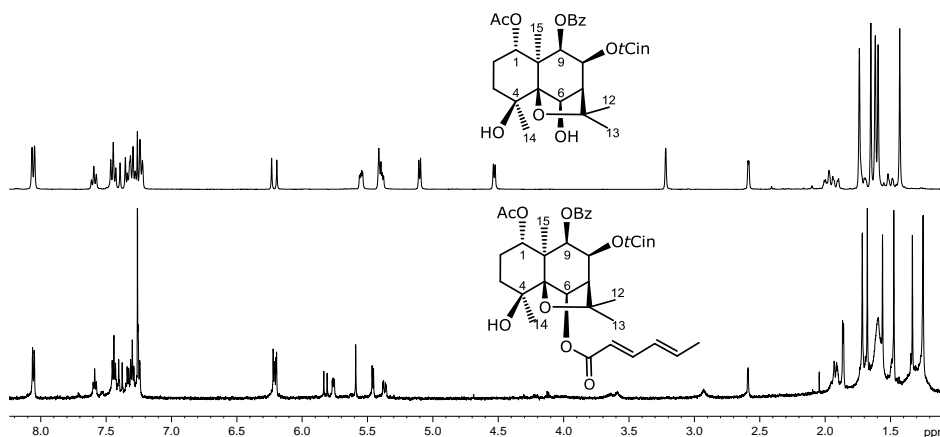


Fig. 3.59 | Espectro de RMN de ^1H del producto de partida **A17** (CDCl_3 , 400 MHz, arriba) y su derivado **18a** (CDCl_3 , 600 MHz).

El espectro de RMN de ^1H del compuesto **18a** (Fig. 3.59) mostró como característica principal el desplazamiento de H-6, de δ_H 4.53 (1H, s) en **A17** a δ_H 5.59 (1H, s), y la

presencia de las señales correspondientes al grupo sorbato, incluyendo las de cuatro protones vinílicos [δ_H 5.82 (1H, d, $J = 15.3$ Hz, H-2'), δ_H 6.20 (2H, m, H-4', H-5') y δ_H 7.33 (1H, d, $J = 15.3$ Hz, H-3')] y un metilo sobre doble enlace [δ_H 1.86 (3H, d, $J = 4.6$ Hz)].

Por otra parte, la acilación con ácido propiólico y ácido butanoico, usando diferentes condiciones de reacción, incluyendo número de equivalentes del acilante, activados en forma de anhídrido simple o cloruro de ácido, temperatura (reflujo en tolueno), tiempo de reacción (hasta 192 h), uso microsieb 4A en la mezcla de reacción o ausencia de luz, no rindió lugar a los derivados esperados.

Las regiones aromáticas en una molécula pueden interactuar con regiones hidrofóbicas de un receptor a través de interacciones Van der Waals. Con el objetivo de modular este tipo de interacciones, nos planteamos la preparación de **ésteres aromáticos con grupos activantes, desactivantes ó sistemas conjugados**, mediante reacción de **A17** y **A18** con el ácido benzoico, 4-metoxibenzoico, 4-bromobenzoico y 4-nitrobenzoico, tal como se indican en la Fig. 3.60. Así, tratamiento de **A17** con cloruro de benzoílo, DMAP y Et₃N en CH₂Cl₂, rindió los derivados **19a** y **20a**.

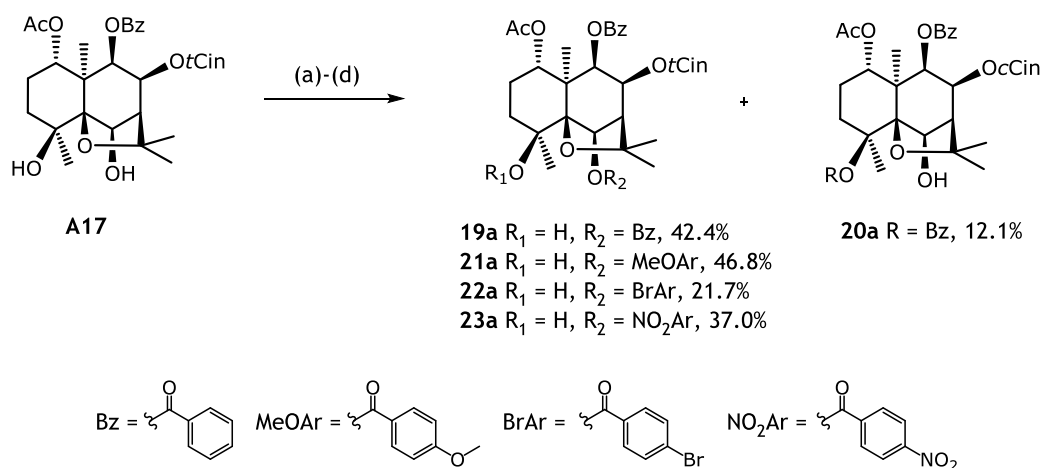


Fig. 3.60 | Preparación de los derivados 19a–23a. Condiciones de reacción: (a) DMAP, Et₃N, CH₂Cl₂, Ar, 0 °C, 1h. (b) Et₃N, DMAP, CH₂Cl₂, t.a., Ar, 20 min. (c) Et₃N, DMAP, CH₂Cl₂, t.a., 21 h; imidazol, reflujo, 13 días; CHCl₃, reflujo, 24 h. (d) DMAP, py, 80 °C, Ar, 138 h, py, 80 °C, Ar, 138 h.

En el espectro de RMN de ¹H del derivado **19a** (Fig. 3.61) se observó, como características más destacadas, la presencia de las señales correspondientes a dos protones vinílicos (δ_H 5.69 y 6.90) con una constante de acoplamiento de $J = 12.5$ Hz, indicando una disposición *cis* del doble enlace del grupo *cis*-cinamato, así como señales asignables a cinco protones aromáticos a δ_H 7.48 (2H, t, $J = 7.8$ Hz), 7.59 (1H, t, $J = 7.1$ Hz) y 8.21 (2H, d, $J = 7.7$ Hz), correspondientes al grupo benzoato sobre el carbono C-6.

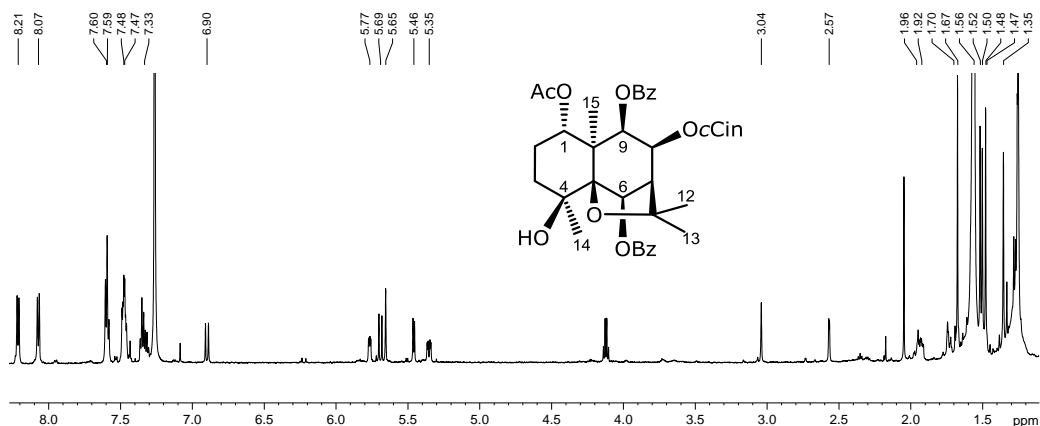


Fig. 3.61 | Espectro de RMN de ^1H del producto **20a** (CDCl_3 , 600 MHz).

Por otra parte, tratamiento de **A17** con cloruro de 4-metoxibenzoilo, rindió el derivado **21a**, análogo monoesterificado en C-6. El análisis de sus datos espectroscópicos de RMN de ^1H (Fig. 3.62) mostró una señal correspondiente a un grupo metoxilo a δ_{H} 3.86 (3H, s) y señales asignables a cuatro protones en la región aromática, a δ_{H} 6.95 (2H, d, $J = 8.8$ Hz) y δ_{H} 8.17 (2H, d, $J = 8.8$ Hz), correspondientes al grupo 4-metoxibenzoato. Estos datos fueron confirmados mediante experimentos de RMN de ^{13}C y RMN 2D (HSQC y HMBC).

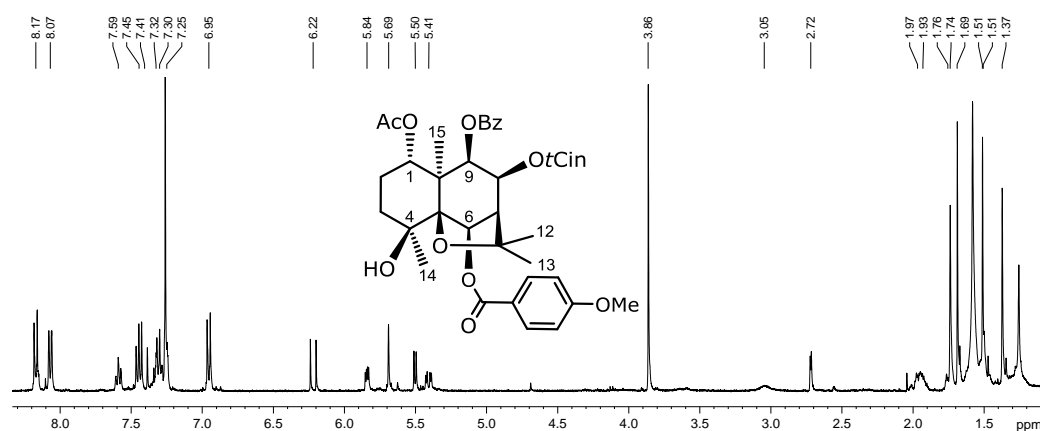


Fig. 3.62 | Espectro de RMN de ^1H del producto **21a** (CDCl_3 , 400 MHz).

Por otra parte, el intento de preparar ésteres de **A17** con ácido 4-cianobenzoico (PhMe, DMAP, Et_3N , DCC, imidazol, 90°C , 5 días), α -metoxifenilacético [preparación del anhídrido correspondiente con DCC, seguido por adición de piridina, DMAP, t.a. $\rightarrow 30^\circ\text{C}$ (14 h), PhMe, 90°C , 76 h)] y ácido sinápico [PhMe, DMAP, DCC, Et_3N , t.a. (2h), 90°C (211 h)], no rindió los derivados deseados.

Para evaluar la influencia de **grupos heteroaromáticos, sistemas aromáticos extendidos y sistemas aromáticos policíclicos**, llevamos a cabo la reacción de **A17** con cloruro de 2-furoflo, 2-tiofencarbonilo, 3-tiofencarbonilo y naftoilo, así como con anhídrido 3-furoico y anhídrido *trans*-cinámico, obtenidos tras tratar el ácido carboxílico correspondiente con DCC en CH₂Cl₂, bajo las condiciones de reacción que se indican en la Fig. 3.63. Así, se obtuvieron los derivados **24a–29a** esterificados en C-6.

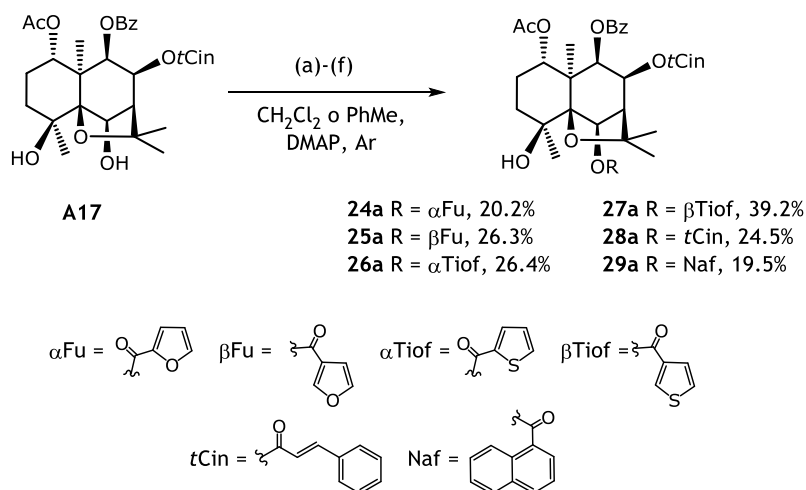


Fig. 3.63 | Esterificación del compuesto A17 con ácidos carboxílicos heteroaromáticos, sistemas aromáticos extendidos y policíclicos. Condiciones de reacción: (a) py, PhMe, 80 °C, 4 h. (b) Et₃N, PhMe, 60–80 °C, 48 h. (c) Et₃N, CH₂Cl₂, t.a., 20 min. (d) Et₃N, DCC, CH₂Cl₂, t.a., 26.5 h. (e) py, t.a., 18 h. (f) Et₃N, CH₂Cl₂, 0 °C→t.a., 3 h.

En su espectro de RMN de ¹H (Fig. 3.64), el derivado **26a** presentó como señales más características las correspondientes al grupo tiofeno-2-carboxilato [δ_H 7.13 (1H, t_A, *J* = 4.4 Hz), 7.61 (1H, d, *J* = 4.4 Hz) y 7.96 (1H, d, *J* = 3.6 Hz)] y el desplazamiento del protón H-6 de δ_H 4.53 en **A17** a δ_H 5.70 en **26a**.

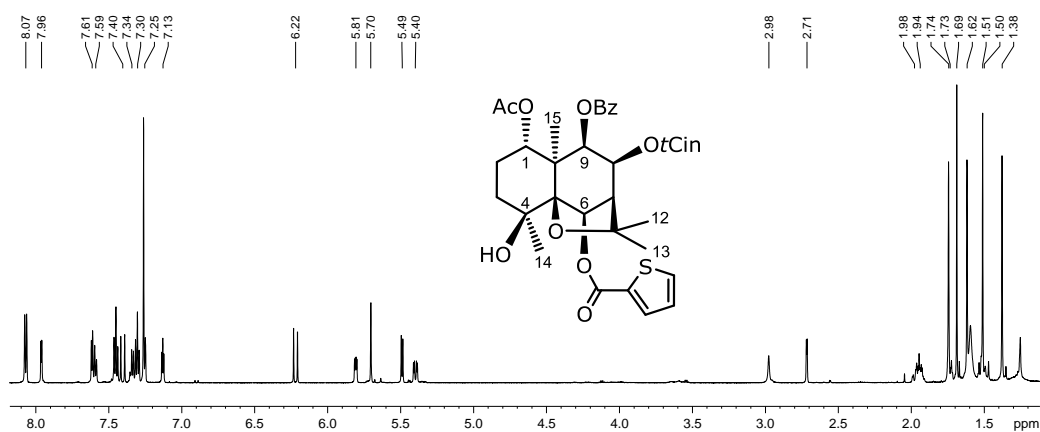


Fig. 3.64 | Espectro de RMN de ¹H del producto **26a** (CDCl₃, 600 MHz).

La siguiente estrategia que nos planteamos fue **preparar ésteres con análogos de ácidos carboxílicos**, incluyendo el cloruro de *N,N*-dimetilcarbamiló, cloruro de metilsulfónico y cloruro de *p*-toluensulfónico (Fig. 3.66).

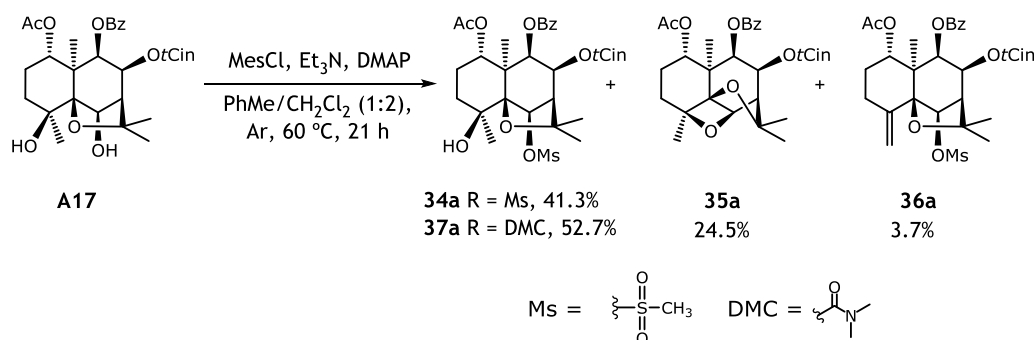


Fig. 3.66 | Preparación de los análogos **34a–37a** obtenidos por tratamiento de **A17** con cloruro de metilsulfónico y cloruro de *N,N*-dimetilcarbamoilo.

Así, al tratar **A17** con cloruro de carbamoilo, se obtuvo como único producto de reacción el monoéster en C-6 (**37a**). Cabe destacar que, al tratar **A17** con cloruro de metilsulfónico se obtuvieron tres productos de reacción: los monoésteres del alcohol secundario sobre C-6 (**34a**), el compuesto monoesterificado en C-6 y doble enlace exocíclico $\Delta^4(14)$ (**36a**), así como el derivado **35a** que presentó un característico anillo de oxetano (Fig. 3.66). Sin embargo, en la reacción de **A17** con cloruro de *p*-toluensulfónico se recuperó el producto de partida, sin detectarse producto de reacción.

El derivado **34a**, en su espectro de RMN de ^1H (Fig. 3.67), presentó como principales diferencias con el espectro del producto de partida **A17**, el desplazamiento de H-6 de δ_{H} 4.53 (1H, s) a δ_{H} 5.36 (1H, s), así como la presencia de tres protones correspondientes al grupo mesilo a δ_{H} 3.13 (s). La estructura propuesta fue confirmada por análisis de su espectro RMN de ^{13}C y experimentos bidimensionales.

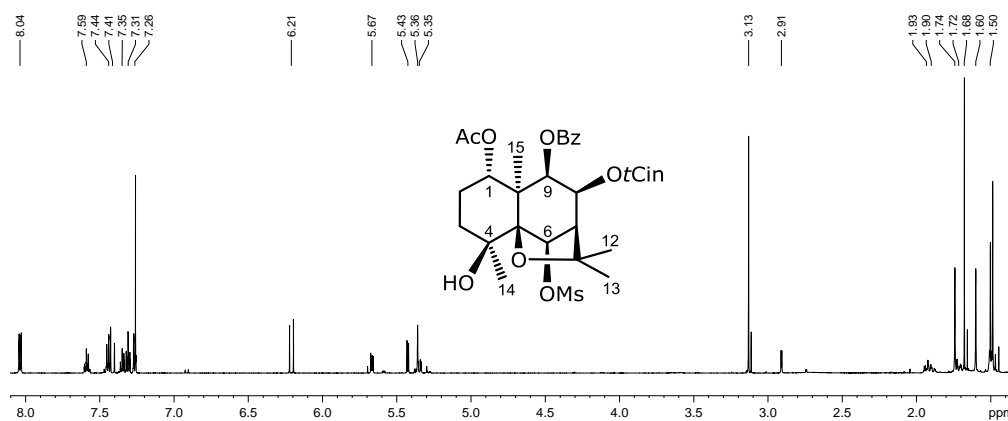


Fig. 3.67 | Espectro de RMN de ^1H del derivado **34a** (CDCl_3 , 600 MHz).

El derivado que hemos denominado **35a** presentó una fórmula molecular de $C_{33}H_{36}O_8$, basándonos en los datos obtenidos mediante espectrometría de masas de alta resolución, indicando una pérdida de agua y un grado de insaturación más que el producto de partida **A17**, datos que fueron confirmados mediante el análisis de experimentos de RMN 1D (1H y ^{13}C , DEPT90, DEPT135) y 2D (HMBC, HSQC, ROESY).

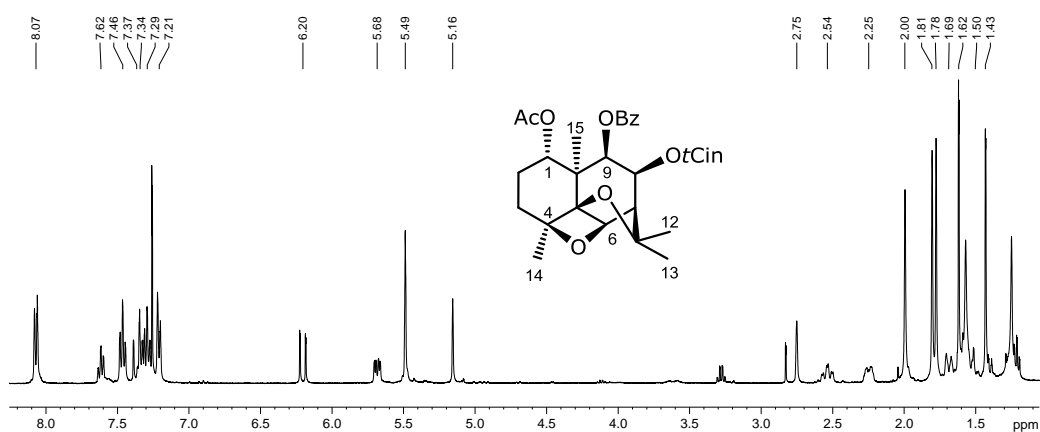


Fig. 3.68 | Espectro de RMN de 1H del derivado **35a** ($CDCl_3$, 400 MHz).

Así, en su espectro de 1H (Fig. 3.68), se observaron como principales diferencias con el de **A17**, la ausencia de las señales asignadas a los grupos hidroxilos sobre C-4 y C-6 (δ_H 3.22, δ_H 5.10, respectivamente) y el desplazamiento de los protones H-2 β , H-3 β , H-6 y Me-14 a campo más bajo [δ_H 2.25 (1H, m, H-2 β), 2.54 (1H, dt, J = 4.4, 13.6 Hz, H-3 β), 5.16 (1H, s, H-6) y 2.00 (3H, s, Me-14)]. Las características estructurales del óxido 1,3-propileno (oxetano) se establecieron mediante las correlaciones observadas en los experimentos 2D de RMN. Así, en un experimento ROESY, se observó como correlaciones espaciales más significativas NOE del Me-15 con H-2 β , H-6 y Me-14. El conjunto de estos datos nos confirmó la estructura propuesta para el derivado **35a**.

En la actualidad, casi un tercio de los **fármacos** que encontramos en el mercado **contienen átomos de halógeno**, implicados en efectos estéricos, electrónicos e hidrofóbicos. El fluor, por ejemplo, debido a su fuerte electronegatividad, es un sustituyente muy pequeño capaz de bloquear posiciones en la molécula susceptibles de ser metabolizados. El cloro se considera un bioisómero de numerosos grupos de interés en el diseño de fármacos, incluyendo $-CF_3$, $-CN$ o $-N_2$, SCN , SCF_3 , SO_2CF_3 y $CH=CF_2$. Por otra parte, sustituyentes con bromo pueden provocar la formación de intermedios alquilantes reactivos que generan toxicidad⁸⁹.

⁸⁹ Wermuth, C. G. (2008). *The Practice of Medicinal Chemistry*. (3^a ed.) London, San Diego: Elsevier.

Con estos antecedentes, para evaluar el efecto de átomos de halógeno en la actividad biológica, así como obtener derivados que nos sirvan como producto de partida en pasos posteriores, nos planteamos la **preparación de ésteres halogenados** con diferentes longitudes de cadena o sistemas aromáticos a partir de los sesquiterpenos **A17** y **A18**, utilizando la metodología que se indica en la Fig. 3.69.

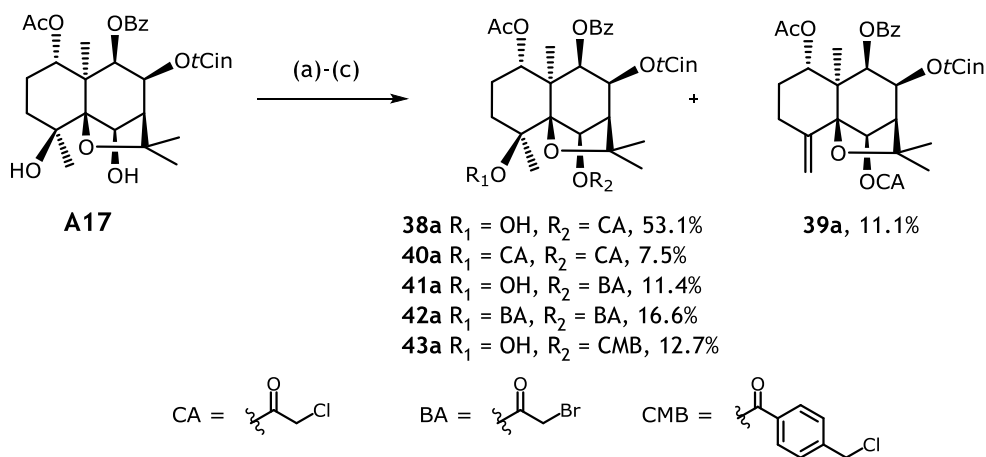


Fig. 3.69 | Esquema de la preparación de los derivados **38a-43a**. Condiciones de reacción (a) ZnCl_2 , CH_2Cl_2 , Ar, t.a., 14.5 h. (b) BACBr , Et_3N , DMAP, CH_2Cl_2 , 0 °C, Ar, 24 h. (c) ZnO , Et_3N , DMAP, CH_2Cl_2 , t.a., Ar, US, 2–5 min; NaCl .

El derivado **45a** se obtuvo por tratamiento de **A18** con cloruro de bromobutírico, bajo las condiciones indicadas anteriormente (Fig. 3.70), mientras que el intento de esterificar el sesquiterpeno **A17** en posición C-6 con cloruro de trifluoroacético, variando la temperatura (–25–40 °C) bajo las condiciones de reacción optimizadas o aplicando un método descrito por CREARY y KOCHLY⁹⁰, resultó en un producto que se descompuso en el transcurso de varios días, por lo que fue imposible confirmar su estructura o evaluar de su actividad biológica.

⁹⁰ CREARY, X.; KOCHLY, E. D. (2009). γ -Silyl cyclobutyl carbocations. *J. Org. Chem.*, 74, 9044–9053.

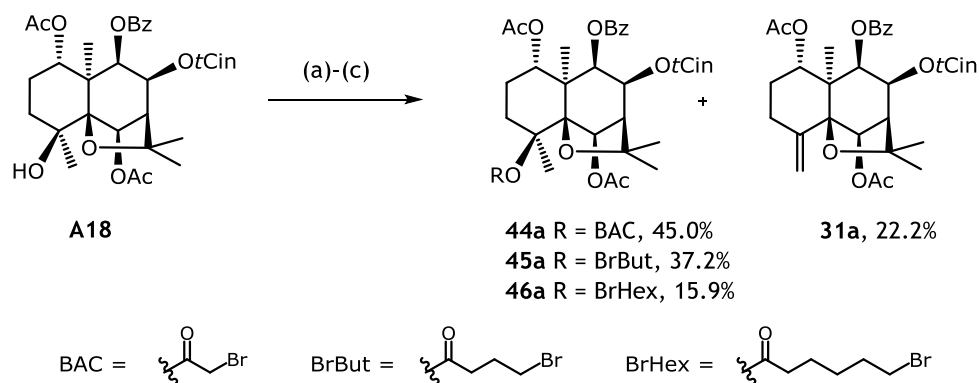


Fig. 3.70 | Preparación de los derivados **44a–46a** con bromuro de bromoacético, cloruro de bromobutanoílo y cloruro de bromohexanoílo. Condiciones de reacción: (a) ZnO, t.a., US, 5 min; Et₃N, DMAP, CH₂Cl₂, 0 °C, Ar, US, 2–5 min. (b) ZnO, t.a., US, 2–5 min; CH₂Cl₂, 0 °C, Ar, US, 2–5 min. (c) ZnO, t.a., US, 2–5 min; CH₂Cl₂, 0 °C, Ar, US, 2–5 min.

Para introducir ésteres que contengan átomos de halógeno en posición C-4 del esqueleto sesquiterpénico, se trató **A18** con bromuro de bromoacético, cloruro de bromobutirilo y cloruro de bromohexanoílo, rindiendo los derivados **44a–46a**. Así, por ejemplo, se optimizaron las condiciones de reacción para la reacción de **A18** con bromuro de bromoacético (Tabla 3.7), siendo la más exitosa el tratamiento con ZnO a temperatura ambiente en CH₂Cl₂ con ultrasonido (US).

Tabla 3.7 | Condiciones de reacción y productos obtenidos para optimizar la esterificación de **A18** con cloruro de benzoílo.

Acilante	Condiciones de reacción (a)	Productos (% de rendimiento)
BACBr	90.0 eq. CH ₂ Cl ₂ , py, 17.5 h	44a (6.8%)
	718.0 eq. CH ₂ Cl ₂ , Et ₃ N, 2.3 h	44a (10.7%)
	58.9 eq. py, 0 °C→t.a., 17 h 40 min	44a (20.1%)
	127.6 eq. CH ₂ Cl ₂ , py, 0 °C→t.a., 6 h 30 min	44a (32.1%)
	24.7 eq. CH ₂ Cl ₂ , ZnO, ultrasonido, t.a., 6 min	31a (36.5%), 44a (30.8%)
	25.0 eq. CH ₂ Cl ₂ , ZnO, ultrasonido, 0 °C, 6 min	44a (42.6%)
	23.4 eq. ZnO, ultrasonido, t.a., 3 min; CH ₂ Cl ₂ , 0 °C, ultrasonido, 5 min	44a (53.5%)

Por otra parte, reacción de **A18** con cloruro de 4-bromobutirilo rindió el derivado **45a** con un rendimiento de 37.2%, además del producto **31a** (22.2% de rendimiento) que se había obtenido anteriormente. Sin embargo, cuando intentamos la preparación de ésteres con anhídrido de cloroacético o anhídrido de bromometilbenzoico formado *in situ* con DCC, siguiendo la misma metodología, no se obtuvieron los productos deseados.

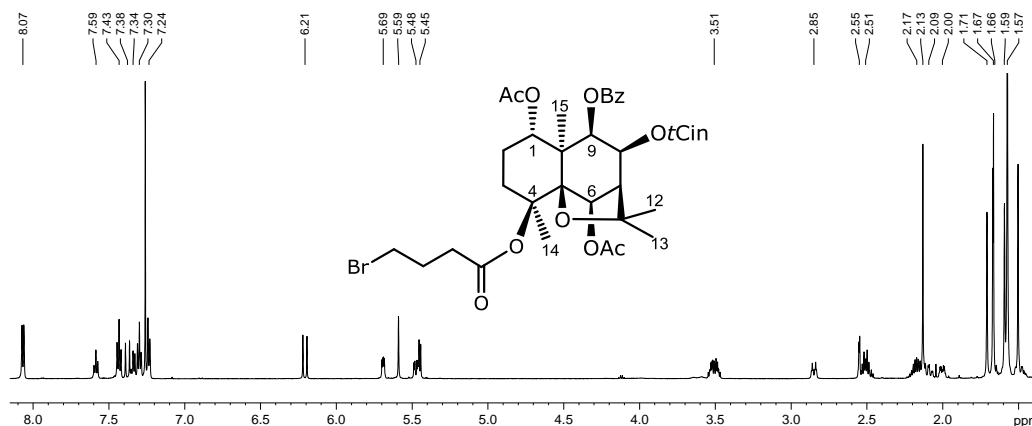


Fig. 3.71 | Espectro de RMN de ^1H del producto **45a** (CDCl_3 , 600 MHz).

En el espectro de ^1H de RMN del derivado **45a** (Fig. 3.71), se observó la desaparición de la señal asignable al grupo hidroxilo en C-4, así como el desplazamiento de la señal correspondiente al protón H-3 α a campo más bajo, de δ_{H} 1.70 en **A18** a δ_{H} 2.85 (1H, td, $J = 3.4, 13.6$ Hz) en **45a**, y la presencia de señales a δ_{H} 2.17 (2H, m), 2.51 (2H, m), 3.51 (2H, m), correspondientes a los tres metilenos del grupo bromobutirato.

La introducción de **funciones ácidas mediante la preparación de carboxiésteres** favorece varios aspectos de la bioactividad de un compuesto. Así, conlleva a un aumento de la solubilidad, mejorando de esta manera su biodisponibilidad. En moléculas en las cuales la aportación de un grupo carboxílico a la estructura es pequeña, su introducción puede reducir la toxicidad, como en el caso de los antibióticos β -lactámicos⁸⁹. Sin embargo, existe la posibilidad de que el grupo carboxílico interactúa con funciones básicas, como son residuos de aminoácidos básicos y, además, a pH fisiológico, se encuentra desprotonado, disminuyendo la posibilidad del compuesto de atravesar las membranas biológicas, lo que favorece la eliminación rápida del organismo.

Para evaluar el efecto de los carboxiésteres y con el objetivo de preparar productos de partida para posteriores pasos de reacción, nos planteamos la introducción de varios grupos diácidos en los sesquiterpenos **A17** y **A18** utilizando como reactivos el anhídrido succínico o el anhídrido glutárico, así como cloruro de tereftaloílo o isoftaloílo. Con tal fin, se optimizó la reacción de **A17** con anhídrido glutámico, tal como se indica en la Tabla 3.8.

Tabla 3.8 | Optimización de las condiciones de reacción y los correspondientes rendimientos (en paréntesis) de la reacción de **A17** con anhídrido glutárico.

Equivalentes de anhídrido glutárico	Condiciones de reacción	Productos (% de rendimiento)
5.7 eq.	PhMe, DMAP, 105 °C, 113 h	48a (20.5%)
11.4 eq.	2,6-lutidina, 105 °C, 125 h	48a (26.9%)
11.4 eq.	Tf ₃ Sc, DMAP, t.a., CH ₂ Cl ₂ , 19 h; AcCN, Et ₃ N, reflujo, 11 días	48a (35.9%)
12.9 eq.	2,6-lutidina, DMAP, 100 °C, 18.5 h	48a (80.8%)

El mejor resultado nos dio una modificación del método reportado por NWANNE y col.⁸⁵, usando 2,6-lutidina, lo que rindió el compuesto monoesterificado en C-6, **48a**. Siguiendo esta metodología, se prepararon derivados con anhídrido succínico, cloruro de tereftaloílo y cloruro isoftaloílo, rindiendo los análogos **47a**, **49a** y **50a** (Fig. 3.72). Sin embargo, reacción de **A17** con anhídrido maleico en las mismas condiciones, no dio resultado, y tratamiento de una disolución de **21a** en 2,6-lutidina con anhídrido succínico y DMAP, a 100 °C y bajo atmósfera de argón durante 139 h, rindió una cantidad insuficiente de producto para su elucidación.

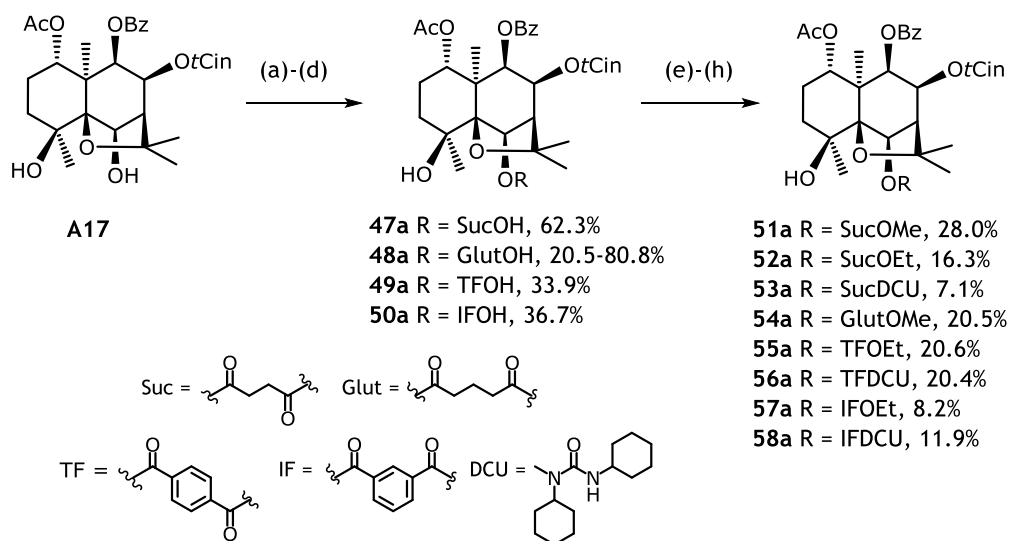


Fig. 3.72 | Esquema de preparación de carboxiésteres **47a–50a**, a partir de **A17** y su posterior esterificación con MeOH y EtOH para dar los análogos **51a–58a**. Condiciones de reacción: (a) DMAP, 2,6-lutidina, 110 °C, 4h. (b) DMAP, 2,6-lutidina, 100 °C, 18.5h. (c) Et₃N, DMAP, PhMe, t.a., 120 h. (d) Et₃N, DMAP, PhMe, t.a., 120 h. (e) MeOH, DMAP, DCC, CH₂Cl₂, 0 °C→t.a., Ar, 3h. (f) EtOH, Et₃N, DMAP, DCC, CH₂Cl₂, t.a., Ar, 71.5 h. (g) MeOH, DMAP, DCC, CH₂Cl₂, 0 °C→t.a., Ar, 6h. (h) EtOH, Et₃N, DMAP, DCC, CH₂Cl₂, t.a., Ar, 24 h.

En su espectro de RMN de ^1H (Fig. 3.73), el compuesto **48a** presentó como características principales la desaparición de la señal asignable al hidroxilo OH-6 (δ_{H} 5.10 en **A17**), el desplazamiento del protón H-6 a campo más bajo (de δ_{H} 4.53 en **A17** a δ_{H} 5.62 en **48a**), así como la presencia de señales asignables a tres metilenos correspondientes al grupo glutárico [δ_{H} 2.01 (2H, t, $J = 7.2$ Hz) y 2.47 (4H, m)]. Estos datos fueron confirmados mediante el análisis de experimentos de RMN mono- y bidimensionales.

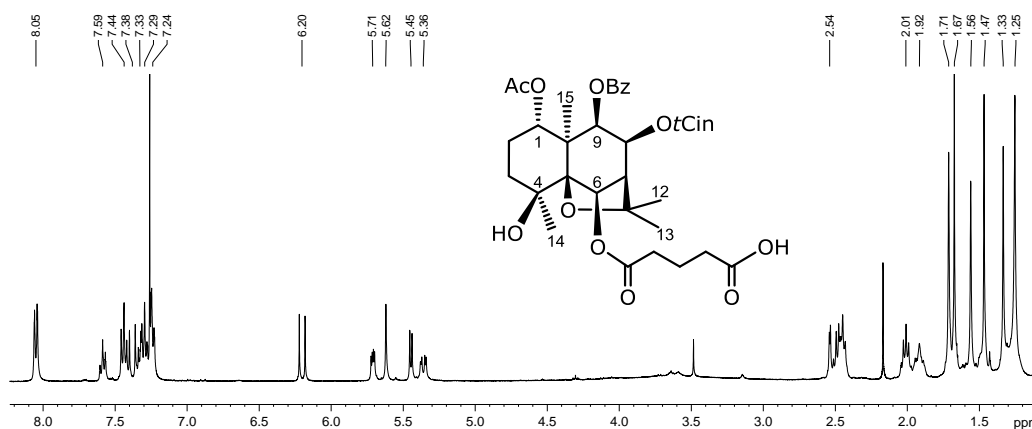


Fig. 3.73 | Espectro de RMN de ^1H del producto **48a** (CDCl_3 , 600 MHz).

Por otra parte, se intentó introducir grupos diácidos en la posición C-4 a partir de **A18**, empleando la metodología usada para la preparación de los derivados **47a–50a**, modificando tiempo de reacción, temperatura o fundiendo el ácido carboxílico, en el caso del ácido tereftálico, para llevar a cabo la esterificación con ZnO. Sin embargo, ninguna de las reacciones dio lugar a los derivados esperados, y se obtuvo como único producto el derivado **31a**, producto de la eliminación del hidroxilo en posición C-4.

Un hecho reconocido en Química Médica es que, la **introducción de ácidos carboxílicos libres** en un *cabeza de serie* reduce la actividad biológica, actividad que puede recuperarse al esterificar dicho grupo. Por ello y con la idea de disponer de un mayor número de compuestos para llevar a cabo los estudios SAR, nos planteamos la esterificación del ácido carboxílico de los análogos preparados, con diferentes alcoholes.

Así, por ejemplo, se llevó a cabo la esterificación de **50a** con DCC, DMAP, Et_3N y EtOH en CH_2Cl_2 , obteniéndose los derivados **57a** y **58a**. El derivado **57a** presentó, como principal diferencia en su espectro de RMN de ^1H con respecto al producto de partida, la presencia de señales a δ_{H} 1.41 (3H, t, $J = 7.1$ Hz) y 4.41 (2H, c, $J = 7.1$ Hz), asignables a un grupo etoxilo.

El espectro de masas de baja resolución del derivado **58a**, producto minoritario en la transformación del **50a**, presentó un ión molecular a m/z 955.4321 y una fórmula molecular de $C_{54}H_{64}N_2O_{12}$, determinada por espectrometría de masas de alta resolución. En su espectro de RMN de 1H (Fig. 3.74) se observó como principal diferencia, con respecto al producto de partida, señales asignables a una *N*-acil urea [δ_H 1.00–1.41 (8H, m), 1.44–1.89 (12H), 3.47 (1H, m), 4.06 (1H, t_a , $J = 11.4$ Hz), 6.41 (1H, s_a)], datos que fueron confirmados mediante RMN de ^{13}C y experimentos bidimensionales, que están de acuerdo con la estructura propuesta de un derivado de la *N*-acil urea.

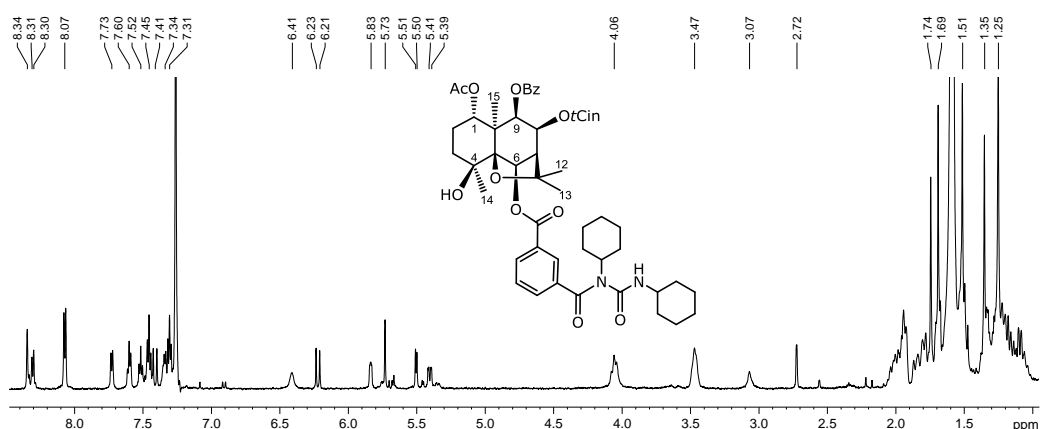


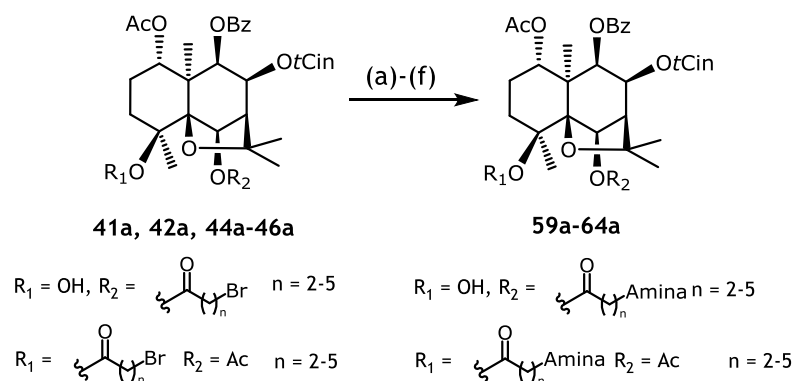
Fig. 3.74 | Espectro de RMN de 1H del producto **58a** ($CDCl_3$, 600 MHz).

En Química Médica, los **grupos básicos** son representados por aminas, amidas o, en general, compuestos heterocíclicos que contienen átomos de nitrógeno. Los grupos básicos confieren polaridad, por lo que presentan características de solubilidad y biodisponibilidad similares a los grupos ácidos carboxílicos. Así, la introducción de un grupo básico en una molécula aumenta su solubilidad en agua, aumentado incluso por la formación de sales⁸¹.

Muchas veces, la introducción de **aminas y heterociclos básicos** aumenta considerablemente la actividad de un compuesto, siendo las aminas primarias menos específicas que las secundarias o terciarias. Por otra parte, las diaminas y poliaminas, en general, confieren mayor actividad que un único grupo amino. En comparación, las aminas aromáticas, tienden a formar metabolitos tóxicos, lo que se puede evitar introduciendo grupos carboxílicos⁸⁹. Otro aspecto relevante es que, en trabajos anteriores, se ha reportado que compuestos con aminas terciarias aumentan la actividad revertidora de la MDR⁹¹.

⁹¹ PALMEIRA, A.; SOUSA, E.; VASCONCELOS, M. H.; PINTO, M.; FERNANDES, M. X. (2012). Structure and ligand-based design of P-glycoprotein inhibitors: a historical perspective. *Curr. Pharm. Design.*, 18(27), 4197–4214.

Así, para evaluar la influencia de tales grupos funcionales en la actividad revertidora de la MDR de los sesquiterpenos, se prepararon aminoésteres con aminas secundarias y terciarias de distintas longitudes de cadena, siguiendo la metodología reportada por NOZAWA y col.⁹² y PARK y col.⁹³. Así, tratamiento de **41a** con morfolina, bajo las condiciones indicadas en la Fig. 3.75, rindió el derivado **63a**.



PP	Amina	eq.	Condiciones de reacción (a)-(f)	Producto (% de rendimiento)
44a		35.8 eq.	CH ₂ Cl ₂ , Et ₃ N, t.a., 33 h	59a (9.8%)
41a		15.6 eq.	CH ₂ Cl ₂ , Et ₃ N, t.a., 22 h	60a (4.1%)
42a		35.7 eq.	CH ₂ Cl ₂ , Et ₃ N, t.a., 30 h	n.r.
44a		20.1 eq.	CH ₂ Cl ₂ , Et ₃ N, t.a., 27 h 20 min	61a (17.2%)
45a		30.7 eq.	CH ₂ Cl ₂ , Et ₃ N, t.a., 74 h	n.r.
46a		47.8 eq.	CH ₂ Cl ₂ , Et ₃ N, t.a., 24 h	n.r. ^a
43a		27.2 eq.	CH ₂ Cl ₂ , Et ₃ N, t.a., 30 h	62a (39.8%)
44a		53.2 eq.	CH ₂ Cl ₂ , Et ₃ N, t.a., 30 h	63a (52.1%)
41a		22.0 eq.	CH ₂ Cl ₂ , py, 0 °C→t.a., 20 min	n.r. ^a
44a		16.7 eq.	CH ₂ Cl ₂ , Et ₃ N, t.a., 24 h	64a (17.9%)
43a		6.9 eq.	CH ₂ Cl ₂ , Et ₃ N, t.a., 27 h 15 min	n.r.

Fig. 3.75 | Condiciones de reacción en la preparación de los derivados **59a–64a**. ^ase perdió en el proceso de purificación. n.r.: no reaccionó.

⁹² NOZAWA, D.; OKUBO, T.; ISHII, T.; KAKINUMA, H.; CHAKI, S.; OKUYAMA, S.; NAKAZATO, A. (2007). Structure-activity relationships of novel piperazines as antagonists for the melanocortin-4 receptor. *Bioorg. Med. Chem.*, 15, 1989–2005.

⁹³ PARK, H. J.; CHOI, J. K.; LEE, E.; LEE, J. K.; RHIM, H.; SEO, S. H.; KIM, Y.; DODDAREDDY, M. R.; PAE, A. N.; KANG, J.; ROH, E. J. (2007). Lead discovery and optimization of T-type calcium channel blockers. *Bioorg. Med. Chem.*, 15, 1409–1419.

En el espectro de RMN de ^1H (Fig. 3.76) y ^{13}C del derivado **63a**, se observó como diferencias más significativas con respecto al producto de partida **44a** el desplazamiento de las señales correspondientes al metilénico en posición α al carbonilo a δ_{H} 3.77, 3.80 (2H, d_{AB} , $J = 11.3$ Hz) y δ_{C} 27.5 (t) a δ_{H} 3.08, 3.22 (2H, d_{AB} , $J = 16.9$ Hz) y δ_{C} 60.4 (t), así como la presencia de cuatro señales asignables a los metilenos correspondientes a la morfolina [δ_{H} 2.59 (4H, m), 3.08, 3.22 (2H, d_{AB} , $J = 16.9$ Hz), y 3.78 (4H, m)].

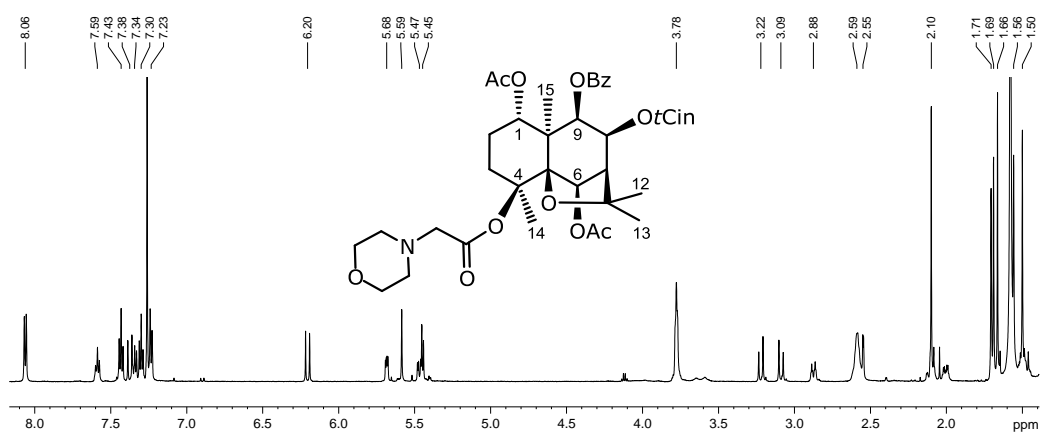


Fig. 3.76 | Espectro de RMN de ^1H del derivado **63a** (600 MHz, CDCl_3).

Por otra parte, el análisis de experimentos de RMN bidimensionales (HSQC editado y HMBC, Fig. 3.77), nos confirmaron la estructura, observándose como correlaciones a larga distancia más significativas la del carbono metilénico en posición α al carbonilo con los metilenos del anillo de morfolina y el carbono cuaternario del éster en C-4.

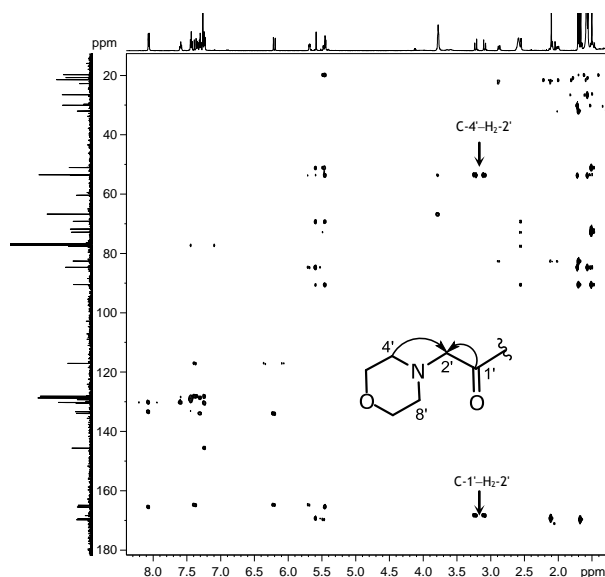


Fig. 3.77 | Espectro de RMN de HMBC del derivado **63a** (600 MHz, CDCl_3).

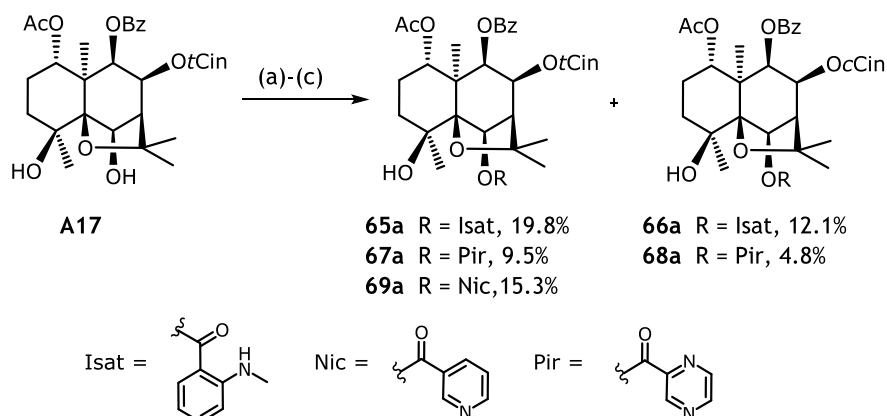


Fig. 3.78 | Esquema de preparación de los derivados 65a–69a a partir del sesquiterpeno A17. Condiciones de reacción: (a) 2,6-lutidina, DMAP, PhMe, t.a.→110°, Ar, 19 h. (b) Et₃N, DMAP, CH₂Cl₂, t.a., Ar, 6 h 50 min. (c) 2,6-lutidina, DMAP, DCC, PhMe, Ar, 110 °C, 94 h; t.a., 26 h.

Siguiendo la misma metodología, nos planteamos la introducción de sistemas tanto de arilamina (**65a** y **66a**), tanto heteroaromáticos que contengan átomos de nitrógeno (**67a–69a**), en posición C-6 del metabolito **A17**. La metodología empleada en cada caso, así como las condiciones de reacción y los productos correspondientes obtenidos, se indican en la Fig. 3.78. Sin embargo, cuando se intentó el tratamiento de **A18** con anhídrido isatoico [condiciones de reacción: py, DMAP, ZnCl₂, t.a. (3 h), 80 °C (24 h)] no se obtuvo el resultado esperado.

III. Preparación de análogos clorados

Además del efecto debido a enlaces de hidrógeno, los halógenos pueden cambiar y potenciar la actividad biológica de una molécula por sus efectos estéricos, electrónicos e hidrofóbicos. Por otra parte, un halógeno aumenta la lipofilia de un compuesto, aumentando su capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica⁸⁹.

Basándonos en estas consideraciones, se llevó a cabo la cloración de **A17**, siguiendo dos metodologías diferentes, utilizando trifenilfosfina^{94,95} o bien cloruro de tionilo⁹⁶. La

⁹⁴ PLUEMPANUPAT W., CHAVASIRI, W. (2006). An efficient method for chlorination of alcohols using PPh₃/Cl₃CCONH₂. *Tetrahedron Lett.*, 47, 6821–6823.

⁹⁵ BLENCOWE, A.; CELLI, A. M.; DONATI, D.; HAYES, W. C.; MARTIN, C.; MURPHY, P. J.; PONTICELLI, F.; MELVILLE-RICHARDS, J. K. (2009). Synthesis and photoreactivity of aryl substituted 4,5-dithienyl[1,3]dithiol-2-ones. *Tetrahedron*, 65(19), 3858–3862.

⁹⁶ FLORES-PARRA, A.; SUÁREZ-MORENO, P.; SÁNCHEZ-RUÍZ, S. A.; TLAHUEXTL, M.; JAEN-GASPAR, J.; TLAHUEXT, H.; SALAS-CORONADO, R.; CRUZ, A.; NÖTH, H.; CONTRERAS, R. (1998). Chlorination reactions of ephedrines revisited. Stereochemistry and functional groups effect on the reaction mechanisms. *Tetrahedron: Asymm.*, 9, 1661-1671.

segunda estrategia rindió el análogo clorado en C-4 y C-6 **70a** y el producto **71a**, resultado de la eliminación del grupo hidroxilo en C-4 (Fig. 3.79).

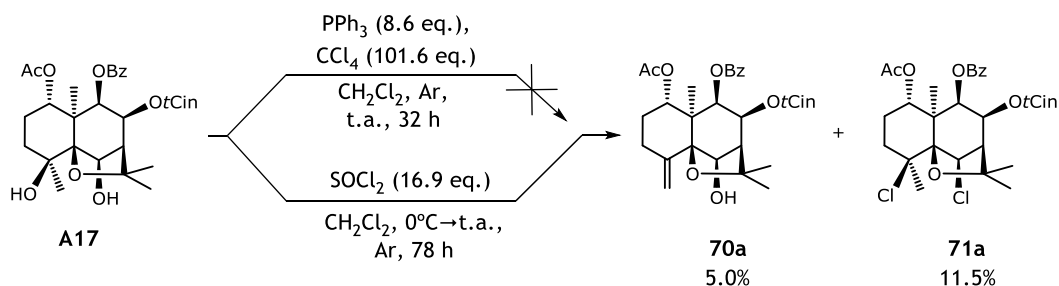


Fig. 3.79 | Cloración del compuesto A17 rindiendo los productos **70a** y **71a**.

El derivado **71a** presentó una fórmula molecular de $C_{33}H_{36}Cl_2O_7$, determinada por espectrometría de masas de alta resolución y espectroscopía de RMN de 1H y ^{13}C . En su espectro de RMN de 1H (Fig. 3.80), se observaron como principales diferencias, al compararlo con el espectro de **A17**, la desaparición de las señales correspondientes a los hidroxilos sobre los carbonos C-4 y C-6, así como el desplazamiento del protón H-6 a campo más bajo a δ_H 5.11 (1H, s).

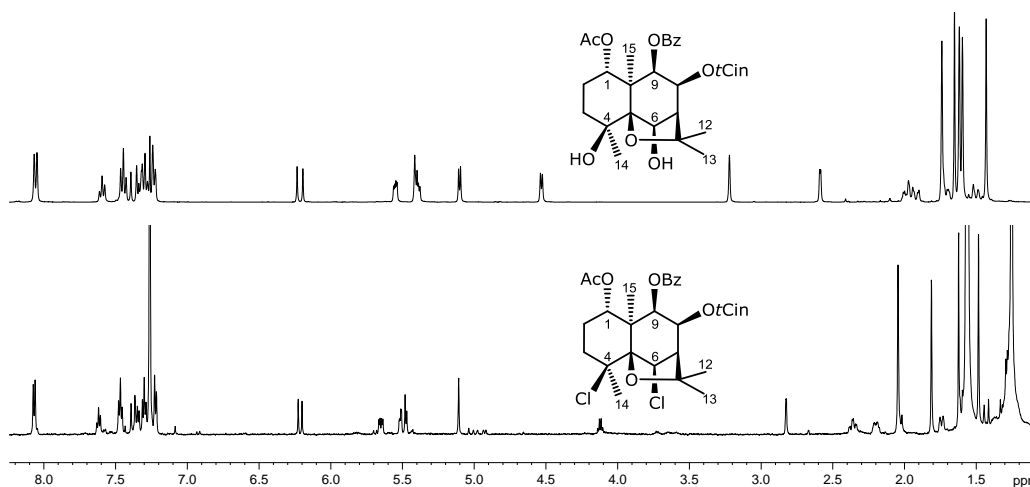


Fig. 3.80 | Espectros de RMN de 1H del producto de partida **A17** ($CDCl_3$, 400 MHz, arriba) y su derivado **71a** ($CDCl_3$, 600 MHz, abajo).

La estructura se confirmó mediante el análisis de experimentos de RMN bidimensionales, destacando la correlación espacial entre H-6, Me-14 y Me-15 observada en un experimento ROESY, lo que nos permitió establecer la estereoquímica relativa del H-6 y del Me-14 como α del derivado **71a**.

C | Funcionalización del carbono C-3

Para evaluar el efecto en la actividad biológica resultado de la introducción de un sustituyente en posiciones no funcionalizadas del esqueleto agarofuránico, nos planteamos la por introducción de un grupo acetato en la posición alílica del derivado **31a** por tratamiento con dióxido de selenio, ácido acético glacial y anhídrido acético, siguiendo la metodología propuesta por KRASNOSLOBODTSEVA y *col.*⁹⁷ Sin embargo, sólo obtuvimos el 3-hidroilderivado, **72a** (Fig. 3.81) en un bajo rendimiento.

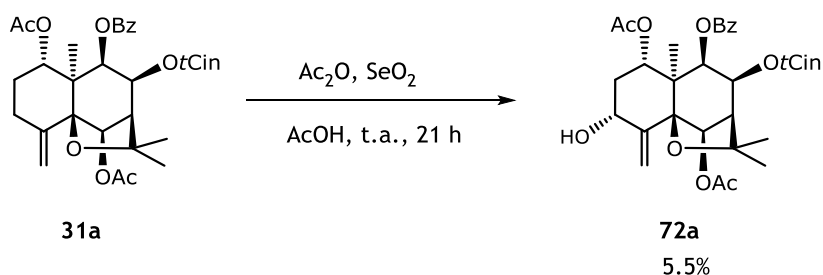


Fig. 3.81 | Oxidación alílica del compuesto **31a** con SeO_2 .

En los espectros de RMN de ^1H (Fig. 3.82) y de ^{13}C del compuesto **31a**, se observaron como señales más significativas, con los espectros del producto de partida, la ausencia de las señales asignadas al metileno situado sobre C-3 [δ_{H} 2.17 (1H, señal solapada, H-3 α) y 2.72 (1H, dt, $J = 4.4, 13.5$ Hz, H-3 β) y la presencia de un protón hidroximetínico (δ_{H} 4.32 (1H, td, $J = 2.9, 9.4$ Hz, H-3 β) y 4.51 (1H, d, $J = 9.4$ Hz, OH-3), δ_{C} 74.9 d, C-3) correspondiente a un alcohol secundario.

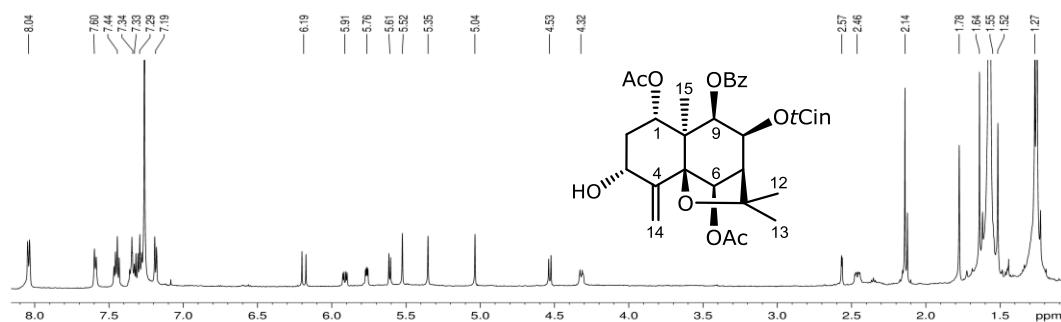


Fig. 3.82 | Espectro de RMN de ^1H del producto **72a** (CDCl_3 , 400 MHz).

⁹⁷ KRASNOSLOBODTSEVA, O. Y.; VALEEV, F. A.; SHITIKOVA, O. V.; TOLSTIKOV, G. A. (2006). Inhibition of intramolecular reactions of (+)- δ -cadinol. *Russ. J. Org. Chem.*, 42(9), 1321–1324.

El estudio de experimentos bidimensionales de RMN nos permitió confirmar y establecer de forma inequívoca la estructura del compuesto. Así, en un experimento HMBC, se observaron como correlación a larga distancia más significativa la de los protones H₂-14, a δ_H 5.04 (1H, s) y 5.35 (1H, s), con el carbono metínico C-3 a δ_C 74.9, así como NOE entre H-3α y H-1α observado en un experimento NOESY-1D, lo que sitúa el grupo hidroxilo en posición β.

D | Hidrogenación de dobles enlaces

Con el objetivo de evaluar la participación de interacciones tipo Van der Waals en la actividad revertidora de los sesquiterpenos, nos propusimos la reducción del sistema α,β-insaturado del grupo cinamato y/o del doble enlace Δ⁴⁽¹⁴⁾ de **A17** y **31a**. Así, hidrogenación de **A17** y de **31a** en presencia de paladio sobre carbón activo, rindió los productos **73a** y **74a** (Fig. 3.83), respectivamente.

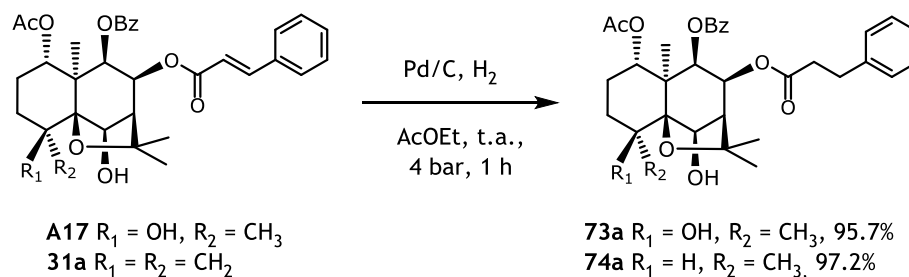


Fig. 3.83 | Hidrogenación del Δ⁴⁽¹⁴⁾ y del sistema α,β-insaturado del grupo cinamato a ácido feniletilcarboxílico en los compuestos **A17** y **31a** para dar los derivados **73a** y **74a**, respectivamente.

En el espectro de RMN de ¹H del compuesto **73a** (Fig. 3.84), se observaron como diferencias más significativas con el producto de partida, la desaparición de las señales correspondientes a los protones olefinicos del éster *trans*-cinámico. Asimismo, se

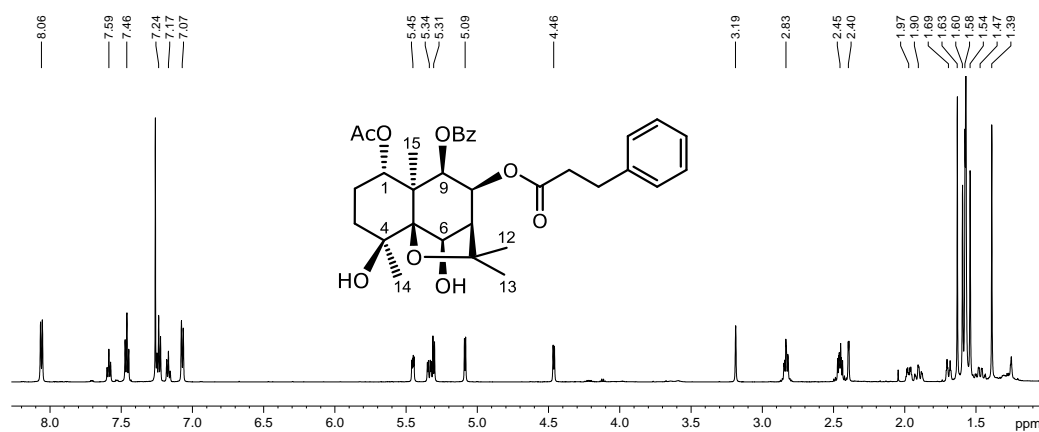


Fig. 3.84 | Espectro de RMN de ¹H del producto **73a** (CDCl₃, 600 MHz).

observó la presencia de dos metilenos a δ_H 2.45 (2H, m), 2.83 (2H, m) y el desplazamiento de los protones aromáticos del grupo cinamato a δ_H 7.07 (2H, d, $J = 7.4$ Hz), 7.17 (1H, t, $J = 7.3$ Hz) y 7.24 (2H, t, $J = 7.7$ Hz), señales que están de acuerdo con una unidad de fenilpropanoico. En el espectro de RMN de 1H de **74a**, además de las características mencionadas para el derivado anterior **73a**, se observó la desaparición del doble enlace exocíclico $\Delta^4(14)$ presente en el producto de partida **21a** y la presencia de un metilo secundario a δ_H 0.99 (3H, d, $J = 7.5$ Hz, Me-14). La estereoquímica relativa se determinó mediante el análisis de la constante de acoplamiento y fue confirmada mediante un experimento 1D-NOESY. Así, al excitar selectivamente la señal asignada al Me-14, se observó NOE entre el Me-15 y el protón H-6, quedando fijada así la estereoquímica del carbono C-4.

E | Preparación de compuestos diméricos

Una estrategia reciente para aumentar la afinidad de un sustrato con su receptor es la formación de compuestos bi- o polivalentes, considerados *ligandos de alta afinidad* ("*high-affinity protein ligands*")⁹⁸. En trabajos anteriores se han descrito homodímeros de flavonoides y de alcaloides, capaces de revertir el fenómeno de la MDR, aumentando la actividad hasta 50 veces la actividad de los correspondientes monómeros^{99,100}.

Con estos antecedentes y teniendo en cuenta que la Pgp tiene una estructura de *pseudo*-dímero, nos planteamos la preparación de compuestos diméricos o triméricos de los sesquiterpenos objeto de nuestra investigación, con la idea de aumentar su potencia y selectividad¹⁰⁰. Este objetivo se llevó a cabo siguiendo dos diferentes estrategias: la **síntesis de homodímeros**, constituidos por dos unidades de un único sesquiterpeno, y la **síntesis de heterodímeros (híbridos)**, mediante la unión de una unidad de sesquiterpeno con una unidad de un producto natural de actividad revertidora de la MDR conocida, como son los flavonoides, curcuminoides, ácido ascórbico o carotenoides.

I. Homodímeros

Se llevó a cabo la síntesis de compuestos homodiméricos de los sesquiterpenos **A17** o **A18**, usando distintas metodologías. Tratamiento del sesquiterpeno **A17** en un único

⁹⁸ FAN, E.; ZHANG, Z.; MINKE, W. E.; HOU, Z.; VERLINDE C. L. M. J.; HOL, W. G. J. (2000). High-affinity pentavalent ligands of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin by modular structure-based design. *J. Am. Chem. Soc.*, 122, 2663–2664.

⁹⁹ CHAN, K.-F.; WONG, I. L. K.; KAN, J. W. Y.; YAN, C. S. W.; CHOW, L. M. C.; CHAN, T. H. (2012). Amine linked flavonoid dimers as modulators for P-glycoprotein-based multidrug resistance: structure-activity relationship and mechanism of action. *J. Med. Chem.*, 55, 1999–2014.

¹⁰⁰ PIRES, M. M., EMMERT, D.; HRYCINA C. A.; CHMIELEWSKI J. (2009). Inhibition of P-glycoprotein-mediated Paclitaxel Resistance by reversibly linked quinine homodimers. *Mol. Pharmacol.*, 75, 92–100.

paso, con cloruro de succinóilo o cloruro de glutaróilo, no obtuvimos resultado. Por otra parte, al tratar **A17** con anhídrido succínico rindió el derivado **47a**, pero el posterior acoplamiento con otra unidad de **A17**, tampoco dio los resultados esperados.

Se intentó entonces la preparación de dímeros del derivado **47a**, usando distintos polioles como espaciadores (Fig. 3.85). El uso de etanodiol como espaciador rindió el dímero **75a**, además de los derivados **76a** y **53a**, productos de la reacción de **47a** con etanodiol y diciclohexilurea, respectivamente, éste último descrito en reacciones anteriores. Cuando la misma reacción se llevó a cabo usando el *trans*-ciclohexanodiol como espaciador, únicamente obtuvimos el monómero **77a** y el producto de la reacción con la diciclohexilurea, **53a**. Otra alternativa para preparar un dímero de **47** fue usar glicerina como espaciador, incluyendo la posibilidad de sintetizar un compuesto trimérico, sin embargo, la reacción condujo a una mezcla compleja en poca cantidad que fue imposible de separar.

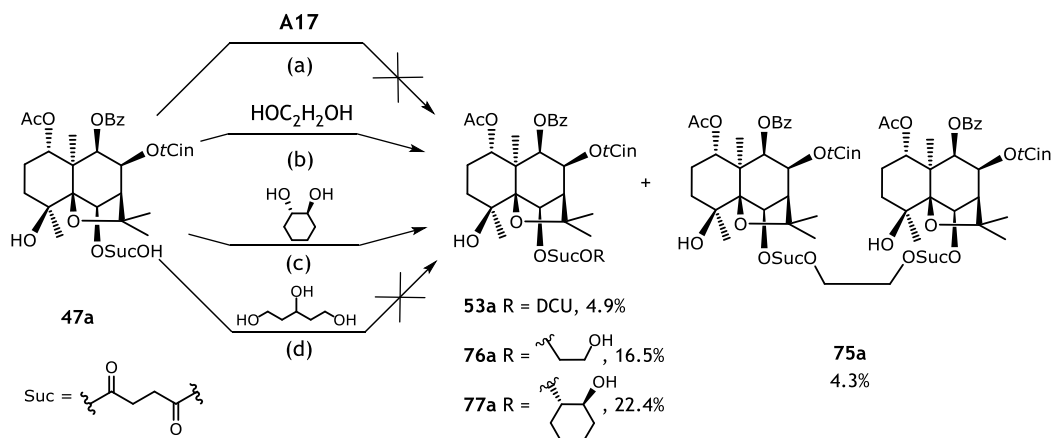


Fig. 3.85 | Preparación de homodímeros de A17 a partir del sesquiterpeno 47a.

Condiciones de reacción: (a) DMAP, DCC, CH_2Cl_2 , $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{t.a.}$, 3 h; (b) PhMe, DCC, DMAP, t.a., 23 h 15 min; (c) PhMe, DCC, DMAP, t.a., 29 h 30 min.

A modo de ejemplo, se describe la elucidación estructural del dímero **75a**, que presentó una fórmula molecular de $\text{C}_{76}\text{H}_{86}\text{O}_{24}$, determinada mediante masas de alta resolución, fórmula que está de acuerdo con dos unidades del compuesto de partida **47a** y una unidad de etilenglicol. Estos datos fueron confirmados mediante datos espectroscópicos de RMN de ^1H (Fig. 3.86) y ^{13}C , que presentan señales correspondientes de la mitad del espaciador, formado por succinato-etanodiol-succinato, dada la simetría de la molécula, con señales a δ_{H} 2.71 (4H), 4.30 (2H) y δ_{C} 28.6 (t), 29.5 (t), 62.4 (t), 171.3 (s) y 171.9 (s), además de las señales asignables a la unidad de sesquiterpeno.

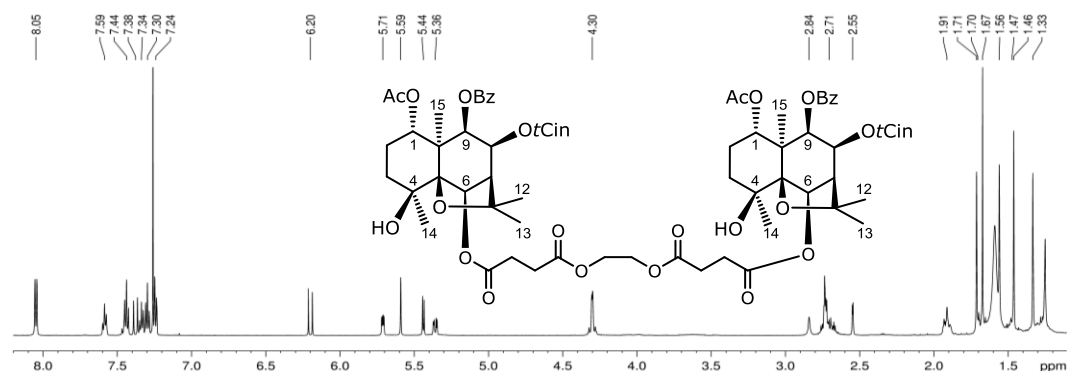


Fig. 3.86 | Espectro de RMN de ^1H del producto **75a** (CDCl_3 , 600 MHz).

Para la preparación de homodímeros de **A18**, se siguieron dos metodologías (Fig. 3.87). La primera de ellas fue la doble esterificación de **A18** con cloruros de diácidos, usando como condiciones de reacción óxido de zinc (ZnO) y ultrasonido en CH_2Cl_2 . Así, reacción con cloruro de adipóilo, rindió el monoéster **78a** y el dímero **79a**. En una segunda aproximación, se preparó primero el derivado **44a**, seguido por una reacción de sustitución nucleofílica con hidroxilamina ó piperazina. Se obtuvo así el dímero **80a** cuando la reacción se realizó con piperazina.

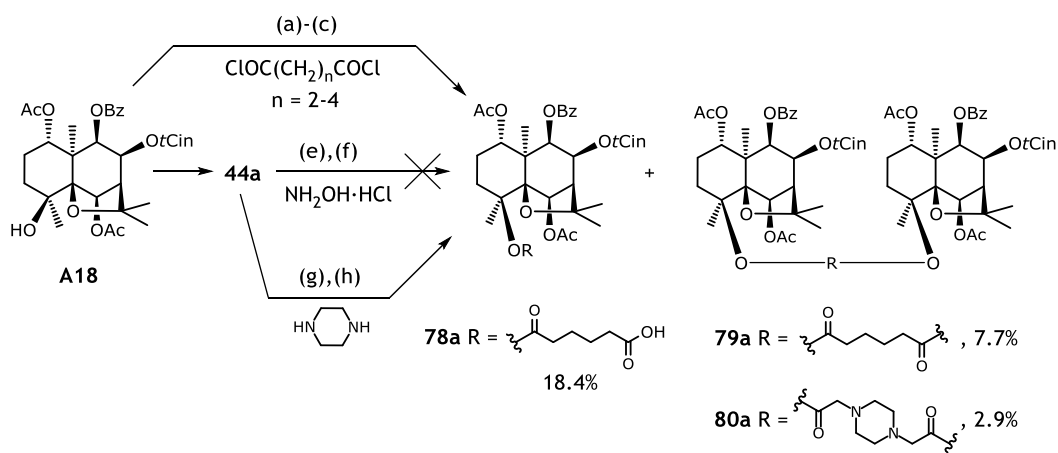


Fig. 3.87 | Preparación de homodímeros del sesquiterpene **A18**. Condiciones de reacción: (a),(b) CH_2Cl_2 , ZnO , t.a., ultrasonido, 10 min; (c) CH_2Cl_2 , Et_3N , DMAP, ZnCl_2 , ZnO , t.a., 17.5 (d) CH_2Cl_2 , ZnO , t.a., ultrasonido, 5 min; (e) CH_2Cl_2 , Et_3N , t.a., 25 h; (f) Et_3N , t.a., 44 h; (g) CH_2Cl_2 , Et_3N , t.a., 27 h 5 min.

El análisis de espectrometría de masas de alta resolución del derivado **79a** presentó una fórmula molecular de $\text{C}_{76}\text{H}_{86}\text{O}_{22}$, lo que nos confirmó que se trataba de un compuesto dimérico. Su espectro de RMN de ^1H (Fig. 3.89) presentó señales asignables a 8 protones correspondientes al grupo adipóilo a δ_{H} 1.63–1.71* (4H), 2.28 (2H) y 2.39 (2H), así como señales correspondientes a dos unidades de sesquiterpene. Por otra

parte, en su espectro de RMN de ^{13}C , se observaron señales correspondientes a una unidad de sesquiterpeno y una unidad de C-3, correspondiente al éster de adipoilo a δ_{C} 24.5 (t), 35.4 (t), 171.9 (s). Con la finalidad de confirmar la estructura propuesta, se llevaron a cabo experimentos de RMN bidimensionales. Así, un experimento HSQC editado nos confirmó la presencia de cuatro grupos metilenos correspondientes al grupo adipoilo, observándose, además, correlación $^3J_{\text{C,H}}$ entre el carbono C-4 y la cadena del espaciador (δ_{H} 2.71). El conjunto de estos datos nos confirmó que se trata de un dímero constituido por dos unidades de **A18** enlazadas por una cadena de seis carbonos, a través de los carbonos C-4–C-4.

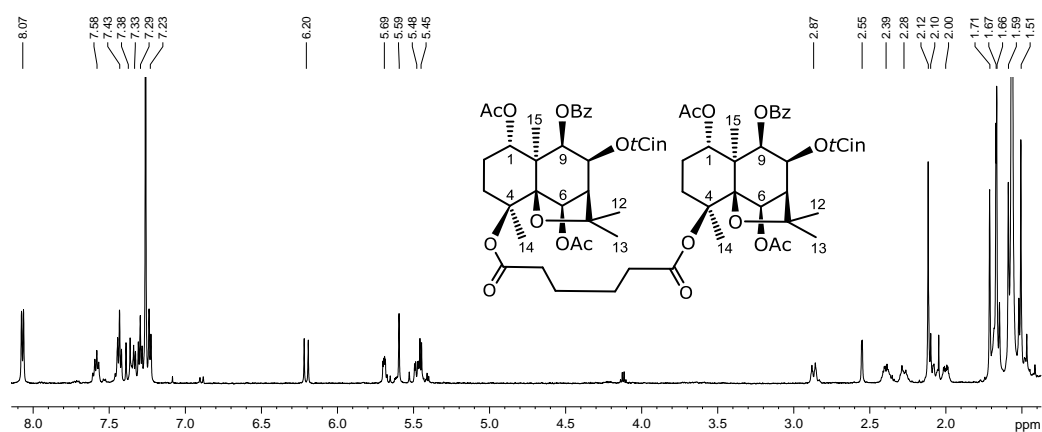


Fig. 3.88 | Espectro de RMN de ^1H del producto **79a** (CDCl_3 , 600 MHz).

II. Heterodímeros (Híbridos)

Los compuestos heterodiméricos reúnen en una única estructura dos compuestos con sus correspondientes actividades. Por ello, nos planteamos preparar compuestos híbridos mediante el acoplamiento de un sesquiterpeno y otro productos natural con demostrada actividad revertidora de la MDR en cáncer.

Como primer objetivo en la formación de compuestos heterodiméricos, nos planteamos la unión de **dos sesquiterpenos** diferentes, **A17—A18**. Así, partimos de los análogos **44a** (4-bromoacetilderivado de **A18**) y **65a** (6-isatoiloxi-derivado de **A17**), para acoplarlos entre sí mediante una reacción de sustitución nucleofílica. Desafortunadamente, la reacción resultó en una mezcla compleja, de la cual se logró identificar únicamente el producto de eliminación del hidroxilo sobre C-4, el derivado **31a** (Fig. 3.89).

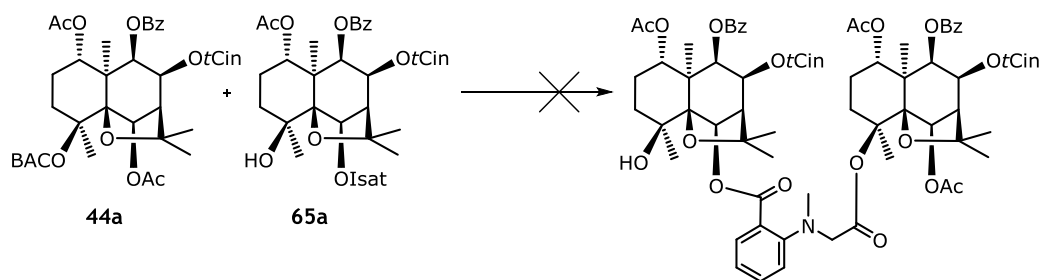


Fig. 3.89 | Estrategia de preparación de un heterodímero formado por dos sesquiterpenos.

Condiciones de reacción: (a) CH_2Cl_2 , Et_3N , t.a., 24 h.

En otro intento de obtener compuestos heterodiméricos, se acopló un sesquiterpeno a otro metabolito con diferente esqueleto, pero con conocida actividad revertidora de la multirresistencia en cáncer, para potenciar la bioactividad de ambos compuestos. Así, nos planteamos acoplar **A17** a flavonoides, curcuminoides, carotenoides y ácido ascórbico (Fig. 3.89), utilizando diferentes espaciadores y metodologías, tal como se describe a continuación.

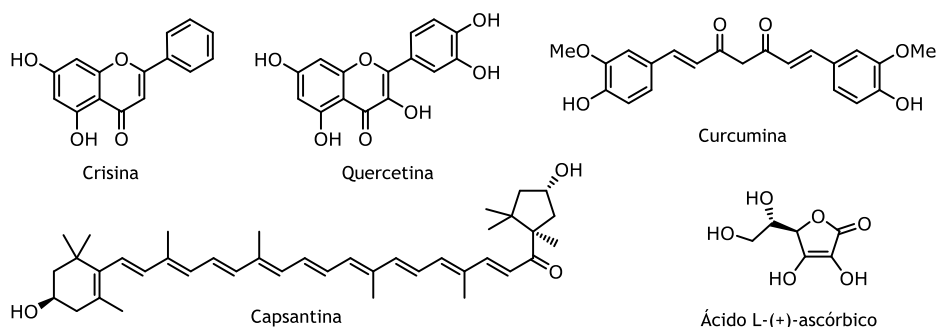


Fig. 3.90 | Productos naturales usados en la síntesis de heterodímeros.

Para preparar heterodímeros formados por un **sesquiterpeno y un curcuminoides ó ácido ascórbico**, tratamos el derivado de **48a** con curcumina, siguiendo la metodología propuesta por Tanaka y *col.*¹⁰¹, obteniéndose una mezcla compleja de productos inestables. Siguiendo el mismo procedimiento, reacción de **A17** con ácido L-(+)-ascórbico, usando como espaciador el ácido glutámico, tampoco resultó exitosa.

Con la idea de preparar un **dímero de tipo sesquiterpeno-carotenoide**, nos planteamos el aislamiento de capsantina, compuesto mayoritario del pimentón rojo y su posterior dimerización con **A17**. Sin embargo, descartamos la preparación dada la alta inestabilidad que presentaban los carotenoides en el proceso de aislamiento.

¹⁰¹ TANAKA, R.; TSUJII, H.; YAMADA, T.; KAJIMOTO, T.; AMANO, F.; HASEGAWA, J.; HAMASHIMA, Y.; NODE, M.; KATOH, K.; TAKEBE, Y. (2009). Novel 3 α -methoxyserrat-14-en-21 β -ol (PJ-1) and 3- β -methoxyserrat-14-en-21 β -ol (PJ-2)-curcumin, kojic acid, quercetin, and baicalein conjugates as HIV agents. *Bioorg. Med. Chem.*, 17, 5238–5246.

Finalmente, con el objetivo de preparar compuestos **heterodiméricos de tipo sesquiterpeno-flavonoide**, nos planteamos la reacción de **A17** con diferentes flavonoides, usando diferentes espaciadores y metodologías. Así, se trataron los derivados **47a** y **48a** con crisina en diferentes condiciones de reacción (Fig. 3.91, Tabla 3.9), obteniéndose los heterodímeros **81a** y **82a**.

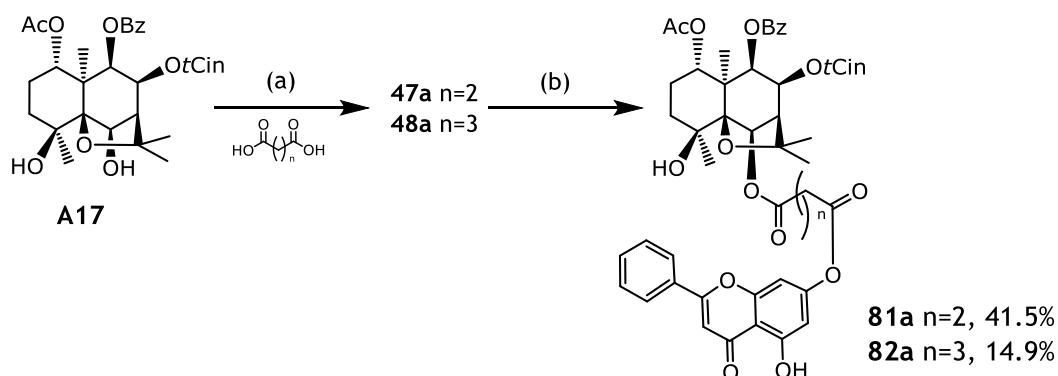


Fig. 3.91 | Preparación de heterodímeros mediante unión de sesquiterpeno—crisina.

Las diferentes condiciones de reacción (a) se indican en la parte experimental de esta Memoria, los datos de (b) se indican a continuación en la Tabla 3.9.

Así, por ejemplo, una mezcla de **47a** y crisina en CH_2Cl_2 /acetona se trató con DCC y DMAP, dando lugar al dímero **81a**. Su espectro de masas de baja resolución presentó un ión molecular a $937.3021\ m/z$, que corresponde a una fórmula molecular de $\text{C}_{52}\text{H}_{50}\text{O}_{15}\text{Na}$, determinada por espectrometría de masas de alta resolución, fórmula que corresponde con un derivado que contiene una unidad de **47a** y una unidad de crisina.

Tabla 3.9 | Condiciones de reacción en la preparación de los heterodímeros 81a y 82a.

PP	Condiciones de la reacción	Producto (% rendimiento)
47a	CH_2Cl_2 /acetona, DMAP, DCC, crisina (7.4 eq.), t.a., 1 h 50 min	81a (41.5%)
48a	CH_2Cl_2 , DMAP, DCC, crisina (3.6 eq.), t.a., 65 min	m.c.
48a	CH_2Cl_2 , DMAP, DCC, crisina (7.1 eq.), t.a., 23.5 h	m.c.
48a	CH_2Cl_2 , DMAP, DCC, crisina (8.1 eq.), t.a., 23 h	82a (10.2%)
48a	CH_2Cl_2 , DMAP, DCC, crisina (1.8 eq.), $0\ ^\circ\text{C} \rightarrow \text{t.a.}$, 3 h	82a (14.9%)
48a	CH_2Cl_2 , DMAP, DCC, crisina (6.8 eq.), t.a., 90 min	82a (16.5%)

PP: producto de partida. m.c.: mezcla compleja inseparable en poca cantidad.

Estos datos están de acuerdo con los de los experimentos de RMN 1D (^1H y ^{13}C), donde se obtuvieron las señales correspondientes a la unidad de sesquiterpeno, a dos grupos metilenos del grupo succinato y la unidad de crisina [δ_{H} 6.60 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6'), 6.73 (1H, s, H-3'), 6.90 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8'), 7.55 (3H, m, H-3'', H-4'', H-5'')],

7.90 (2H, dd, $J = 1.3, 7.7$ Hz, H-2", H-6"), 12.73 (1H, s, OH-5'). Estos datos que fueron confirmados por análisis de experimentos 2D (HMBC, HSQC) (Fig. 3.92).

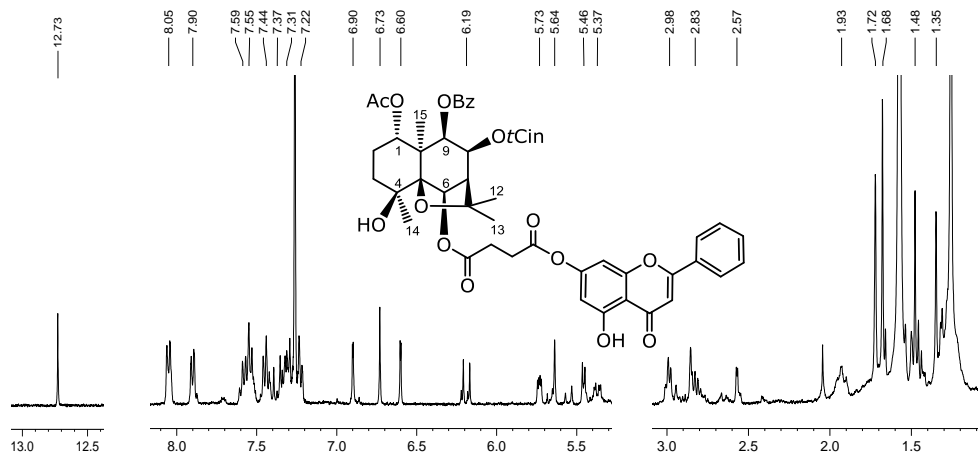


Fig. 3.92 | Espectro de RMN de ^1H del derivado dimerizado de **A17**—crisina, **81a** (CDCl_3 , 400 MHz).

Posteriormente, seleccionamos la quercetina para la preparación de un heterodímero con **A17**, sin embargo, tras numerosas reacciones, variando las estrategias de esterificación, así como las condiciones de reacción (Fig. 3.93, Tabla 3.10), en ninguno de los casos obtuvimos el producto deseado.

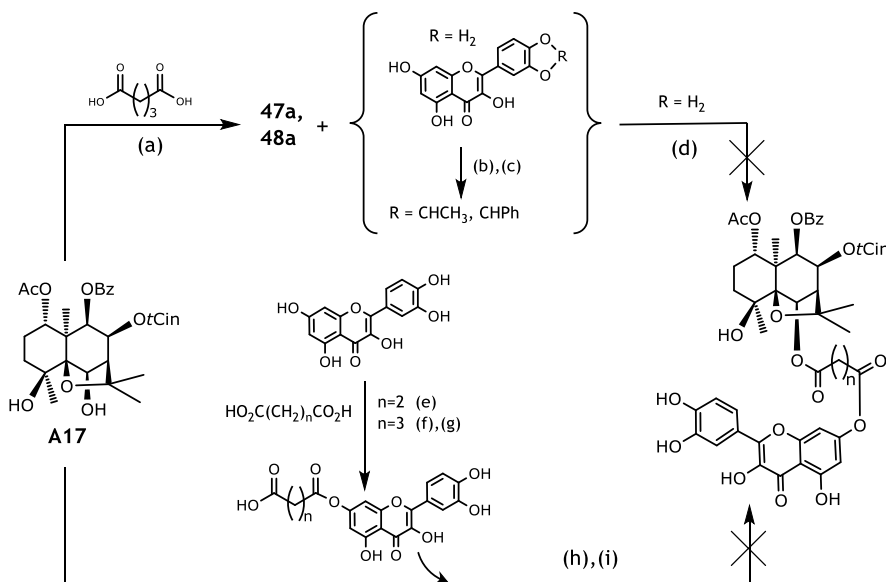


Fig. 3.93 | Estrategia para la preparación heterodímeros tipo sesquiterpeno—quercetina. Las condiciones de reacción (a) para la formación de **47a** y **48a** quedan resumidas en la correspondiente parte experimental de esta Memoria. Las diferentes condiciones de reacción (b) se indican a continuación en la Tabla 3.10.

Tabla 3.10 | Condiciones de reacción y productos obtenidos en la preparación de un heterodímeros sesquiterpeno—quercetina.

Condiciones de la reacción		Productos (% de rendimiento)
(a)	2,6-lutidina, DMAP, 100–110 °C, 4–18.5 h	47a; 48a
(b)	CuSO ₄ , acetona, ácido canfo-10-sulfónico, H ₂ SO ₄ , t.a., 77 h	n.r.
(c)	CH ₂ Cl ₂ , ácido canfo-10-sulfónico, benzaldehído-dimetilacetal, t.a., 16.6 h	3',4'- <i>O</i> -benciliden-quercetina (10.9%)
(d)	quercetina, CH ₂ Cl ₂ /acetona (9:1), DCC, t.a., 4.5 h	54a (68.8%)
(f)	quercetina, anhídrido glutárico, 2,6-lutidina, DMAP, 110 °C, 24 h	n.r.
(e),(h)	anhídrido succínico, 2,6-lutidina, DMAP, 100 °C→t.a., 20h PhMe, Et ₃ N, py, 2,6-lutidina, A17 , DMAP, DCC, 80 °C, 2 h	47a (9.7%)
(g),(i)	quercetina, anhídrido glutárico, 2,6-lutidina, t.a., 1 h quercetina-glutárico, 2.6-lutidina, DCC, A17 , DMAP, t.a., 15 h	n.r.

n.r.: no reaccionó.

Los dímeros preparados fueron evaluados por su actividad revertidora de la MDR a fármacos en cáncer, sin embargo los resultados mostraron una considerable reducción de la actividad biológica con respecto a los compuestos monoméricos. Estos resultados iniciales y la dificultad en la preparación de este tipo de compuestos nos llevaron a descartar esta estrategia en la búsqueda de nuevos revertidores de la MDR.

3.3 | PARTE EXPERIMENTAL

3.3.1 | Aislamiento de los sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos de las hojas de *Celastrus vulcanicola*

Descripción botánica

El género *Celastrus* L. está distribuido en Asia del Este, Oceanía, América y Madagascar. Posee dos centros de diversidad: Yunnan-Burma-India del Este y América Central. El número de especies asignados a este género varía entre 18 y 52, lo que se debe a la variabilidad morfológica, así como a que en este género se incluyeron especies cuya clasificación resultaba incierta, como ocurrió con especies actualmente incluidas en los géneros *Gymnosporia* o *Maytenus*. Las características morfológicas más destacadas son hojas sencillas alternas, racimos axilares o terminales con flores pentaméricas de color verde pálido, bisexuales o unisexuales, con 3-5 semillas con un arilo rojo o naranja, y pocas especies poseen una única semilla. Según estudios filogenéticos recientes, *Celastrus*, junto al género *Tripterygium*, es un grupo filogenético (Fig. 3.94)¹⁰².

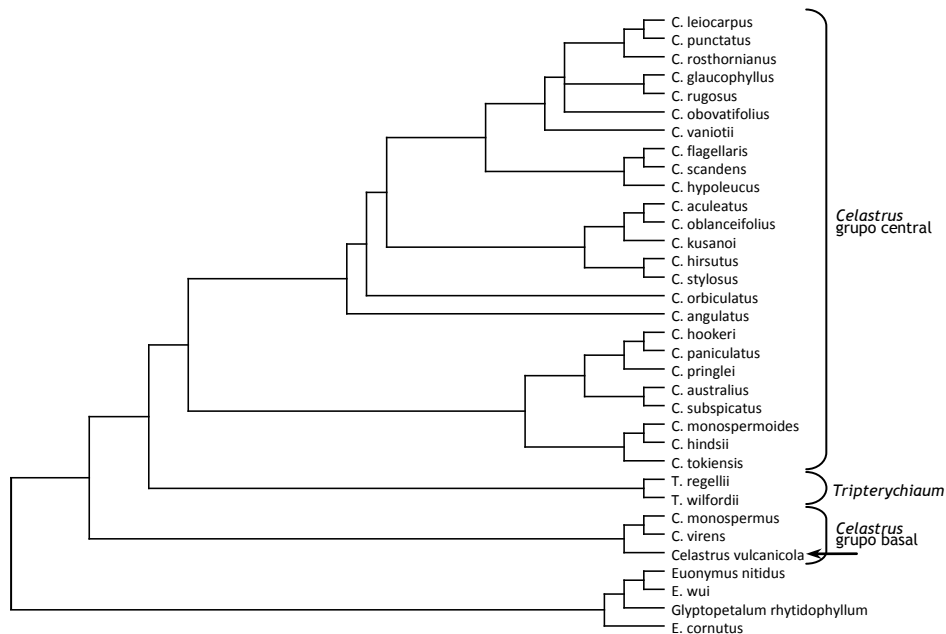


Fig. 3.94 | Cladograma del género *Celastrus* L. *Celastrus* presenta un grupo monofilético junto con *Tripterygium*, observándose un clado de *Celastrus* central que representa el adelfotaxon de *Tripterygium* y un clado de *Celastrus* basal, donde está incluido *C. vulcanicola* (indicado con una flecha).

¹⁰² MU, X.-Y.; ZHAO, L.-C.; ZHANG, Z.-X. (2012). Phylogeny of *Celastrus* L. (Celastraceae) inferred from two nuclear and three plastid markers. *J. Plant. Res.*, 125, 619–630.

***Celastrus vulcanicola* Don. Smith. Bot. Gaz. 61: 373. 1916.**

C. vulcanicola, objeto de nuestro estudio, pertenece al género *Celastrus* que incluye alrededor de 30 especies distribuidas en Asia, Australia y en las regiones templadas y tropicales de América. También es conocido bajo los sinónimos de *Celastrus chiapensis* Lundell, Lilloa 4:380. 1939, *Celastrus siltepecanus* Lundell, Wrightia 1: 155. 1946 o *Maytenus williamsii* A. Molina R., Ceiba 1: 258. 1951¹⁰³.

C. vulcanicola (Fig. 3.95) es un arbusto trepador que alcanza los 7 m de altura. Sus tallos son glabros, de color gris o café a rojizo y conspicuamente lenticelados. Sus hojas de margen entero son coriáceas, de color verde pálido, elípticas a oblongas y miden entre 6–12 cm de largo y 2.5–5 cm de ancho, con un pecíolo de 3–8 mm de longitud. El ápice es acuminado o agudo, la base cuneada y contienen cerca de seis pares de nervios laterales. Las inflorescencias que aparecen en las axilas de las hojas, son racimos solitarios o fasciculados, con 8–12 flores y pedúnculos de menos de 4 cm de longitud siendo articulados cerca de la mitad. El cáliz está compuesto de 5 sépalos, ovados a obtusos, de 2 mm de largo. La corola posee 5 pétalos libres, oblongos u obtusos de 1.5–2.5 mm de longitud y 1 mm de ancho con un disco carnosos, plano y un diámetro de 2 mm, aproximadamente. Los estambres se insertan bajo el margen del disco. Son más cortos que los pétalos con filamentos filiformes, glabros. Las anteras son subglobosas y ligeramente apiculadas. El estigma es sésil o casi sésil. El fruto es una cápsula oval, dehiscente en tres valvas de 1.5–2 cm de largo y 7–10 mm de ancho. Contiene una semilla elipsoide de 12–14 mm de largo que está rodeada por un arilo de color rojo brillante¹⁰³.

Clasificación filogenética: organismos celulares, eucariota, viridiplantae, estreptofita, estreptofitina, embriofita, traqueofita, eufilofita, espermatofita, magnoliofita, mesangioesperma, eucotiledónea, Gunneridae, Pentapetalae, Rosidae, Fabidae, Celastrales, Celastraceae, *Celastrus*¹⁰⁴ (Fig. 1.13, Fig. 1.14 y Fig. 3.94).

Distribución: *C. vulcanicola* se encuentra en Costa Rica, México, Honduras, El Salvador, Nicaragua y Guatemala¹⁰⁵.

Hábitat: Bosque muy húmedo de montaña entre 550–2400 m s.n.m.¹⁰⁶

¹⁰³ GUERRERO, R.; FERNÁNDEZ, N.; ARREGUÍN, S. (2002). La familia *Celastraceae* en la cuenca del río Balsas, Mexico. *Polibotánica*, 14, 1–50.

¹⁰⁴ NCBI Taxonomy Browser [en línea]. [Fecha de consulta: 29 de abril de 2014]. Disponible en internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>

¹⁰⁵ Global biodiversity information facility [en línea]. [Fecha de consulta: 29 de abril de 2014]. Disponible en internet: [http://data.gbif.org/occurrences/searchCountries.htm?c\[0\].s=20&c\[0\].p=0&c\[0\].o=3790908](http://data.gbif.org/occurrences/searchCountries.htm?c[0].s=20&c[0].p=0&c[0].o=3790908)



Fig. 3.95 | *Celastrus vulcanicola* en su hábitat natural¹⁰⁷.



Fig. 3.96 | Zona de recolección de *Celastrus vulcanicola*. El Parque Nacional de Montecristo en la provincia de Santa Ana, El Salvador, se indica con una flecha en la ampliación del mapa¹⁰⁸.

¹⁰⁶ HAMMEL, B. (2001). *Sistema de información de Instituto Nacional de Biodiversidad INBio* [en línea]. [Fecha de consulta: 29 de abril de 2014]. Disponible en internet: <https://www.inbio.ac.cr>

¹⁰⁷ TORRES-ROMERO, D. F. (2008). *Metabolitos secundarios bioactivos aislados de Celastrus vulcanicola y Cassine xylocarpa (Celastraceae)*. (Tesis Doctoral). Departamento de Química Orgánica, Universidad de La Laguna.

¹⁰⁸ Modificado de: *SCHWEIZER WELTATLAS interaktiv 2010-2012* [en línea]. [Fecha de consulta: 12 de enero de 2014]. Disponible en internet: <http://schweizerweltatlas.ch/>

Recolección

La especie fue recolectada el 9 de Noviembre de 2009 en el Parque Nacional de Montecristo, municipio de Metapán, Departamento de Santa Ana, El Salvador, a 2051 metros de altitud (Fig. 3.96). La recolección e identificación fue llevada a cabo por el Lic. Jorge Alberto Monterrosa Salomón y un espécimen se encuentra depositado en el Missouri Botanical Garden Herbarium (Voucher referencia: J.Monterrosa & R.Carballo 412). El material seco fue transportado y almacenado en condiciones de ausencia de humedad y luz.

Extracción y fraccionamiento cromatográfico de las hojas

Las hojas secas y molidas (1.03 kg) de *C. vulcanicola* se extrajeron con EtOH en un extractor Soxhlet a reflujo durante 48 h y, posteriormente, se concentró a presión reducida. El extracto etanólico (243.8 g) fue sometido a una partición líquido-líquido con CHCl₃-H₂O (1:1, v/v). La fase orgánica fue concentrado a vacío para obtener un residuo (58.8 g) que se fraccionó por cromatografía en columna (CC) de gel de sílice, usando una mezcla de hexanos-AcOEt en un gradiente de 0-100%, obteniéndose 36 fracciones que se reunieron en 5 grupos (fracciones A-E) de acuerdo con la similitud presentada en cromatografía en capa fina (CCF). Un análisis preliminar mediante CCF y experimentos de RMN, reveló que las fracciones B-E (1.56g, 3.53 g, 1.66 g y 1.54 g, respectivamente) presentaban sesquiterpenos dihidro-β-agarofuránicos, por lo cual fueron sometidas a posteriores estudios para aislar tales metabolitos, tal y como se resume en la (Fig. 3.97).

Así, la fracción E se trató con carbón activo en AcOEt durante 3 h. Posteriormente, las fracciones B-D fueron sometidos a CC de exclusión molecular de *Sephadex* LH-20, usando como eluyente una mezcla de MeOH-CHCl₃ (1:1), mientras la fracción E fue fraccionada mediante CC *flash*, usando como eluyente CH₂Cl₂-acetona en un gradiente de 0-100%. Las subfracciones obtenidas se reunieron según su similitud por CCF en B1-B3, C1-C4, D1-D3 y E1-E6, con las cuales se procedió como se describe a continuación:

- La **subfracción B2** (0.97 g), tras purificación mediante HPLC [*n*-hexano-AcOEt (2:3), 4 mL/min] y cromatografía en capa fina de gel de sílice preparativa (CCFP) eluyendo con CH₂Cl₂-acetona (9:1), rindió los productos **A16** (30.9 mg), **A17** (103.6 mg), **A27** (8.8 mg) y **A30*** (1.4 mg).
- La **subfracción C2** (1.54 g) se fraccionó mediante cromatografía en columna flash usando como eluyente CH₂Cl₂-acetona en un gradiente de 0-10% y las subfracciones obtenidas se reunieron según su similitud por CCF en C2A-C2D y se seleccionaron las fracciones C2B-C2D (413.1 mg, 335.0 mg y 358.8 mg,

respectivamente) para su posterior estudio debido a la presencia de sesquiterpenos. Así, fueron fraccionados, tal como se indica en la Fig. 3.97, mediante cromatografía circular preparativa (CCP), [hexanos-AcOEt (13:7)], HPLC [*n*-hexano-AcOEt (2:3), 1 y 5 mL/min], CCFP [hexanos-dioxano-CHCl₃-MeOH (12:4:2:1 y 6:2:1:1); hexanos-AcOEt (3:2)] y HPTLC [hexanos-AcOEt (4:1)]. La subfracción C2D, además, fue tratada con carbón activo en AcOEt dado su alto contenido en clorofilas. Las subfracciones rindieron los metabolitos tal como se describe a continuación:

- **Subfracción C2B:** **A2*** (1.8 mg), **A15*** (12.3 mg), **A17** (152.6 mg), **A18** (13.2 mg) y **A27** (56.4 mg).
- **Subfracción C2C:** **A2*** (8.5 mg), **A3*** (2.4 mg), **A16** (1.2 mg), **A17** (135.6 mg), **A18** (6.0 mg), **A24*** (1.5 mg), **A30*** (1.0 mg), **A32*** (0.5 mg).
- **Subfracción C2D:** **A2*** (7.0 mg), **A10*** (2.3 mg), **A12*** (0.8 mg), **A13** (2.0 mg), **A17** (1.4 mg), **A18** (10.7 mg), **A20*** (1.4 mg), **A23*** (1.1 mg), **A29** (1.3 mg), **A30*** (0.6 mg).
- La **subfracción C3** (0.84 g) se purificó mediante HPLC [*n*-hexano-AcOEt (2:3), 4 mL/min] y CCFP [CH₂Cl₂-acetona (9:1) y hexanos-AcOEt (2:3)], rindiendo los productos **A17** (452.1 mg), **A18** (3.1 mg), **A21*** (4.7 mg) y **A29** (0.7 mg).
- La **subfracción D2** (663.7 mg) se purificó mediante HPLC [*n*-hexano-AcOEt (3:7), 4 mL/min], CCFP [CH₂Cl₂-acetona (9:1), CHCl₃-acetona (19:1), hexanos-AcOEt (3:2), hexanos-*i*PrOH (9:1), hexanos-dioxano-CHCl₃-MeOH (6:2:1:1)] y HPTLC [hexanos-AcOEt (4:1)], rindiendo los productos **A1*** (1.4 mg), **A2*** (4.4 mg), **A5** (3.3 mg), **A7*** (0.7 mg), **A8*** (1.5 mg), **A10*** (2.6 mg), **A11** (0.9 mg), **A12*** (0.8 mg), **A13** (1.8 mg), **A14*** (0.9 mg), **A15*** (3.8 mg), **A17** (5.3 mg), **A18** (49.9 mg), **A21*** (4.7 mg), **A26** (1.3 mg) y **A29** (1.7 mg).
- La **subfracción E2** (116.1 mg) se purificó mediante HPLC [*n*-hexano-AcOEt (2:3), 4 mL/min] y CCFP [hexanos-AcOEt (4:1, 7:3 y 3:2), hexanos-*i*PrOH (9:1), hexanos-dioxano-CHCl₃-MeOH (6:2:1:1)] y HPTLC [hexanos-AcOEt (4:1)], rindiendo los productos **A7*** (5.2 mg), **A10*** (4.0 mg), **A13** (1.0 mg) y **A18** (65.8 mg).
- La **subfracción E3** (489.0 mg) se purificó mediante HPLC [*n*-hexano-AcOEt (2:3), 4 mL/min] y CCFP [CH₂Cl₂-acetona (9:1), hexanos-AcOEt (4:1, 7:3 y 3:2), hexanos-*i*PrOH (9:1 y 4:1), hexanos-dioxano-CHCl₃-MeOH (6:2:1:1)], rindiendo los productos **A1*** (2.2 mg), **A5** (216.1 mg), **A6** (2.3 mg), **A8*** (4.3 mg), **A10*** (21.3 mg), **A13** (6.6 mg), **A18** (2.1 mg), **A21** (0.5 mg) y **A28*** (2.4 mg).

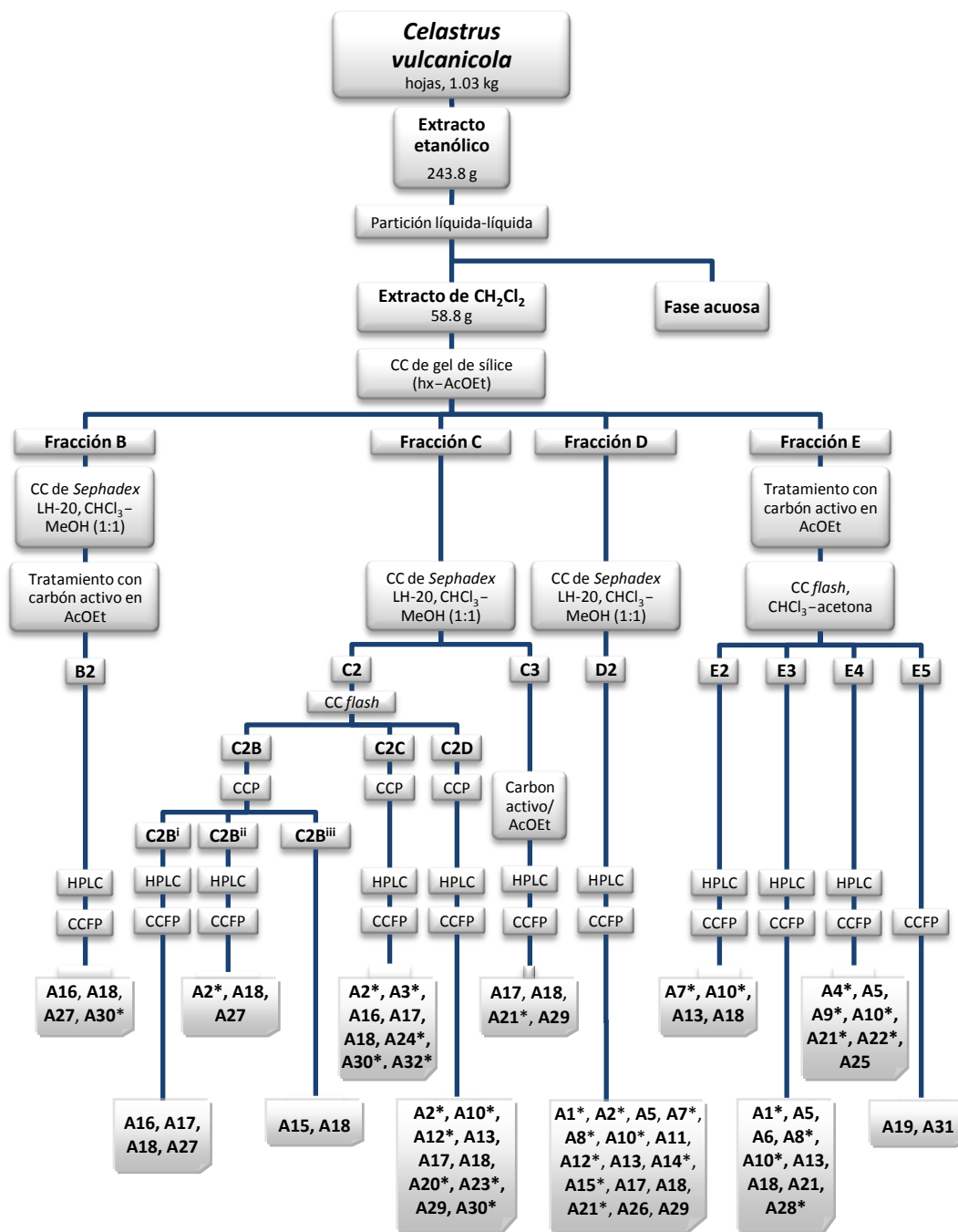


Fig. 3.97 | Extracción, separación cromatográfica y purificación durante el proceso de aislamiento de sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranicos de las hojas de *Celastrus vulcanicola*. CC: cromatografía en columna, CCP: cromatografía circular preparativa (*Cromatotron*), CCFP: cromatografía en capa fina de gel de sílice preparativa, HPLC: cromatografía líquida de alta presión.

- La **subfracción E4** (339.2 mg) se purificó mediante HPLC [*n*-hexano–AcOEt (2:3), 4 mL/min], CCFP [CH₂Cl₂–acetona (9:1) y hexanos–AcOEt (2:3)] y HPTLC [hexanos–AcOEt (4:1)], rindiendo los productos **A4*** (0.8 mg), **A5** (39.8 mg), **A9*** (1.7 mg), **A10*** (2.7 mg), **A21*** (38.3 mg), **A22*** (1.5 mg) y **A25** (1.1 mg).
- De la **subfracción E5** (66.4 mg) se separó 10.2 mg para llevar a cabo un análisis mediante CCFP [hexanos–dioxano–CHCl₃–MeOH (6:2:1:1)], rindiendo los productos **A19** (1.6 mg) y **A31** (0.6 mg).

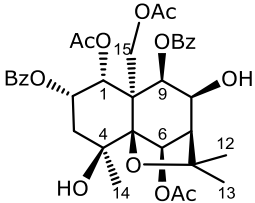
Las fracciones B1, B3, C1, C4, D1, D3, E1 y E6 no fueron estudiadas ya que el análisis mediante CCF y RMN indicó que no tenían la cantidad suficiente de sesquiterpenos dihidro-β-agarofuránicos para llevar a cabo el estudio exitoso de este tipo de metabolitos. Los compuestos que se indican con un asterisco (*) resultaron nuevos en la bibliografía química. A continuación, se detallan los datos físicos, espectroscópicos y espectrométricos de cada uno de los nuevos metabolitos aislados, así como las cantidades obtenidas de los mismos.

3.3.2 | Datos físicos, espectrométricos y espectroscópicos de los metabolitos aislados de las hojas de *C. vulcanicola*

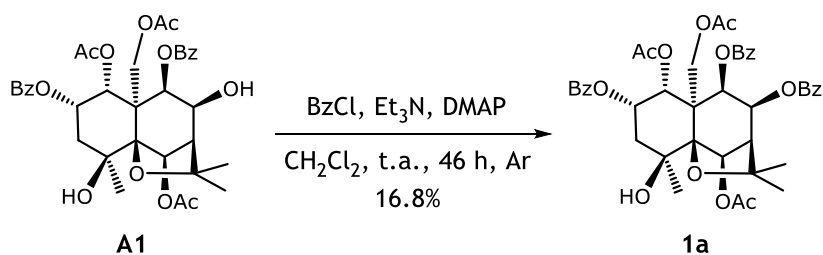
Sesquiterpeno A1

(1*R*,2*S*,4*S*,5*R*,6*R*,7*R*,8*S*,9*S*,10*R*)-1,6,15-Triacetiloxi-2,9-dibenzoiloxi-4,8-dihidroxi-dihidro- β -agarofurano

Se obtuvo como sólido amorfo incoloro (3.6 mg).

Datos físicos y espectroscópicos	<p>$[\alpha]_D^{20}$: +73.6° (c 0.15, CHCl₃).</p> <p>UV (EtOH) λ_{max} (log ϵ): 231 (4.3) nm.</p> <p>IR ν_{max} (película): 3518, 2928, 1743, 1726, 1271, 1229, 1100, 757, 713 cm⁻¹.</p>	
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN-¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 1.54 (3H, s, Me-14), 1.57 (3H, s, OAc-1), 1.58 (3H, s, Me-12), 1.71 (3H, s, Me-13), 2.13 (3H, s, OAc-6), 2.17 (1H, d, $J = 4.9$ Hz, OH-8), 2.18 (1H, dd, $J = 2.9, 15.1$ Hz, H-3α), 2.27 (1H, dd, $J = 3.4, 15.1$ Hz, H-3β), 2.29 (3H, s, OAc-15), 2.48 (1H, d, $J = 3.4$ Hz, H-7), 2.90 (1H, s, OH-4), 4.43, 5.28 (2H, d_{AM}, $J = 12.8$ Hz, H-15), 4.71 (1H, ddd, $J = 3.4, 4.9, 6.5$ Hz, H-8), 5.65 (1H, d, $J = 6.5$ Hz, H-9), 5.73 (1H, d, $J = 3.4$ Hz, H-1), 5.82 (1H, dd, $J = 3.4, 6.8$ Hz, H-2), 6.00 (1H, s, H-6), 7.48 (2H, t, $J = 7.8$ Hz, OBz-9), 7.50 (2H, t, $J = 7.7$ Hz, OBz-2), 7.60 (1H, t, $J = 7.7$ Hz, OBz-2), 7.61 (1H, t, $J = 7.7$ Hz, OBz-9), 8.09 (2H, d, $J = 7.7$ Hz, OBz-9), 8.12 (2H, d, $J = 7.6$ Hz, OBz-2).</p> <p>RMN-¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ: 20.3 (c, OAc-1), 21.3 (c, OAc-15), 21.5 (c, OAc-6), 25.2 (c, C-14), 26.2 (c, C-13), 30.2 (c, C-12), 42.1 (t, C-3), 53.7 (s, C-10), 55.1 (d, C-7), 65.6 (t, C-15), 68.8 (d, C-2), 69.6 (s, C-4), 70.4 (d, C-1), 70.9 (d, C-9), 71.9 (d, C-8), 76.4 (d, C-6), 85.0 (s, C-11), 90.8 (s, C-5), 128.4 (2 \times d, OBz-9), 128.5 (s, OBz-9), 128.7 (2 \times d, OBz-2), 129.2 (s, OBz-2), 129.8 (2 \times d, OBz-2), 130.4 (2 \times d, OBz-9), 133.5 (d, OBz-2), 133.9 (d, OBz-9), 165.6 (s, OBz-2), 167.0 (s, OBz-9), 169.2 (s, OAc-1), 170.2 (s, OAc-6), 170.5 (s, OAc-15).</p>	
Espectrometría de masas	<p>EM (IE) m/z (%): 668 [M⁺] (0.6), 653 (0.6), 650 (0.2), 608 (0.2), 531 (4), 486 (3), 382 (2), 202 (4), 149 (8), 105 (100), 83 (6), 77 (16), 57 (10).</p> <p>EMAR (IE) m/z: Calculado para C₃₅H₄₀O₁₃ [M⁺]: 668.2469, observado 668.2493.</p>	

Preparación del derivado 1a



A una disolución de 3.6 mg de sesquiterpeno **A1** (0.05 mmol) en 0.1 ml de CH_2Cl_2 seco, se le añadió Et_3N (0.1 ml, 0.72 mmol), DMAP (5 mg, 0.04 mmol) y cloruro de benzoilo (15 μl , 0.13 mmol) a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón. Se dejó agitar durante 45 h, tras lo cual se añadió hielo y se llevó a sequedad a presión reducida. Se extrajo con HCl (1 M), disolución saturada de NaHCO_3 y de NaCl. El crudo de reacción se fraccionó mediante cromatografía de exclusión molecular tipo Sephadex LH-20, usando como eluyente mezclas de CHCl_3 -MeOH (1:1) y hexanos- CHCl_3 -MeOH (2:1:1), y se purificó mediante HPTLC usando como fase móvil una mezcla de hexanos-AcOEt (4:1). Así, se obtuvieron 0.7 mg del derivado **1a** (16.8% de rendimiento) como un sólido amorfo.

Derivado 1a

(1*R*,2*S*,4*S*,5*R*,6*R*,7*R*,8*S*,9*S*,10*S*)-1,6,15-Triacetiloxi-2,8,9-tribenzoiloxi-4-hidroxi-dihidro- β -agarofurano

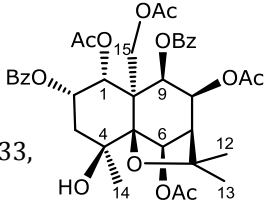
Se obtuvo como sólido amorfo incoloro (0.7 mg).

Datos físicos y espectroscópico	<p>$[\alpha]_D^{20}$: +48.9° (c 0.06, CHCl₃).</p> <p>UV (CH₃CN) λ_{\max} (log ϵ): 229 (4.5) nm.</p> <p>DC λ_{\max} (CH₃CN) nm: 241.6 ($\Delta\epsilon=-6.0$), 235.6 ($\Delta\epsilon= 0.0$), 225.8 ($\Delta\epsilon= +9.3$).</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN-¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 1.58 (3H, s, Me-14), 1.60 (3H, s, Me-12), 1.62 (3H, s, Me-13), 1.83 (1H, dd, $J = 3.2$, 15.4 Hz, H-3α), 2.14 (1H, dd, $J = 3.2$, 15.4 Hz, H-3β), 2.22 (3H, 2, OAc-1), 2.30 (1H, d, OAc-6), 2.42 (1H, s, OAc-15), 2.62 (1H, d, $J = 3.5$ Hz, H-7), 2.92 (1H, s, OH-4), 4.57, 5.12 (2H, d_{AB}, $J = 12.8$ Hz, H-15) 5.78 (1H, d, $J = 3.5$ Hz, H-1), 5.81 (1H, dd, $J = 3.5$, 6.9 Hz, H-2), 5.84 (1H, d, $J = 6.5$ Hz, H-9), 6.10 (1H, dd, $J = 3.6$, 6.5 Hz, H-8), 6.24 (1H, s, H-6), 7.23 (2H, t, $J = 7.7$ Hz, OBz-8), 7.44 (2H, t, $J = 7.7$ Hz, OBz-9), 7.47 (1H, t, $J = 7.3$ Hz, OBz-8), 7.51 (2H, t, $J = 7.7$ Hz, OBz-2), 7.60 (1H, t, $J = 7.7$ Hz, OBz-9), 7.61 (1H, t, $J = 7.3$ Hz, OBz-2), 7.71 (2H, d, $J = 7.6$ Hz, OBz-8), 7.92 (2H, d, $J = 8.2$ Hz, OBz-9), 8.12 (2H, d, $J = 8.2$ Hz, OBz-2).</p> <p>RMN-¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 20.3 (c, OAc-1), 21.3 (c, OAc-15), 21.4 (c, OAc-6), 25.3 (c, C-14), 26.6 (c, C-13), 30.0 (c, C-12), 42.1 (t, C-3), 53.8 (d, C-7), 53.9 (s, C-10), 65.2 (t, C-15), 68.1 (d, C-9), 68.8 (d, C-2), 69.6 (s, C-4), 70.0 (d, C-1), 70.7 (d, C-8), 75.9 (d, C-6), 85.0 (s, C-11), 91.1 (s, C-5), 128.3 (4 \times d, OBz-8, OBz-9), 128.8 (2 \times d, OBz-2), 128.8 (s, OBz-9), 129.1 (s, OBz-8), 129.2 (s, OBz-2), 129.6 (2 \times d, OBz-8), 129.8 (2 \times d, OBz-2), 130.3 (2 \times d, OBz-9), 133.2 (d, OBz-8), 133.6 (d, OBz-2), 133.6 (d, OBz-9), 164.8 (s, OBz-8), 165.4 (s, OBz-9), 165.7 (s, OBz-2), 169.3 (s, OAc-1), 169.9 (s, OAc-6), 170.7 (s, OAc-15)</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IE) m/z (%): 757 [M - CH₃]⁺ (1), 635 (8), 590 (7), 468 (1), 244 (1), 202 (13), 151 (1), 122 (2), 105 (100), 77 (9).</p> <p>EMAR (IE) m/z: Calculado para C₄₁H₄₁O₁₄ [M - CH₃]⁺: 757.2496, observado 757.2532.</p>

Sesquiterpeno A2:

(1*R*,2*S*,4*S*,5*R*,6*R*,7*R*,8*S*,9*S*,10*S*)-1,6,8,15-Tetraacetiloxi-2,9-dibenzoiloxi-4-hidroxi-dihidro- β -agarofurano

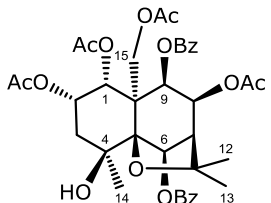
Se obtuvo como sólido amorfo incoloro (21.7 mg).

<p>Datos físicos y espectroscópicos</p>	<p>$[\alpha]_D^{20}$: +58.8° (c 0.14, CHCl₃).</p> <p>UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ): 231 (4.2) nm.</p> <p>IR ν_{\max} (película): 3551, 2928, 1748, 1725, 1270, 1233, 1095, 757, 712 cm⁻¹.</p>	
<p>Resonancia magnética nuclear</p>	<p>RMN-¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 1.55 (3H, s, Me-14), 1.60 (6H, s, OAc-1, Me-12), 1.70 (3H, s, Me-13), 1.89 (3H, s, OAc-8), 2.13 (3H, s, OAc-6), 2.19 (1H, dd, J = 3.2, 15.3 Hz, H-3α), 2.27 (1H, dd, J = 3.7, 15.3 Hz, H-3β), 2.36 (3H, s, OAc-15), 2.46 (1H, d, J = 3.4 Hz, H-7), 2.88 (1H, s, OH-4), 4.54, 5.14 (2H, d_{AB}, J = 12.7 Hz, H-15), 5.69 (1H, d, J = 6.4 Hz, H-9), 5.70 (1H, d, J = 3.7 Hz, H-1), 5.78 (1H, dd, J = 3.7, 6.5 Hz, H-2), 5.87 (1H, dd, J = 3.4, 6.4 Hz, H-8), 6.11 (1H, s, H-6), 7.48 (2H, t, J = 7.8 Hz, OBz-9), 7.50 (2H, t, J = 8.0 Hz, OBz-2), 7.60 (1H, t, J = 7.6 Hz, OBz-2), 7.62 (1H, t, J = 7.8 Hz, OBz-9), 8.07 (2H, d, J = 7.8 Hz, OBz-9), 8.10 (2H, d, J = 8.0 Hz, OBz-2).</p> <p>RMN-¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 20.3 (c, OAc-1), 20.7 (c, OAc-8), 21.1 (c, OAc-15), 21.4 (c, OAc-6), 25.3 (c, C-14), 26.3 (c, C-13), 30.0 (c, C-12), 42.1 (t, C-3), 53.7 (s, C-10), 53.8 (d, C-7), 65.1 (t, C-15), 68.1 (d, C-9), 68.8 (d, C-2), 69.6 (s, C-4), 70.1 (2 \times d, C-1, C-8), 76.1 (d, C-6), 85.0 (s, C-11), 91.0 (s, C-5), 128.4 (2 \times d, OBz-9), 128.6 (s, OBz-9), 128.7 (2 \times d, OBz-2), 129.2 (s, OBz-2), 129.8 (2 \times d, OBz-2), 130.3 (2 \times d, OBz-9), 133.5 (d, OBz-2), 133.7 (d, OBz-9), 165.5 (s, OBz-9), 165.7 (s, OBz-2), 169.2 (s, OAc-1), 169.3 (s, OAc-8), 170.0 (s, OAc-6), 170.7 (s, OAc-15).</p>	
<p>Espectrometría de masas</p>	<p>EM (IE) m/z (%): 710 [M⁺] (0.1), 650 (0.2), 573 (3), 528 (6), 469 (5), 202 (8), 105 (100), 83 (6), 77 (13).</p> <p>EMAR (IE) m/z: Calculado para C₃₇H₄₂O₁₄ [M⁺]: 710.2575, observado 710.2584.</p>	

Sesquiterpeno A3:

(1*R*,2*S*,4*S*,5*R*,6*R*,7*R*,8*S*,9*S*,10*S*)-1,2,8,15-Tetraacetiloxi-6,9-dibenzoiloxi-4-hidroxi-dihidro- β -agarofurano

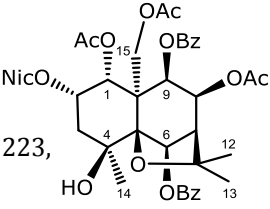
Se obtuvo como sólido amorfo incoloro (2.4 mg).

Datos físicos y espectroscópicos	<p>$[\alpha]_D^{20}$: +27.2° (c 0.23, CHCl₃).</p> <p>UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ): 232 (5.7) nm.</p> <p>IR ν_{\max} (película): 3555, 2934, 1754, 1737, 1276, 1242, 1099, 761, 716 cm⁻¹.</p>	
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN-¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 1.52 (3H, s, Me-14), 1.61 (3H, s, Me-12), 1.62 (3H, s, OAc-1), 1.70 (3H, s, Me-13), 1.90 (3H, s, OAc-8), 2.06 (1H, dd, J = 3.1, 15.0 Hz, H-3α), 2.10 (3H, s, OAc-2), 2.22 (1H, dd, J = 3.7, 15.0 Hz, H-3β), 2.41 (3H, s, OAc-15), 2.61 (1H, d, J = 3.3 Hz, H-7), 3.05 (1H, d, J = 0.9 Hz, OH-4), 4.52, 4.82 (2H, d_{AB}, J = 13.1 Hz, H-15), 5.52 (1H, dd, J = 3.4, 6.7 Hz, H-2), 5.62 (1H, d, J = 3.3 Hz, H-1), 5.67 (1H, d, J = 6.4 Hz, H-9), 5.97 (1H, dd, J = 3.5, 6.5 Hz, H-8), 6.22 (1H, s, H-6), 7.48 (4H, t, J = 7.8 Hz, OBz-6, OBz-9), 7.60 (1H, tt, J = 1.1, 7.3, OBz-6), 7.61 (1H, tt, J = 1.1, 7.4, OBz-9), 8.07 (2H, dd, J = 1.5, 8.4 Hz, OBz-9), 8.18 (2H, dd, J = 1.4, 8.4 Hz, OBz-6).</p> <p>RMN-¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 20.2 (c, OAc-1), 20.6 (c, OAc-8), 21.1 (c, OAc-2), 21.3 (c, OAc-15), 24.9 (c, C-14), 26.3 (c, C-13), 30.1 (c, C-12), 42.3 (t, C-3), 53.7 (d, C-7), 53.9 (s, C-10), 64.4 (t, C-15), 68.0 (d, C-2), 68.1 (d, C-9), 69.9 (d, C-4), 70.0 (d, C-8), 70.1 (d, C-1), 76.8 (d, C-6), 85.0 (s, C-11), 90.9 (s, C-5), 128.4 (2 \times d, OBz-9), 128.6 (s, OBz-9), 128.7 (2 \times d, OBz-6), 129.4 (s, OBz-6), 130.1 (2 \times d, OBz-6), 130.3 (2 \times d, OBz-9), 133.5 (d, OBz-6), 133.7 (d, OBz-9), 165.4 (s, OBz-9), 165.7 (s, OBz-6), 169.2 (s, OAc-1), 169.3 (s, OAc-8), 169.6 (s, OAc-2), 170.6 (s, OAc-15).</p>	
Espectrometría de masas	<p>EM (IE) m/z (%): 710 [M⁺] (0.1), 697 (1), 573 (5), 528 (3), 253 (1), 202 (3), 105 (100), 83 (1), 77 (7), 57 (3).</p> <p>EMAR (IE) m/z: Calculado para C₃₇H₄₂O₁₄ [M⁺]: 710.2575, observado 710.2554.</p>	

Sesquiterpeno A4:

(1*R*,2*S*,4*S*,5*R*,6*R*,7*R*,8*S*,9*S*,10*S*)-1,8,15-Triacetiloxi-6,9-dibenzoiloxi-4-hidroxi-2-nicotinoiloxi-dihidro-β-agarofurano

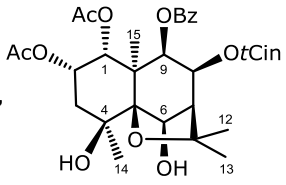
Se obtuvo como sólido amorfo incoloro (0.8 mg).

Datos físicos y espectroscópicos	<p>[α]_D²⁰ : +23.1° (c 0.05, CHCl₃).</p> <p>UV (EtOH) λ_{max} (log ε): 228 (4.2), 263 (3.4) nm.</p> <p>IR ν_{max} (película): 3518, 2924, 1745, 1726, 1273, 1223, 1104, 756, 713 cm⁻¹.</p>	
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN-¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ:</p> <p>1.56 (3H, s, Me-14), 1.62 (3H, s, OAc-1), 1.64 (3H, s, Me-12), 1.73 (3H, s, Me-13), 1.91 (3H, s, OAc-8), 2.25 (1H, dd, <i>J</i> = 3.1, 15.8, Hz, H-3β), 2.35 (1H, dd, <i>J</i> = 3.6, 15.8 Hz, H-3α), 2.43 (3H, s, OAc-15), 2.64 (1H, d, <i>J</i> = 3.3 Hz, H-7), 3.10 (1H, s, OH-4), 4.58, 5.09 (2H, d_{AB}, <i>J</i> = 12.7 Hz, H-15), 5.74 (1H, d, <i>J</i> = 6.4 Hz, H-9), 5.75 (1H, d, <i>J</i> = 3.3 Hz, H-1), 5.83 (1H, dd, <i>J</i> = 3.3, 6.7 Hz, H-2), 5.99 (1H, dd, <i>J</i> = 3.5, 6.4 Hz, H-8), 6.27 (1H, s, H-6), 7.44 (1H, dd, <i>J</i> = 2.9, 7.9 Hz, ONic), 7.48 (2H, t, <i>J</i> = 8.0 Hz, OBz-6), 7.50 (2H, t, <i>J</i> = 8.0 Hz, OBz-9), 7.60 (1H, t, <i>J</i> = 7.3 Hz, OBz-6), 7.63 (1H, t, <i>J</i> = 7.4 Hz, OBz-9), 8.09 (2H, dd, <i>J</i> = 1.0, 8.4 Hz, OBz-9), 8.18 (2H, dd, <i>J</i> = 1.2, 8.4 Hz, OBz-6), 8.37 (1H, td, <i>J</i> = 1.8, 8.1 Hz, ONic), 8.81 (1H, dd, <i>J</i> = 1.4, 5.1 Hz, ONic), 9.29 (1H, d, <i>J</i> = 1.8 Hz, ONic).</p> <p>RMN-¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ:</p> <p>20.3 (c, OAc-1), 20.7 (c, OAc-8), 21.2 (c, OAc-15), 25.3 (c, C-14), 26.4 (c, C-13), 30.1 (c, C-12), 42.3 (t, C-3), 53.8 (d, s, C-7, C-10), 64.9 (t, C-15), 68.1 (d, C-9), 69.6 (d, C-2), 69.8 (s, C-4), 70.0 (2 × d, C-1, C-8), 77.0 (d, C-6), 85.3 (s, C-11), 90.9 (s, C-5), 123.6 (d, ONic), 125.1 (s, ONic), 128.5 (2 × d, OBz-9), 128.6 (s, OBz-6), 128.7 (2 × d, OBz-6), 129.4 (s, OBz-6), 130.2 (2 × d, OBz-9), 130.3 (2 × d, OBz-9), 133.6 (d, OBz-6), 133.8 (d, OBz-9), 137.1 (d, ONic), 151.2 (d, ONic), 154.0 (d, ONic), 164.4 (s, ONic), 165.4 (s, OBz-9), 165.7 (s, OBz-6), 169.2 (s, OAc-8), 169.3 (s, OAc-1), 170.9 (s, OAc-15).</p>	
Espectrometría de masas	<p>EM (IE) <i>m/z</i> (%): 773 [M⁺] (3), 758 (5), 713 (1), 636 (7), 528 (4), 488 (1), 323 (1), 202 (3), 151 (2), 124 (8), 105 (100), 77 (10).</p> <p>EMAR (IE) <i>m/z</i>: Calculado para C₄₁H₄₃NO₁₄ [M⁺]: 773.2684, observado 773.2654.</p>	

Sesquiterpeno A7:

(1*R*,2*S*,4*S*,5*R*,6*R*,7*S*,8*S*,9*S*,10*S*)-1,2-Diacetiloxi-9-benzoiloxi-8-(*E*)-cinamoiloxi-4,6-dihidroxi-dihidro- β -agarofurano

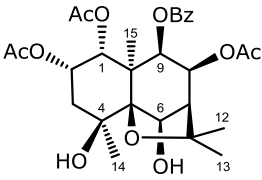
Se obtuvo como sólido amorfo incoloro (5.9 mg).

Datos físicos y espectroscópicos	<p>$[\alpha]_D^{20}$: -13.8° (<i>c</i> 0.07, CHCl₃).</p> <p>UV (CH₃CN) λ_{\max} (log ϵ): 222 (4.4), 275 (4.3) nm.</p> <p>DC λ_{\max} (CH₃CN) nm: 261.4 ($\Delta\epsilon=-4.0$), 239.3 ($\Delta\epsilon= 0.0$), 224.8 ($\Delta\epsilon= +3.5$).</p> <p>IR ν_{\max} (película): 3437, 2927, 2855, 1744, 1723, 1275, 1233, 1032, 758, 713 cm⁻¹.</p>	
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN-¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ:</p> <p>1.57 (3H, s, Me-15), 1.61 (3H, s, Me-12), 1.65 (3H, s, OAc-1), 1.75 (3H, s, Me-13), 1.81 (3H, s, Me-14), 2.04 (1H, dd, <i>J</i> = 3.3, 15.0 Hz, H-3α), 2.07 (3H, s, OAc-2), 2.18 (1H, dd, <i>J</i> = 3.6, 14.9 Hz, H-3β), 2.62 (1H, d, <i>J</i> = 3.2 Hz, H-7), 3.28 (1H, s, OH-4), 4.64 (1H, d, <i>J</i> = 5.3 Hz, H-6), 4.99 (1H, d, <i>J</i> = 5.3 Hz, OH-6), 5.37 (1H, d, <i>J</i> = 6.6 Hz, H-9), 5.52 (1H, d, <i>J</i> = 3.7 Hz, H-1), 5.56 (1H, dd, <i>J</i> = 3.7, 6.8 Hz, H-2), 5.58 (1H, dd, <i>J</i> = 3.2, 6.6 Hz, H-8), 6.20 (1H, d, <i>J</i> = 16.1 Hz, OtCin), 7.21 (2H, d, <i>J</i> = 7.5 Hz, OtCin), 7.30 (2H, t, <i>J</i> = 7.6 Hz, OtCin), 7.34 (1H, t, <i>J</i> = 7.1 Hz, OtCin), 7.35 (1H, d, <i>J</i> = 16.1 Hz, OtCin), 7.44 (2H, t, <i>J</i> = 7.8 Hz, OBz), 7.60 (1H, t, <i>J</i> = 7.4 Hz, OBz), 8.03 (2H, d, <i>J</i> = 8.1 Hz, OBz).</p> <p>RMN-¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ:</p> <p>20.3 (c, OAc-1), 21.2 (c, OAc-2), 21.4 (c, C-15), 25.0 (c, C-14), 27.2 (c, C-13), 30.6 (c, C-12), 40.9 (t, C-3), 48.9 (s, C-10), 54.9 (d, C-7), 68.2 (d, C-2), 69.0 (d, C-8), 69.8 (d, C-1), 72.0 (d, C-9), 72.4 (s, C-4), 77.9 (d, C-6), 85.1 (s, C-11), 91.1 (s, C-5), 117.1 (d, OtCin), 128.1 (2 \times d, OtCin), 128.4 (2 \times d, OtCin), 128.7 (2 \times d, OBz), 129.8 (s, OBz), 130.3 (d, OtCin), 130.5 (2 \times d, OBz), 133.4 (d, OBz), 133.9 (s, OtCin), 145.6 (d, OtCin), 165.0 (s, OtCin), 165.4 (s, OBz), 169.6 (s, OAc-1), 169.7 (s, OAc-2).</p>	
Espectrometría de masas	<p>EM (IE) <i>m/z</i> (%): 621 [M - CH₃]⁺ (4), 603 (16), 499 (26), 309 (1), 249 (2), 202 (13), 164 (2), 147 (5), 131 (72), 105 (100), 77 (14).</p> <p>EMAR (IE) <i>m/z</i>: Calculado para C₃₄H₃₇O₁₁ [M - CH₃]⁺: 621.2336, observado 621.2358.</p>	

Sesquiterpeno A8:

(1*R*,2*S*,4*S*,5*R*,6*R*,7*S*,8*S*,9*S*,10*S*)-1,2,8-Triacetiloxi-9-benzoiloxi-4,6-dihidroxi-dihidro-β-agarofurano

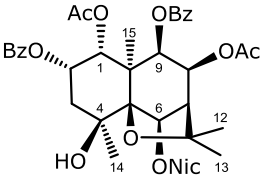
Se obtuvo como sólido amorfo incoloro (5.8 mg).

Datos físicos y espectroscópicos	<p>[α]_D²⁰ : -11.3° (c 0.15, CHCl₃).</p> <p>UV (EtOH) λ_{max} (log ε): 230 (4.0) nm.</p> <p>IR ν_{max} (película): 3426, 2928, 1747, 1275, 1241, 1032, 756, 710 cm⁻¹.</p>	
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN-¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ:</p> <p>1.52 (3H, s, Me-15), 1.60 (3H, s, Me-12), 1.62 (3H, s, OAc-1), 1.65 (3H, s, Me-13), 1.79 (3H, s, Me-14), 1.90 (3H, s, OAc-8), 2.01 (1H, dd, <i>J</i> = 3.0, 14.8 Hz, H-3α), 2.06 (3H, s, OAc-2), 2.15 (1H, dd, <i>J</i> = 3.8, 14.8 Hz, H-3β), 2.49 (1H, d, <i>J</i> = 3.2 Hz, H-7), 3.26 (1H, s, OH-4), 4.58 (1H, d, <i>J</i> = 5.4 Hz, H-6), 4.98 (1H, d, <i>J</i> = 5.4 Hz, OH-6), 5.25 (1H, d, <i>J</i> = 6.5 Hz, H-9), 5.47 (1H, d, <i>J</i> = 3.9 Hz, H-1), 5.48* (1H, H-8), 5.55 (1H, dd, <i>J</i> = 3.4, 6.8 Hz, H-2), 7.46 (2H, t, <i>J</i> = 7.6 Hz, OBz), 7.59 (1H, t, <i>J</i> = 7.4 Hz, OBz), 8.04 (2H, d, <i>J</i> = 7.6 Hz, OBz).</p> <p style="text-align: right;">* señal solapada</p> <p>RMN-¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ:</p> <p>20.3 (c, OAc-1), 20.8 (c, OAc-8), 21.2 (c, OAc-2), 21.3 (c, C-15), 25.0 (c, C-14), 27.1 (c, C-13), 30.7 (c, C-12), 40.9 (t, C-3), 48.7 (s, C-10), 54.9 (d, C-7), 68.2 (d, C-2), 68.7 (d, C-8), 69.8 (d, C-9), 71.9 (d, C-1), 72.4 (s, C-4), 77.9 (d, C-6), 85.2 (s, C-11), 91.0 (s, C-5), 128.4 (2 × d, OBz), 128.9 (s, OBz), 130.2 (2 × d, OBz), 133.5 (d, OBz), 165.5 (s, OBz), 169.4 (s, OAc-1), 169.5 (s, OAc-8), 169.7 (s, OAc-2).</p>	
Espectrometría de masas	<p>EM (IE) <i>m/z</i> (%): 533 [M - CH₃]⁺ (3), 515 (4), 411 (35), 351 (4), 309 (4), 249 (4), 202 (12), 161 (5), 123 (2), 105 (100), 77 (12).</p> <p>EMAR (IE) <i>m/z</i>: Calculado para C₂₇H₃₃O₁₁ [M - CH₃]⁺: 533.2023, observado 533.2037.</p>	

Sesquiterpeno A9:

(1*R*,2*S*,4*S*,5*R*,6*R*,7*R*,8*S*,9*S*,10*S*)-1,8-Diacetiloxi-2,9-dibenzoiloxi-4-hidroxi-6-nicotinoiloxi-dihidro- β -agarofurano

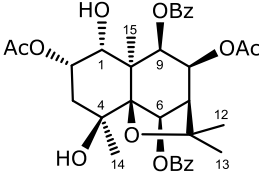
Se obtuvo como sólido amorfo incoloro (1.7 mg).

Datos físicos y espectroscópicos	<p>$[\alpha]_D^{20}$: +49.0° (<i>c</i> 0.25, CHCl₃).</p> <p>UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ): 229 (4.5), 263 (3.6) nm.</p> <p>IR ν_{\max} (película): 3550, 2931, 1749, 1724, 1274, 1223, 1104, 756, 711 cm⁻¹.</p>	
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN-¹H (CDCl₃, 500 MHz) δ: 1.60 (3H, s, Me-12), 1.62 (3H, s, Me-14), 1.67 (3H, s, OAc-1), 1.69 (3H, s, Me-13), 1.74 (3H, s, Me-15), 1.91 (3H, s, OAc-8), 2.22 (1H, dd, <i>J</i> = 3.1, 15.3 Hz, H-3α), 2.32 (1H, dd, <i>J</i> = 3.4, 15.3 Hz, H-3β), 2.68 (1H, d, <i>J</i> = 3.2 Hz, H-7), 3.08 (1H, s, OH-4), 5.39 (1H, d, <i>J</i> = 6.2 Hz, H-9), 5.63 (1H, d, <i>J</i> = 3.7 Hz, H-1), 5.79 (1H, dd, <i>J</i> = 3.2, 6.2 Hz, H-8), 5.82 (1H, dd, <i>J</i> = 3.4, 7.0 Hz, H-2), 5.86 (1H, s, H-6), 7.43 (1H, m, ONic), 7.44 (2H, t, <i>J</i> = 7.8 Hz, OBz-9), 7.49 (2H, t, <i>J</i> = 8.0 Hz, OBz-2), 7.57 (1H, tt, <i>J</i> = 1.3, 7.5 Hz, OBz-9), 7.61 (1H, tt, <i>J</i> = 1.3, 7.5 Hz, OBz-2), 7.95 (2H, dd, <i>J</i> = 1.3, 8.5 Hz, OBz-9), 8.09 (2H, dd, <i>J</i> = 1.2, 8.3 Hz, OBz-2), 8.48 (1H, td, <i>J</i> = 1.8, 7.9 Hz, ONic), 8.82 (1H, dd, <i>J</i> = 1.8, 4.9 Hz, ONic), 9.38 (1H, dd, <i>J</i> = 0.6, 2.0 Hz, ONic).</p> <p>RMN-¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 20.4 (<i>c</i>, OAc-1), 20.7 (<i>c</i>, OAc-8), 21.6 (<i>c</i>, C-15), 25.4 (<i>c</i>, C-14), 26.4 (<i>c</i>, C-13), 30.4 (<i>c</i>, C-12), 42.5 (<i>t</i>, C-3), 49.8 (<i>s</i>, C-10), 53.8 (<i>d</i>, C-7), 68.3 (<i>d</i>, C-8), 69.2 (<i>d</i>, C-2), 69.9 (<i>d</i>, C-1), 70.1 (<i>s</i>, C-4), 71.8 (<i>d</i>, C-9), 78.3 (<i>d</i>, C-6), 85.2 (<i>s</i>, C-11), 91.2 (<i>s</i>, C-5), 123.6 (<i>d</i>, ONic), 125.4 (<i>s</i>, ONic), 128.4 (2 \times <i>d</i>, OBz-9), 128.7 (2 \times <i>d</i>, OBz-2), 128.9 (<i>s</i>, OBz-9), 129.5 (2 \times <i>d</i>, OBz-9), 129.7 (<i>s</i>, OBz-2), 130.2 (2 \times <i>d</i>, OBz-2), 133.3 (<i>d</i>, OBz-9), 133.6 (<i>d</i>, OBz-2), 137.6 (<i>d</i>, ONic), 151.6 (<i>d</i>, ONic), 154.0 (<i>d</i>, ONic), 164.5 (<i>s</i>, ONic), 165.6 (<i>s</i>, OBz-9), 165.7 (<i>s</i>, OBz-2), 169.2 (<i>s</i>, OAc-8), 169.6 (<i>s</i>, OAc-1).</p>	
Espectrometría de masas	<p>EM (IE) <i>m/z</i> (%): 715 [M⁺] (2), 700 (2), 629 (9), 578 (13), 470 (5), 414 (1), 228 (3), 202 (4), 124 (12), 105 (100), 77 (9).</p> <p>EMAR (IE) <i>m/z</i>: Calculado para C₃₉H₄₁NO₁₂ [M⁺]: 715.2629, observado 715.2652.</p>	

Sesquiterpeno A10:

(1*R*,2*S*,4*S*,5*R*,6*R*,7*R*,8*S*,9*S*,10*S*)-2,8-Diacetiloxi-6,9-dibenzoiloxi-1,4-dihidroxi-dihidro- β -agarofurano

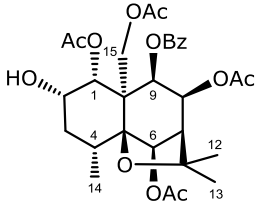
Se obtuvo como sólido amorfo incoloro (32.9 mg).

Datos físicos y espectroscópicos	<p>$[\alpha]_D^{20}$: -16.8° (<i>c</i> 1.04, CHCl₃).</p> <p>UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ): 230 (4.3) nm.</p> <p>IR ν_{\max} (película): 3522, 3018, 2949, 1726, 1275, 1240, 1113, 757, 714 cm⁻¹.</p>	
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN-¹H (CDCl₃, 500 MHz) δ:</p> <p>1.53 (3H, s, Me-14), 1.56 (3H, s, Me-12), 1.66 (3H, s, Me-13), 1.68 (3H, s, Me-15), 1.95 (1H, d, <i>J</i> = 4.8 Hz, OH-1), 2.05 (2H, d, <i>J</i> = 3.1 Hz, H-3), 2.07 (3H, s, OAc-2), 2.21 (3H, s, OAc-8), 2.67 (1H, d, <i>J</i> = 4.2 Hz, H-7), 2.99 (1H, s, OH-4), 4.17 (1H, t, <i>J</i> = 3.4 Hz, H-1), 5.15 (1H, dd, <i>J</i> = 3.4, 6.9 Hz, H-2), 5.55 (1H, t, <i>J</i> = 4.7 Hz, H-8), 5.76 (1H, d, <i>J</i> = 5.4 Hz, H-9), 6.35 (1H, s, H-6), 7.45 (2H, t, <i>J</i> = 7.6 Hz, OBz-9), 7.47 (2H, t, <i>J</i> = 7.6 Hz, OBz-6), 7.57 (1H, t, <i>J</i> = 7.4 Hz, OBz-9), 7.59 (1H, t, <i>J</i> = 7.4 Hz, OBz-6), 8.01 (2H, d, <i>J</i> = 7.9 Hz, OBz-9), 8.20 (2H, d, <i>J</i> = 7.8 Hz, OBz-6).</p> <p>RMN-¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ:</p> <p>13.2 (c, C-15), 21.0 (c, OAc-8), 21.3 (c, OAc-2), 23.8 (c, C-13), 24.8 (c, C-14), 29.5 (c, C-12), 42.3 (t, C-3), 50.7 (s, C-10), 52.5 (d, C-7), 69.9 (s, C-4), 71.5 (d, C-8), 72.5 (d, C-2), 74.2 (d, C-1), 74.4 (d, C-9), 76.0 (d, C-6), 83.2 (s, C-11), 92.2 (s, C-5), 128.5 (2 × d, OBz-9), 128.7 (2 × d, OBz-6), 129.6 (2 × d, OBz-9), 129.7 (s, OBz-9), 130.0 (s, OBz-6), 130.1 (2 × d, OBz-6), 133.2 (d, OBz-9), 133.4 (d, OBz-6), 165.7 (s, OBz-9), 165.8 (s, OBz-6), 170.1 (s, OAc-8), 170.9 (s, OAc-2).</p>	
Espectrometría de masas	<p>EM (IE) <i>m/z</i> (%): 610 [M⁺] (0.1), 472 (2), 270 (2), 202 (4), 148 (6), 105 (100), 83 (17), 77 (17).</p> <p>EMAR (IE) <i>m/z</i>: Calculado para C₃₃H₃₈O₁₁ [M⁺]: 610.2414, observado 610.2428.</p>	

Sesquiterpeno A12:

(1*R*,2*S*,4*R*,5*R*,6*R*,7*R*,8*S*,9*S*,10*S*)-1,6,8,15-Tetraacetiloxi-9-benzoiloxi-2-hidroxi-dihidro- β -agarofurano

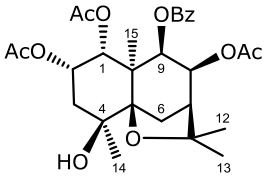
Se obtuvo como sólido amorfo incoloro (1.6 mg).

Datos físicos y espectroscópicos	<p>$[\alpha]_D^{20}$: -13.2° (c 0.08, CHCl₃).</p> <p>UV (EtOH) λ_{max} (log ϵ): 230 (4.0) nm.</p> <p>IR ν_{max} (película): 3477, 2926, 1739, 1276, 1235, 1099, 757, 714 cm⁻¹.</p>	
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN-¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ:</p> <p>1.24 (3H, d, J = 7.7 Hz, Me-14), 1.42 (3H, s, Me-12), 1.57 (3H, s, Me-13), 1.58 (3H, s, OAc-1), 1.86 (1H, d_A, J = 14.6 Hz, H-3α), 2.04 (3H, s, OAc-8), 2.12 (3H, s, OAc-6), 2.28 (3H, s, OAc-15), 2.29 (1H, m, H-4), 2.34 (1H, m, H-3β), 2.44 (1H, d, J = 4.0 Hz, H-7), 4.17 (1H, m, H-2), 4.94, 5.32 (2H, d_{AM}, J = 13.2 Hz, H-15), 5.52 (1H, d, J = 3.7 Hz, H-1), 5.60 (1H, d, J = 6.3 Hz, H-9), 5.63 (1H, dd, J = 4.0, 6.3 Hz, H-8), 6.74 (1H, s, H-6), 7.46 (2H, t, J = 7.9 Hz, OBz), 7.58 (1H, tt, J = 1.2, 7.5 Hz, OBz), 8.03 (2H, dd, J = 1.1, 8.4 Hz, OBz).</p> <p>RMN-¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ:</p> <p>17.0 (c, C-14), 20.7 (c, OAc-1), 21.0 (c, OAc-8), 21.3 (c, OAc-6), 21.5 (c, OAc-15), 24.6 (c, C-13), 30.3 (c, C-12), 32.7 (t, C-3), 32.8 (d, C-4), 51.5 (s, C-10), 53.0 (d, C-7), 60.5 (t, C-15), 68.7 (d, C-2), 69.9 (d, C-8), 72.7 (d, C-9), 74.7 (d, C-6), 79.6 (d, C-1), 81.0 (s, C-11), 90.8 (s, C-5), 128.7 (2 \times d, OBz), 129.3 (s, OBz), 129.6 (2 \times d, OBz), 133.5 (d, OBz), 164.8 (s, OBz), 169.7 (s, OAc-1), 169.8 (s, OAc-6), 170.0 (s, OAc-8), 170.4 (s, OAc-15).</p>	
Espectrometría de masas	<p>EM (IE) m/z (%): 590 [M⁺] (0.2), 548 (2), 397 (1), 306 (2), 218 (4), 188 (4), 105 (100), 83 (8), 77 (14), 57 (17).</p> <p>EMAR (IE) m/z: Calculado para C₃₀H₃₈O₁₂ [M⁺]: 590.2363, observado 590.2376.</p>	

Sesquiterpeno A14:

(1*R*,2*S*,4*S*,5*R*,7*S*,8*S*,9*S*,10*S*)-1,2,8-Triacetiloxi-9-benzoiloxi-4-hidroxi-dihidro- β -agarofurano

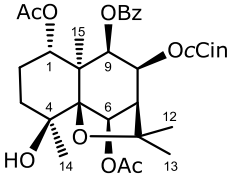
Se obtuvo como sólido amorfo incoloro (0.9 mg).

Datos físicos y espectroscópicos	<p>$[\alpha]_D^{20}$: -12.6° (<i>c</i> 0.04, CHCl₃).</p> <p>UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ): 231 (4.0)nm.</p> <p>IR ν_{\max} (película): 3514, 2921, 1745, 1723, 1274, 1241, 1100, 771, 713 cm⁻¹.</p>	
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN-¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 1.34 (3H, s, Me-12), 1.44 (3H, s, Me-14), 1.49 (3H, s, Me-15), 1.58 (3H, s, Me-13), 1.67 (3H, s, OAc-1), 1.91 (3H, s, OAc-8), 1.98 (1H, d, <i>J</i> = 13.1 Hz, H-6α), 2.01 (1H, dd, <i>J</i> = 3.1, 15.2 Hz, H-3α), 2.05 (3H, s, OAc-2), 2.11 (1H, dd, <i>J</i> = 3.6, 15.2 Hz, H-3β), 2.29 (1H, t, <i>J</i> = 3.9 Hz, H-7), 2.60 (1H, dd, <i>J</i> = 5.0, 13.1 Hz, H-6β), 2.70 (1H, s, OH-4), 5.30 (1H, d, <i>J</i> = 6.1 Hz, H-9), 5.47 (1H, d, <i>J</i> = 3.7 Hz, H-1), 5.48 (1H, dd, <i>J</i> = 3.9, 6.1 Hz, H-8), 5.52 (1H, dd, <i>J</i> = 3.3, 6.8 Hz, H-2), 7.46 (2H, t, <i>J</i> = 7.8 Hz, OBz), 7.58 (1H, t, <i>J</i> = 7.4 Hz, OBz), 8.06 (2H, d, <i>J</i> = 8.1 Hz, OBz).</p> <p>RMN-¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 20.3 (c, OAc-1), 20.7 (c, C-15), 20.9 (c, OAc-8), 21.2 (c, OAc-2), 25.1 (c, C-13), 25.4 (c, C-14), 30.9 (c, C-12), 31.1 (t, C-6), 40.5 (t, C-3), 48.2 (d, C-7), 48.3 (s, C-10), 69.1 (d, C-2), 69.6 (s, C-4), 69.7 (d, C-8), 69.8 (d, C-1), 72.3 (d, C-9), 84.0 (s, C-11), 89.8 (s, C-5), 128.3 (2 \times d, OBz), 129.3 (s, OBz), 130.2 (2 \times d, OBz), 133.4 (d, OBz), 165.8 (s, OBz), 169.6 (s, OAc-1), 169.8 (s, OAc-2), 169.9 (s, OAc-8).</p>	
Espectrometría de masas	<p>EM (IE) <i>m/z</i> (%): 532 [M⁺] (0.2), 517 (5), 395 (11), 377 (3), 293 (3), 251 (2), 233 (4), 215 (4), 173 (8), 135 (4), 105 (100), 97 (6), 77 (20), 57 (17).</p> <p>EMAR (IE) <i>m/z</i>: Calculado para C₂₈H₃₆O₁₀ [M⁺]: 532.2308, observado 532.2318.</p>	

Sesquiterpeno A15:

(1*R*,4*S*,5*R*,6*R*,7*R*,8*S*,9*S*,10*S*)-1,6-Diacetiloxi-9-benzoiloxi-8-(*Z*)-cinamoiloxi-4-hidroxi-dihidro- β -agarofurano

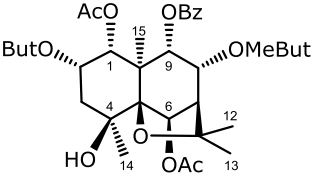
Se obtuvo como sólido amorfo incoloro (16.1 mg).

Datos físicos y espectroscópicos	<p>$[\alpha]_D^{20}$: -64.3° (<i>c</i> 1.34, CHCl₃).</p> <p>UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ): 230 (3.6), 275 (3.3) nm.</p> <p>IR ν_{\max} (película): 3561, 2960, 2940, 1734, 1278, 1235, 1154, 1100, 764, 716 cm⁻¹.</p>	
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN-¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ:</p> <p>1.31 (3H, s, Me-14), 1.43 (3H, s, Me-15), 1.45* (1H, H-2α), 1.49 (3H, s, Me-12), 1.51 (3H, s, Me-13), 1.66 (3H, s, OAc-1), 1.67* (1H, H-3β), 1.87 (1H, m, H-3α), 1.91 (1H, m, H-2β), 2.13 (3H, s, OAc-6), 2.38 (1H, d, <i>J</i> = 3.2 Hz, H-7), 2.84 (1H, s, OH-4), 5.30 (1H, dd, <i>J</i> = 4.1, 12.1 Hz, H-1), 5.40 (1H, d, <i>J</i> = 6.3 Hz, H-9), 5.52 (1H, s, H-6), 5.63 (1H, dd, <i>J</i> = 3.2, 6.3 Hz, H-8), 5.67 (1H, d, <i>J</i> = 12.6 Hz, OcCin), 6.90 (1H, d, <i>J</i> = 12.6 Hz, OcCin), 7.35 (3H, m, OBz, OcCin), 7.46 (2H, t, <i>J</i> = 7.8 Hz, OcCin), 7.58 (3H, m, OBz, OcCin), 8.05 (2H, dd, <i>J</i> = 1.1, 8.5 Hz, OBz). * señal solapada</p> <p>RMN-¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ:</p> <p>19.6 (c, C-15), 20.8 (c, OAc-1), 21.5 (c, OAc-6), 23.2 (t, C-2), 23.9 (c, C-14), 26.2 (c, C-13), 30.2 (c, C-12), 38.5 (t, C-3), 49.9 (s, C-10), 53.7 (d, C-7), 68.7 (d, C-8), 70.4 (s, C-4), 72.2 (d, C-9), 72.3 (d, C-1), 77.5 (d, C-6), 84.7 (s, C-11), 91.3 (s, C-5), 118.5 (d, OcCin), 128.0 (2 \times d, OcCin), 128.3 (2 \times d, OcCin), 129.2 (d, OcCin), 129.3 (s, OBz), 129.9 (2 \times d, OBz), 130.2 (2 \times d, OBz), 133.3 (d, OBz), 134.6 (s, OcCin), 145.1 (d, OcCin), 164.0 (s, OcCin), 165.5 (s, OBz), 169.9 (s, OAc-1), 170.0 (s, OAc-6).</p>	
Espectrometría de masas	<p>EM (IE) <i>m/z</i> (%): 578 [M⁺] (0.1), 550 (2), 472 (3), 353 (1), 256 (1), 202 (4), 189 (4), 149 (7), 105 (100), 77 (14), 57 (15).</p> <p>EMAR (IE) <i>m/z</i>: Calculado para C₃₃H₃₈O₉ [M⁺]: 578.2516, observado 578.2502.</p>	

Sesquiterpeno A20:

(1*R*,2*S*,4*S*,5*R*,6*R*,7*R*,8*R*,9*R*,10*S*)-1,6-Diacetiloxi-9-benzoiloxi-2-butiriloxi-8-metilbutiriloxi-4-hidroxi-dihidro- β -agarofurano

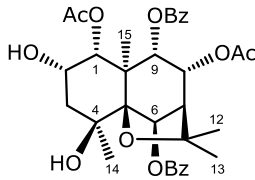
Se obtuvo como sólido amorfo incoloro (1.4 mg).

Datos físicos y espectroscópicos	<p>$[\alpha]_D^{20}$: +34.8° (<i>c</i> 0.01, CHCl₃).</p> <p>UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ): 228 (3.9) nm.</p> <p>IR ν_{\max} (película): 3414, 2919, 1729, 1226, 1106, 711 cm⁻¹.</p>	
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN-¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ:</p> <p>0.77 (3H, t, <i>J</i> = 7.6 Hz, OMeBut), 0.96 (3H, t, <i>J</i> = 7.5 Hz, OBut), 1.14 (3H, d, <i>J</i> = 7.0 Hz, OMeBut), 1.39 (3H, s, OAc-1), 1.45 (1H, m, OMeBut), 1.54 (3H, s, Me-14), 1.56* (3H, Me-12), 1.63 (1H, m, OMeBut), 1.65 (2H, m, OBut), 1.66 (3H, s, Me-13), 1.75 (3H, s, Me-15), 1.93 (1H, dd, <i>J</i> = 3.0, 15.1 Hz, H-3α), 2.10 (1H, dd, <i>J</i> = 3.4, 15.1 Hz, H-3β), 2.13 (3H, s, OAc-6), 2.30 (2H, m, OBut), 2.41 (1H, m, OMeBut), 2.43 (1H, d, <i>J</i> = 4.0 Hz, H-7), 2.82 (1H, s, OH-4), 5.26 (1H, d, <i>J</i> = 3.7 Hz, H-1), 5.36 (1H, dd, <i>J</i> = 3.5, 6.8 Hz, H-2), 5.54 (1H, d, <i>J</i> = 5.2 Hz, H-9), 5.55 (1H, dd, <i>J</i> = 4.0, 5.2 Hz, H-8), 6.21 (1H, s, H-6), 7.43 (2H, t, <i>J</i> = 7.8 Hz, OBz), 7.56 (1H, tt, <i>J</i> = 1.1, 7.5 Hz, OBz), 8.01 (2H, dd, <i>J</i> = 1.4, 7.7 Hz, OBz).</p> <p>*señal solapada</p> <p>RMN-¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ:</p> <p>11.6 (c, OMeBut), 13.6 (c, OBut), 14.5 (c, C-15), 16.4 (c, OMeBut), 18.4 (t, OBut), 20.4 (c, OAc-1), 21.6 (c, OAc-6), 23.9 (c, C-13), 25.2 (c, C-14), 26.5 (t, OMeBut), 29.4 (c, C-12), 36.5 (t, OBut), 41.5 (d, OMeBut), 42.0 (t, C-3), 49.8 (s, C-10), 52.8 (d, C-7), 68.5 (d, C-2), 69.6 (s, C-4), 70.5 (d, C-8), 74.6 (d, C-9), 74.9 (d, C-6), 75.2 (d, C-1), 83.5 (s, C-11), 92.3 (s, C-5), 128.5 (2 \times d, OBz), 129.5 (s, OBz), 129.6 (2 \times d, OBz), 133.4 (d, OBz), 164.9 (s, OBz), 169.7 (s, OAc-6), 169.8 (s, OAc-1), 172.3 (s, OBut), 175.1 (s, OMeBut).</p>	
Espectrometría de masas	<p>EM (IE) <i>m/z</i> (%): 660 [M⁺] (0.4), 559 (3), 516 (3), 430 (2), 314 (12), 285 (30), 253 (27), 202 (27), 149 (18), 129 (31), 105 (100), 83 (32), 73 (53), 57 (89).</p> <p>EMAR (IE) <i>m/z</i>: Calculado para C₃₅H₄₈O₁₂ [M⁺]: 660.3146, observado 660.3142.</p>	

Sesquiterpeno A21:

(1*R*,2*S*,4*S*,5*R*,6*R*,7*R*,8*R*,9*R*,10*S*)-1,8-Diacetiloxi-6,9-dibenzoiloxi-2,4-dihidroxi-dihidro- β -agarofurano

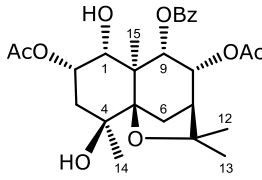
Se obtuvo como sólido amorfo incoloro (48.2 mg).

Datos físicos y espectroscópicos	<p>$[\alpha]_D^{20}$: -16.9° (<i>c</i> 0.21, CHCl₃).</p> <p>UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ): 231 (4.4) nm.</p> <p>IR ν_{\max} (película): 3533, 2929, 1724, 1275, 1235, 1112, 756, 714 cm⁻¹.</p>	
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN-1H (CDCl₃, 500 MHz) δ: 1.52 (3H, s, OAc-1), 1.56 (3H, s, Me-12), 1.64 (3H, s, Me-14), 1.67 (3H, s, Me-13), 1.84 (3H, s, Me-15), 2.04 (1H, dd, <i>J</i> = 3.5, 14.5 Hz, H-3β), 2.12 (1H, dd, <i>J</i> = 2.8, 14.5 Hz, H-3α), 2.17 (3H, s, OAc-8), 2.66 (1H, d, <i>J</i> = 4.4 Hz, H-7), 2.97 (1H, s, OH-4), 4.12 (1H, dd, <i>J</i> = 3.4, 6.5 Hz, H-2), 5.29 (1H, d, <i>J</i> = 3.4 Hz, H-1), 5.56 (1H, d, <i>J</i> = 5.3 Hz, H-9), 5.63 (1H, t, <i>J</i> = 4.9 Hz, H-8), 6.33 (1H, s, H-6), 7.47 (4H, t, <i>J</i> = 7.7 Hz, OBz-6, OBz-9), 7.59 (1H, t, <i>J</i> = 7.3 Hz, OBz-6), 7.60 (1H, t, <i>J</i> = 7.3 Hz, OBz-9), 8.06 (2H, d, <i>J</i> = 8.2 Hz, OBz-9), 8.21 (2H, d, <i>J</i> = 8.1 Hz, OBz-6).</p> <p>RMN-13C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 15.0 (c, C-15), 20.7 (c, OAc-1), 21.0 (c, OAc-8), 23.9 (c, C-13), 25.2 (c, C-14), 29.5 (c, C-12), 44.0 (t, C-3), 50.1 (s, C-10), 52.4 (d, C-7), 68.9 (d, C-2), 69.9 (s, C-4), 70.9 (d, C-8), 74.8 (d, C-9), 75.9 (d, C-6), 77.4 (d, C-1), 83.3 (s, C-11), 92.7 (s, C-5), 128.6 (2 \times d, OBz-6), 128.7 (2 \times d, OBz-9), 129.5 (2 \times d, OBz-9), 129.7 (s, OBz-6), 129.8 (s, OBz-9), 130.1 (2 \times d, OBz-6), 133.4 (d, OBz-6), 133.5 (d, OBz-9), 164.9 (s, OBz-9), 165.9 (s, OBz-6), 169.8 (s, OAc-1), 169.9 (s, OAc-8).</p>	
Espectrometría de masas	<p>EM (IE) <i>m/z</i> (%): 595 [M - CH₃]⁺ (1), 550 (6), 532 (5), 428 (5), 368 (2), 263 (3), 202 (9), 149 (5), 105 (100), 77 (9).</p> <p>EMAR (IE) <i>m/z</i>: Calculado para C₃₂H₃₅O₁₁ [M - CH₃]⁺: 595.2179, observado 595.2167.</p>	

Sesquiterpeno A22:

(1*R*,2*S*,4*S*,5*R*,7*S*,8*R*,9*R*,10*S*)-2,8-Diacetiloxi-9-benzoiloxi-1,4-dihidroxi-dihidro- β -agarofurano

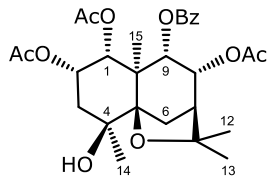
Se obtuvo como sólido amorfo incoloro (1.5 mg).

Datos físicos y espectroscópicos	<p>$[\alpha]_D^{20}$: -14.3° (<i>c</i> 0.12, CHCl₃).</p> <p>UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ): 229 (4.1) nm.</p> <p>IR ν_{\max} (película): 3495, 2929, 1737, 1277, 1238, 1112, 756, 712 cm⁻¹.</p>	
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN-¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 1.33 (3H, s, Me-12), 1.44 (3H, s, Me-14), 1.53 (3H, s, Me-15), 1.59 (3H, s, Me-13), 1.80 (1H, d_A, <i>J</i> = 3.6 Hz, OH-1), 1.95 (1H, dd_A, <i>J</i> = 3.7, 15.0 Hz, H-3α), 2.03 (1H, dd, <i>J</i> = 3.0, 15.0 Hz, H-3β), 2.07 (3H, s, OAc-8), 2.08 (3H, s, OAc-2), 2.31 (1H, t, <i>J</i> = 4.0 Hz, H-7), 2.34 (1H, dd, <i>J</i> = 4.5, 12.6 Hz, H-6α), 2.43 (1H, d, <i>J</i> = 12.6 Hz, H-6β), 2.57 (1H, s, OH-4), 4.11 (1H, t_A, <i>J</i> = 3.6 Hz, H-1), 5.15 (1H, dd, <i>J</i> = 3.6, 6.8 Hz, H-2), 5.48 (1H, t, <i>J</i> = 4.7 Hz, H-8), 5.71 (1H, d, <i>J</i> = 5.1 Hz, H-9), 7.43 (2H, t, <i>J</i> = 8.1 Hz, OBz), 7.55 (1H, tt, <i>J</i> = 1.5, 7.5 Hz, OBz), 7.99 (2H, dd, <i>J</i> = 1.2, 8.3 Hz, OBz).</p> <p>RMN-¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 12.7 (c, C-15), 21.1 (c, OAc-8), 21.4 (c, OAc-2), 22.6 (c, C-13), 24.9 (c, C-14), 25.9 (t, C-6), 29.5 (c, C-12), 40.5 (t, C-3), 47.6 (d, C-7), 48.5 (s, C-10), 69.2 (s, C-4), 70.5 (d, C-8), 72.8 (d, C-2), 74.3 (d, C-1), 75.3 (d, C-9), 82.0 (s, C-11), 91.8 (s, C-5), 128.4 (2 \times d, OBz), 129.5 (2 \times d, OBz), 130.2 (s, OBz), 133.0 (d, OBz), 165.7 (s, OBz), 169.8 (s, OAc-8), 170.8 (s, OAc-2).</p>	
Espectrometría de masas	<p>EM (IE) <i>m/z</i> (%): 491 [M + H]⁺ (0.2), 430 (2), 412 (2), 265 (1), 233 (2), 205 (2), 173 (2), 166 (2), 137 (3), 125 (2), 109 (4), 105 (100), 95 (4), 83 (3), 77 (17).</p> <p>EMAR (IE) <i>m/z</i>: Calculado para C₂₆H₃₅O₉ [M + H]⁺: 491.2281, observado 490.2267.</p>	

Sesquiterpeno A23:

(1*R*,2*S*,4*S*,5*R*,7*S*,8*R*,9*R*,10*S*)-1,2,8-Triacetiloxi-9-benzoiloxi-4-hidroxi-dihidro- β -agarofurano

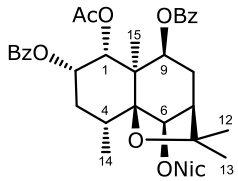
Se obtuvo como sólido amorfo incoloro (1.1 mg).

Datos físicos y espectroscópicos	<p>$[\alpha]_D^{20}$: -7.8° (c 0.05, CHCl₃).</p> <p>UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ): 229 (3.7) nm.</p> <p>IR ν_{\max} (película): 3467, 2923, 1743, 1277, 1235, 1026, 713 cm⁻¹.</p>	
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN-¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 1.34 (3H, s, Me-12), 1.41 (3H, s, OAc-1), 1.49 (3H, s, Me-14), 1.59 (3H, s, Me-13), 1.63 (3H, s, Me-15), 1.97 (1H, dd, $J = 3.0, 15.1$ Hz, H-3β), 2.04 (1H, dd, $J = 3.8, 15.1$ Hz, H-3α), 2.05 (3H, s, OAc-2), 2.06 (3H, s, OAc-8), 2.30 (1H, t, $J = 3.8$ Hz, H-7), 2.36 (1H, ddd, $J = 1.2, 4.0, 12.7$ Hz, H-6β), 2.43 (1H, d, $J = 12.7$ Hz, H-6α), 2.59 (1H, d, $J = 1.3$ Hz, OH-4), 5.23 (1H, d, $J = 3.7$ Hz, H-1), 5.35 (1H, dd, $J = 3.7, 7.0$ Hz, H-2), 5.49 (1H, t, $J = 4.4$ Hz, H-8), 5.55 (1H, d, $J = 5.2$ Hz, H-9), 7.45 (2H, t, $J = 7.6$ Hz, OBz), 7.57 (1H, tt, $J = 1.5, 7.4$ Hz, OBz), 8.01 (2H, dd, $J = 1.5, 8.5$ Hz, OBz).</p> <p>RMN-¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 13.9 (c, C-15), 20.4 (c, OAc-1), 21.0 (c, OAc-2), 21.2 (c, OAc-8), 22.7 (c, C-13), 25.0 (c, C-14), 25.7 (t, C-6), 29.4 (c, C-12), 40.5 (t, C-3), 47.5 (s, C-10), 47.7 (d, C-7), 69.1 (s, C-4), 69.2 (d, C-2), 70.1 (d, C-8), 74.9 (d, C-9), 75.3 (d, C-1), 82.3 (s, C-11), 91.7 (s, C-5), 128.5 (2 \times d, OBz), 129.4 (s, OBz), 129.9 (2 \times d, OBz), 133.2 (d, OBz), 164.9 (s, OBz), 169.7 (s, OAc-2), 169.7 (s, OAc-8), 169.9 (s, OAc-1).</p>	
Espectrometría de masas	<p>EM (IE) m/z (%): 532 [M⁺] (2), 472 (17), 430 (4), 411 (11), 335 (3), 307 (12), 260 (19), 233 (9), 139 (9), 105 (100), 77 (15).</p> <p>EMAR (IE) m/z: Calculado para C₂₈H₃₆O₁₀ [M⁺]: 532.2308, observado 532.2294.</p>	

Sesquiterpeno A24:

(1*R*,2*S*,4*R*,5*R*,6*R*,7*R*,9*S*,10*R*)-1-Acetiloxi-2,9-dibenzoiloxi-6-nicotinoiloxi-dihidro-β-agarofurano

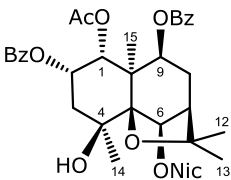
Se obtuvo como sólido amorfo incoloro (1.5 mg).

Datos físicos y espectroscópicos	$[\alpha]_D^{20}$:	+31.4° (<i>c</i> 0.03, CHCl ₃).	
	UV (EtOH) λ _{max} (log ε):	228 (5.0), 264 (4.3) nm.	
IR ν _{max} (película):	2925, 1720, 1276, 1231, 1104, 769, 712 cm ⁻¹ .		
Resonancia magnética nuclear	RMN-¹H (CDCl ₃ , 600 MHz) δ:	1.34 (3H, d, <i>J</i> = 7.5 Hz, Me-14), 1.47 (6H, s, Me-12, Me-13), 1.61 (3H, s, OAc), 1.66 (3H, s, Me-15), 2.02 (1H, ddd, <i>J</i> = 0.8, 2.6, 14.7 Hz, H-3α), 2.27 (1H, dd, <i>J</i> = 3.2, 16.5 Hz, H-8β), 2.44 (1H, t, <i>J</i> = 3.2 Hz, H-7), 2.59 (1H, m, H-4), 2.61 (1H, m, H-8α), 2.62 (1H, m, H-3β), 5.05 (1H, d, <i>J</i> = 7.0 Hz, H-9), 5.75 (1H, d, <i>J</i> = 3.8 Hz, H-1), 5.76 (1H, d, <i>J</i> = 0.7 Hz, H-6), 5.91 (1H, dd, <i>J</i> = 3.4, 6.9 Hz, H-2), 7.43 (2H, t, <i>J</i> = 7.7 Hz, OBz-9), 7.45* (1H, ONic), 7.46 (2H, t, <i>J</i> = 7.7 Hz, OBz-2), 7.55 (1H, t, <i>J</i> = 7.7 Hz, OBz-2), 7.58 (1H, t, <i>J</i> = 7.4 Hz, OBz-9), 7.97 (2H, dd, <i>J</i> = 1.1, 8.4 Hz, OBz-2), 8.08 (2H, dd, <i>J</i> = 1.3, 8.4 Hz, OBz-9), 8.32 (1H, td, <i>J</i> = 1.8, 8.1 Hz, ONic), 8.84 (1H, dd, <i>J</i> = 1.6, 4.8 Hz, ONic), 9.27 (1H, dd, <i>J</i> = 0.7, 2.2 Hz, ONic). * señal solapada	
	RMN-¹³C (CDCl ₃ , 150 MHz) δ:	19.1 (c, C-14), 20.4 (c, OAc), 20.8 (c, C-15), 26.0 (c, C-13), 30.9 (c, C-12), 31.1 (t, C-3), 31.8 (t, C-8), 34.0 (d, C-4), 49.0 (d, C-7), 50.0 (s, C-10), 70.6 (d, C-2), 71.2 (d, C-1), 72.9 (d, C-9), 80.5 (d, C-6), 83.0 (s, C-11), 89.7 (s, C-5), 123.6 (d, ONic), 125.8 (s, ONic), 128.3 (2 × d, OBz-2), 128.5 (2 × d, OBz-9), 129.3 (s, OBz-9), 129.5 (2 × d, OBz-2), 130.1 (2 × d, OBz-9), 130.2 (s, OBz-2), 133.0 (d, OBz-2), 133.4 (d, OBz-9), 137.0 (d, ONic), 150.8 (d, ONic), 154.0 (d, ONic), 164.5 (s, ONic), 165.5 (s, OBz-9), 166.1 (s, OBz-2), 169.7 (s, OAc).	
Espectrometría de masas	EM (IE) <i>m/z</i> (%):	642 [M + H] ⁺ (2), 627 (2), 414 (2), 228 (5), 175 (4), 124 (16), 106 (66), 105 (100), 83 (6), 77 (15), 57 (8).	
	EMAR (IE) <i>m/z</i> :	Calculado para C ₃₇ H ₄₀ NO ₉ [M + H] ⁺ : 642.2703, observado 642.2684.	

Sesquiterpeno A25:

(1*R*,2*S*,4*S*,5*R*,6*R*,7*R*,9*S*,10*R*)-1-Acetiloxi-2,9-dibenzoiloxi-4-hidroxi-6-nicotinoiloxi-dihidro-β-agarofurano

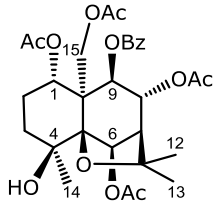
Se obtuvo como sólido amorfo incoloro (1.1 mg).

Datos físicos y espectroscópicos	$[\alpha]_D^{20}$:	+34.9° (c 0.17, CHCl ₃).	
	UV (EtOH) λ _{max} (log ε):	228 (4.0), 263 (3.3) nm.	
IR ν _{max} (película):	3542, 2924, 2854, 1721, 1277, 1106, 757, 712 cm ⁻¹ .		
Resonancia magnética nuclear	RMN-¹H (CDCl ₃ , 500 MHz) δ:	1.55 (3H, s, Me-13), 1.58* (3H, Me-12), 1.64 (6H, s, OAc-1, Me-14), 1.69 (3H, s, Me-15), 2.22 (1H, dd, <i>J</i> = 3.3, 15.3 Hz, H-3α), 2.28 (1H, dd, <i>J</i> = 3.4, 16.8 Hz, H-8β), 2.33 (1H, dd, <i>J</i> = 3.8, 15.3 Hz, H-3β), 2.42 (1H, t, <i>J</i> = 3.4 Hz, H-7), 2.65 (1H, ddd, <i>J</i> = 3.4, 7.0, 16.8 Hz, H-8α), 3.16 (1H, s, OH-4), 5.09 (1H, d, <i>J</i> = 6.8 Hz, H-9), 5.64 (1H, d, <i>J</i> = 3.6 Hz, H-1), 5.84 (1H, dd, <i>J</i> = 3.6, 7.0 Hz, H-2), 5.86 (1H, s, H-6), 7.43* (1H, ONic), 7.44 (2H, t, <i>J</i> = 8.1 Hz, OBz-2), 7.47 (2H, t, <i>J</i> = 8.1 Hz, OBz-9), 7.57 (1H, t, <i>J</i> = 7.4 Hz, OBz-2), 7.59 (1H, t, <i>J</i> = 7.3 Hz, OBz-9), 7.96 (2H, dd, <i>J</i> = 1.2, 7.0 Hz, OBz-2), 8.07 (2H, dd, <i>J</i> = 1.5, 8.4 Hz, OBz-9), 8.52 (1H, td, <i>J</i> = 2.0, 8.0 Hz, ONic), 8.82 (1H, dd, <i>J</i> = 1.6, 4.8 Hz, ONic), 9.39 (1H, d, <i>J</i> = 1.6 Hz, ONic).	
		* señal solapada, datos obtenidos a partir de un experimento HMBC.	
	RMN-¹³C (CDCl ₃ , 150 MHz) δ:	20.4 (c, OAc-1), 21.8 (c, C-15), 25.5 (c, C-14), 25.9 (c, C-13), 29.8 (c, C-12), 31.3 (t, C-8), 42.5 (t, C-3), 49.1 (d, C-7), 51.3 (s, C-10), 69.4 (d, C-2), 70.1 (s, C-4), 70.2 (d, C-1), 72.5 (d, C-9), 80.4 (d, C-6), 85.0 (s, C-11), 91.4 (s, C-5), 123.7 (d, ONic), 125.8 (s, ONic), 128.4 (2 × d, OBz-9), 128.6 (2 × d, OBz-2), 129.1 (s, OBz-2), 129.5 (2 × d, OBz-2), 129.9 (s, OBz-9), 130.1 (2 × d, OBz-9), 133.2 (d, OBz-2), 133.5 (d, OBz-9), 137.7 (d, ONic), 151.6 (d, ONic), 153.9 (d, ONic), 164.8 (s, ONic), 165.4 (s, OBz-9), 165.7 (s, OBz-2), 169.6 (s, OAc-1).	
Espectrometría de masas	EM (IE) <i>m/z</i> (%):	657 [M ⁺] (1), 642 (1), 571 (11), 520 (6), 412 (10), 571 (11), 520 (6), 290 (3), 228 (5), 202 (8), 151 (4), 124 (14), 105 (100), 77 (12).	
	EMAR (IE) <i>m/z</i> :	Calculado para C ₃₇ H ₃₉ NO ₁₀ [M ⁺]: 657.2574, observado 657.2557.	

Sesquiterpeno A28:

(1*R*,4*S*,5*R*,6*R*,7*R*,8*R*,9*S*,10*S*)-1,6,8,15-Tetraacetiloxi-9-benzoiloxi-4-hidroxi-dihidro- β -agarofurano

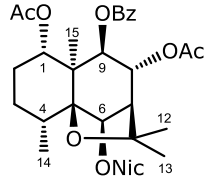
Se obtuvo como sólido amorfo incoloro (2.4 mg).

Datos físicos y espectroscópicos	<p>$[\alpha]_D^{20}$: -23.8° (<i>c</i> 0.10, CHCl₃).</p> <p>UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ): 232 (4.1) nm.</p> <p>IR ν_{\max} (película): 3561, 2930, 1740, 1233, 1097, 757, 714 cm⁻¹.</p>	
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN-¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 1.33 (3H, s, Me-14), 1.49 (3H, s, OAc-1), 1.53 (1H, m, H-2α), 1.56 (3H, s, Me-12), 1.63 (3H, s, Me-13), 1.72 (1H, td, <i>J</i> = 3.5, 14.0 Hz, H-3α), 1.97 (1H, dt, <i>J</i> = 4.6, 14.0 Hz, H-3β), 2.02 (1H, m, H-2β), 2.11 (3H, s, OAc-8), 2.20 (3H, s, OAc-6), 2.28 (3H, s, OAc-15), 2.33 (1H, d, <i>J</i> = 2.9 Hz, H-7), 2.66 (1H, s, OH-4), 4.60, 4.68 (2H, d_{AB}, <i>J</i> = 12.9 Hz, H-15), 5.27 (1H, d, <i>J</i> = 2.9 Hz, H-8), 5.45 (1H, dd, <i>J</i> = 4.5, 12.1 Hz, H-1), 5.56 (1H, s, H-9), 6.49 (1H, s, H-6), 7.46 (2H, t, <i>J</i> = 7.7 Hz, OBz), 7.60 (1H, t, <i>J</i> = 7.3 Hz, OBz), 8.02 (2H, dd, <i>J</i> = 1.2, 8.3 Hz, OBz).</p> <p>RMN-¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 20.7 (c, OAc-1), 21.2 (c, OAc-15), 21.3 (c, OAc-6), 21.5 (c, OAc-8), 23.1 (c, C-14), 23.7 (t, C-2), 25.5 (c, C-13), 29.5 (c, C-12), 37.8 (t, C-3), 53.2 (d, C-7), 53.6 (s, C-10), 65.2 (t, C-15), 70.3 (s, C-4), 72.6 (d, C-1), 73.5 (d, C-9), 75.3 (d, C-6), 76.5 (d, C-8), 83.0 (s, C-11), 91.6 (s, C-5), 128.4 (s, OBz), 128.5 (2 × d, OBz), 130.1 (2 × d, OBz), 133.9 (d, OBz), 164.6 (s, OBz), 169.6 (2 × s, OAc-1, OAc-6), 170.0 (s, OAc-8), 170.6 (s, OAc-15).</p>	
Espectrometría de masas	<p>EM (IE) <i>m/z</i> (%): 591 [M + H]⁺ (0.1), 530 (4), 488 (3), 351 (1), 306 (2), 288 (1), 246 (8), 202 (9), 164 (12), 105 (100), 83 (11), 77 (11).</p> <p>EMAR (IE) <i>m/z</i>: Calculado para C₃₀H₃₉O₁₂ [M + H]⁺: 591.2442, observado 591.2462.</p>	

Sesquiterpeno A30:

(1*R*,4*R*,5*R*,6*R*,7*R*,8*R*,9*S*,10*S*)-1,8-Diacetiloxi-9-benzoiloxi-6-nicotinoiloxi-dihidro- β -agarofurano

Se obtuvo como sólido amorfo incoloro (3.0 mg).

Datos físicos y espectroscópicos	<p>$[\alpha]_D^{20}$: +4.9° (c 0.06, CHCl₃).</p> <p>UV (EtOH) λ_{max} (log ϵ): 228 (4.0), 264 (3.4) nm.</p> <p>IR ν_{max} (película): 2926, 1726, 1274, 1230, 1101, 756, 712 cm⁻¹.</p>	
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN-¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 1.06 (3H, d, <i>J</i> = 7.6 Hz, Me-14), 1.45 (3H, s, Me-12), 1.50* (1H, H-3α), 1.52 (6H, s, Me-13, Me-15), 1.61 (3H, s, OAc-1), 1.64* (1H, H-2α), 1.93 (1H, m, H-2β), 2.27* (1H, H-3β), 2.28 (3H, s, OAc-8), 2.46 (1H, m, H-4), 2.67 (1H, d, <i>J</i> = 3.2 Hz, H-7), 5.09 (1H, s, H-9), 5.31 (1H, d, <i>J</i> = 3.3 Hz, H-8), 5.45 (1H, dd, <i>J</i> = 4.2, 11.8 Hz, H-1), 5.98 (1H, s, H-6), 7.45* (1H, ONic), 7.46 (2H, t, <i>J</i> = 7.8 Hz, OBz), 7.58 (1H, t, <i>J</i> = 7.4 Hz, OBz), 8.07 (2H, dd, <i>J</i> = 1.3, 8.5 Hz, OBz), 8.30 (1H, td, <i>J</i> = 1.7, 7.9 Hz, ONic), 8.83 (1H, s_A, ONic), 9.24 (1H, s_A, ONic). * señal solapada</p> <p>RMN-¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 17.4 (c, C-14), 18.7 (c, C-15), 20.8 (c, OAc-1), 21.2 (t, C-2), 21.3 (c, OAc-8), 25.6 (c, C-13), 26.7 (t, C-3), 31.2 (c, C-12), 34.2 (d, C-4), 50.1 (s, C-10), 53.1 (d, C-7), 73.5 (d, C-1), 76.1 (d, C-8), 76.9 (d, C-9), 77.1 (d, C-6), 81.9 (s, C-11), 90.5 (s, C-5), 123.6 (d, ONic), 125.8 (s, ONic), 128.4 (2 \times d, OBz), 128.9 (s, OBz), 130.1 (2 \times d, OBz), 133.6 (d, OBz), 137.0 (d, ONic), 150.8 (d, ONic), 153.9 (d, ONic), 164.3 (s, ONic), 164.9 (s, OBz), 169.5 (s, OAc-8), 170.0 (s, OAc-1).</p>	
Espectrometría de masas	<p>EM (IE) <i>m/z</i> (%): 579 [M⁺] (9), 564 (6), 458 (8), 381 (4), 245 (11), 175 (4), 131 (7), 124 (25), 105 (100), 83 (8), 77 (16), 57 (5).</p> <p>EMAR (IE) <i>m/z</i>: Calculado para C₃₂H₃₇NO₉ [M⁺]: 579.2468, observado 579.2452.</p>	

3.3.3 | Procedimiento general de la preparación de una quimioteca de derivados agarofuránicos

Con el objetivo de **modular la actividad revertidora de la multirresistencia a fármacos en cáncer** (MDR), se preparó una quimioteca de 81 análogos, que hemos denominado del **2a** al **82a**, mediante reacciones de oxidación, reducción, esterificación, sustitución nucleofílica, eliminación y halogenación.

Para llevar a cabo las reacciones de esterificación con ácidos carboxílicos y análogos con diferentes características estéreoeléctricas (Fig. **3.98**), se formaron los correspondientes cloruros de ácidos con cloruro de oxalilo, anhídridos con dicitclohexil carbodiimida (DCC), o se esterificó con los ácidos carboxílicos en presencia de DCC, en disolventes secos tales como tolueno, diclorometano, cloroformo, acetato de etilo (AcOEt) o 2,6-lutidina y, generalmente, en atmósfera de argón (Ar).

Los derivados se basan en la estructura de dos metabolitos mayoritarios **A17** y **A18**, aislados de las hojas de *C. vulcanicola*, como se indicó anteriormente. Por otra parte, dar cuenta de formación de productos minoritarios como resultado de la isomerización del doble enlace del *trans*-cinamato.

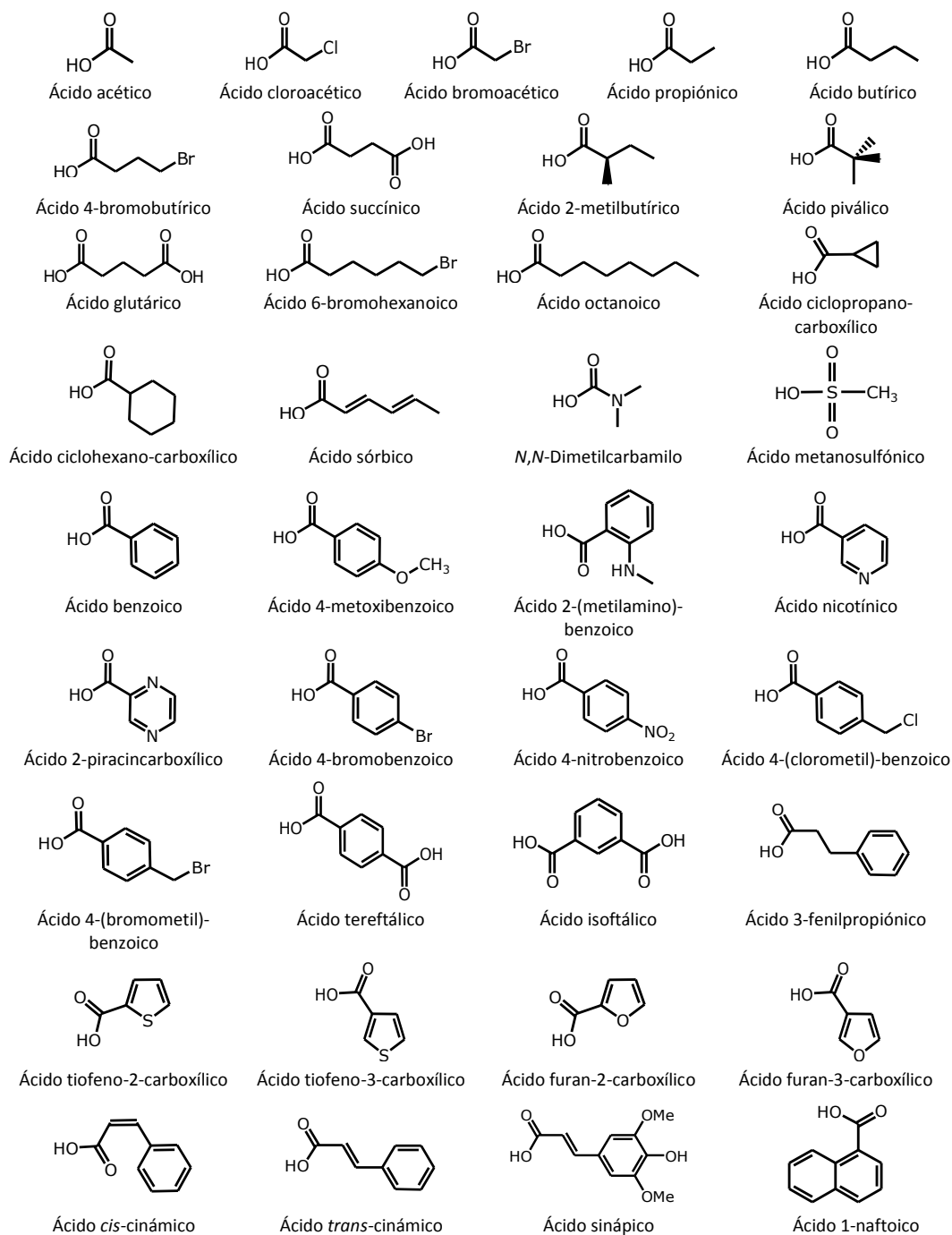
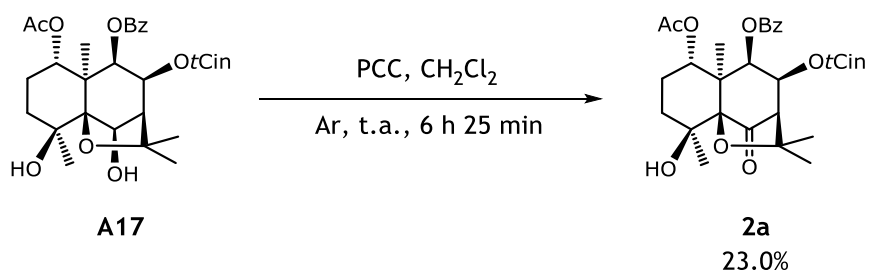


Fig. 3.98 | Ácidos carboxílicos y análogos empleados para las modificaciones estructurales de los sesquiterpenos en forma de ácido, cloruro de ácido o anhídrido.

3.3.4 | Condiciones de reacción, datos físicos, espectrométricos y espectroscópicos de los análogos de los sesquiterpenos dihidro-β-agarofuranos

Preparación del derivado 2a

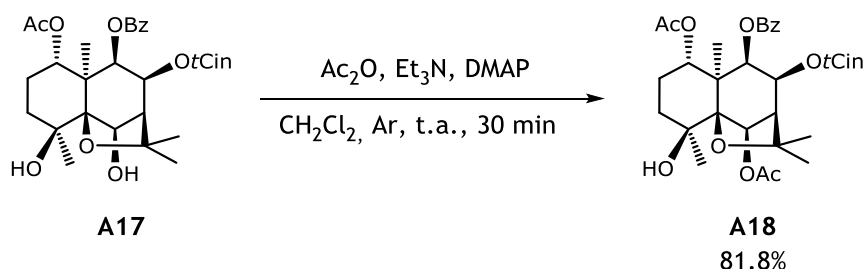


A una disolución de **A17** (6.1 mg, 0.011 mmol) en 1.5 mL de CH₂Cl₂ seco, bajo atmósfera de argón y a 0 °C, se le adicionó una suspensión de clorocromato de piridinio (9.5 mg, 0.044 mmol) en 1.5 mL de CH₂Cl₂ seco. La reacción se agitó durante 6 h 25 min a temperatura ambiente. Trascurrido este tiempo, se filtró sobre celita, se lavó tres veces con AcOEt y se eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo se fraccionó por CC de gel de sílice usando un gradiente de CH₂Cl₂-acetona y, posteriormente, se purificó mediante CCF preparativa de gel de sílice [hexanos-AcOEt (5:2) y hexanos-1,4-dioxano (13:7)]. Así, se obtuvo el derivado **2a** como un sólido amorfo (1.4 mg, 23.0% de rendimiento).

Derivado 2a

Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo incoloro (1.4 mg).</p> <p>$[\alpha]_D^{20}$: -113.1° (c 0.14, CHCl₃).</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 1.29 (3H, s, Me-15), 1.30 (3H, s, Me-12), 1.55* (1H, H-2α), 1.62* (1H, H-3α), 1.70 (3H, s, Me-14), 1.75 (3H, s, Me-13), 1.76 (3H, s, OAc), 1.89 (1H, m, H-3β), 1.92 (1H, m, H-2β), 2.73 (1H, d, J = 3.6 Hz, H-7), 5.49 (1H, dd, J = 4.4, 11.9 Hz, H-1), 5.50 (1H, d, J = 6.1 Hz, H-9), 5.59 (1H, dd, J = 3.6, 6.1 Hz, H-8), 6.22 (1H, d, J = 16.0 Hz, OtCin), 7.28 (2H, d, J = 8.1 Hz, OtCin), 7.32 (2H, t, J = 7.6 Hz, OtCin), 7.36 (1H, t, J = 7.0 Hz, OtCin), 7.43 (1H, d, J = 16.0 Hz, OtCin), 7.48 (2H, t, J = 7.9 Hz, OBz), 7.62 (1H, tt, J = 1.2, 7.5 Hz, OBz), 8.10 (2H, dd, J = 1.6, 8.1 Hz, OBz). * señal solapada.</p> <p>RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 16.7 (c, C-14), 20.7 (c, C-15), 21.1 (c, OAc), 23.8 (t, C-2), 25.0 (c, C-13), 30.0 (c, C-12), 38.3 (t, C-3), 50.6 (s, C-10), 60.1 (d, C-7), 69.4 (d, C-8), 70.5 (s, C-4), 71.1 (d, C-1), 72.0 (d, C-9), 78.8 (s, C-11), 86.2 (s, C-5), 116.7 (d, OtCin), 128.2 (2 × d, OtCin), 128.5 (2 × d, OtCin), 128.8 (2 × d, OBz), 129.4 (s, OBz), 130.1 (2 × d, OBz), 130.6 (d, OtCin), 133.4 (d, OBz), 133.9 (s, OtCin), 146.1 (d, OtCin), 164.6 (s, OtCin), 165.7 (s, OBz), 169.9 (s, OAc), 206.4 (s, C-6).</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IE) m/z (%): 576 [M⁺] (4), 516 (3), 439 (2), 379 (3), 246 (3), 218 (3), 169 (3), 147 (2), 131 (100), 105 (78), 103 (15), 77 (14), 57 (2).</p> <p>EMAR (IE) m/z: Calculado para C₃₃H₃₆O₉ [M⁺]: 576.2359, observado 576.2346.</p>

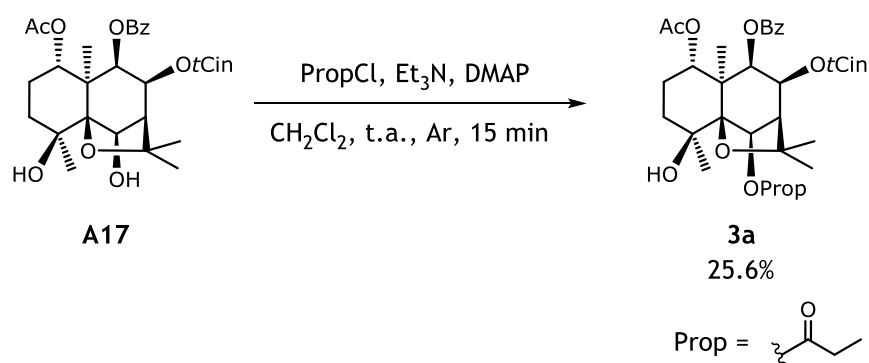
Preparación de A18



A una disolución de **A17** (102.4 mg, 0.177 mmol) en 2 mL de CHCl_2 seco, bajo atmósfera de argón y a temperatura ambiente, se le añadieron Et_3N (0.62 mL, 4.45 mmol), anhídrido acético (0.84 mL, 8.89 mmol) y DMAP (30 mg, 0.25 mmol). La reacción se agitó durante 30 min, tras lo cual se adicionó 3 mL de EtOH gota a gota a 0°C . La mezcla se agitó durante 30 min y se llevó a sequedad a presión reducida. El crudo de reacción se redisolvió en CH_2Cl_2 y se lavó, sucesivamente, con 10 mL de HCl 1 M, 10 mL de disolución saturada de NaHCO_3 y 10 mL de disolución saturada de NaCl. La fase orgánica se secó sobre MgSO_4 anhidro, se filtró y se llevó a sequedad en el rotavapor.

El residuo fue fraccionado por cromatografía de exclusión molecular Sephadex LH-20, usando como fase móvil una mezcla de CH_2Cl_2 -MeOH (1:1), cromatografía circular preparativa (CCR, Chromatotron), usando una placa de 2 mm con una mezcla de hexanos-AcOEt (13:7) como eluyente, y mediante CCF preparativa eluyendo con hexanos-AcOEt (3:2). De esta manera, se obtuvieron 89.9 mg del compuesto **A18** (0.14 mmol, 81.8% de rendimiento) como un sólido amorfo, cuyos datos físicos y espectroscópicos fueron coincidentes con el metabolito aislado de *Celastrus vulcanicola*, **A18**.

Preparación del derivado 3a

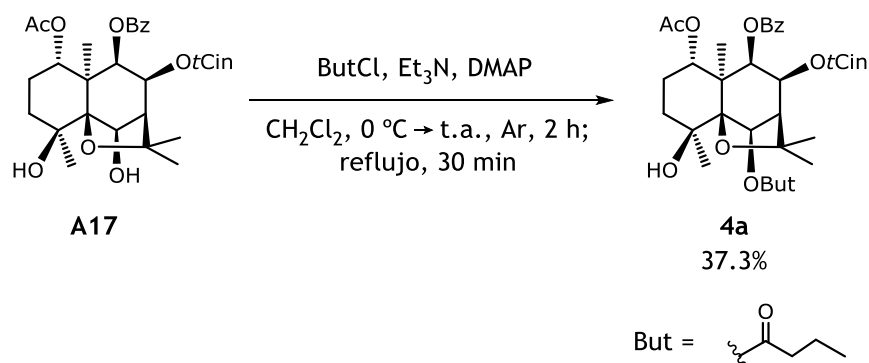


A una disolución de **A17** (5.7 mg, 0.010 mmol) en 0.3 mL de CH₂Cl₂ seco, a temperatura ambiente y bajo atmósfera de argón, se le añadió Et₃N seca (0.1 mL, 0.72 mmol), DMAP (5 mg, 0.04 mmol) y cloruro de propionilo (10 µL, 0.12 mmol). La reacción se agitó durante 15 min hasta observar mediante CCF que la reacción había finalizado, tras lo cual se adicionó 0.1 mL de agua. La mezcla de reacción se diluyó con CH₂Cl₂ (10 mL) y se lavó sucesivamente con HCl (1 M, 10 mL) y disolución saturada de NaHCO₃ (10 mL). La fase orgánica se secó sobre MgSO₄ anhidro, se filtró y se llevó a sequedad a vacío. El crudo se purificó mediante CCF preparativa de gel de sílice con una fase móvil de hexanos-AcOEt (3:2), obteniéndose el producto **3a** (1.6 mg, 25.6% de rendimiento) como un sólido amorfo.

Derivado 3a

Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo incoloro (1.6 mg).</p> <p>$[\alpha]_D^{28}$: -66.5° (c 0.16, CHCl₃).</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 1.33 (3H, s, Me-14), 1.47 (3H, s, Me-15), 1.48* (1H, H-2α), 1.57 (3H, s, Me-12), 1.68 (3H, s, OAc), 1.69* (1H, H-3α), 1.71 (3H, s, Me-13), 1.92 (2H, m, H-2β, H-3β), 2.53 (1H, d_A, J = 3.1 Hz, H-7), 2.86 (1H, s_A, OH-4), 5.36 (1H, dd, J = 3.4, 11.9 Hz, H-1), 5.45 (1H, d, J = 6.5 Hz, H-9), 5.61 (1H, s, H-6), 5.72 (1H, dd, J = 3.1, 6.5 Hz, H-8), 6.21 (1H, d, J = 16.1 Hz, OtCin), 7.24 (2H, d, J = 7.5 Hz, OtCin), 7.30 (2H, t, J = 7.4 Hz, OtCin), 7.34 (1H, t, J = 6.9 Hz, OtCin), 7.38 (1H, d, J = 16.1 Hz, OtCin), 7.44 (2H, t, J = 7.7 Hz, OBz), 7.59 (1H, dt, J = 1.2, 7.5 Hz, OBz), 8.05 (2H, d, J = 8.1 Hz, OBz), OProp [1.19 (3H, t, J = 7.8 Hz), 2.41 (2H, m)]. * señal solapada.</p> <p>RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 19.6 (c, C-15), 20.8 (c, OAc), 23.3 (t, C-2), 24.0 (c, C-14), 26.5 (c, C-13), 30.2 (c, C-12), 38.5 (t, C-3), 49.9 (s, C-10), 53.8 (d, C-7), 69.1 (d, C-8), 70.5 (s, C-4), 72.2 (d, C-1), 72.3 (d, C-9), 77.0* (d, C-6), 84.6 (s, C-11), 91.4 (s, C-5), 117.1 (d, OtCin), 128.1 (2 × d, OtCin), 128.4 (2 × d, OtCin), 128.7 (2 × d, OBz), 129.4 (s, OBz), 130.2 (2 × d, OBz), 130.4 (d, OtCin), 133.3 (d, OBz), 134.0 (s, OtCin), 145.6 (d, OtCin), 164.9 (s, OtCin), 165.5 (s, OBz), 169.9 (s, OAc), OProp [8.9 (c), 28.2 (t), 173.4 (s)]. * señal solapada.</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IE) m/z (%): 634 [M⁺] (0.5), 619 (11), 560 (25), 518 (5), 497 (29), 486 (12), 430 (6), 248 (8), 202 (16), 148 (7), 131 (96), 105 (100), 77 (11), 57 (12).</p> <p>EMAR (IE) m/z: Calculado para C₃₆H₄₂O₁₀ [M⁺]: 634.2778, observado 634.2775.</p>

Preparación del derivado 4a

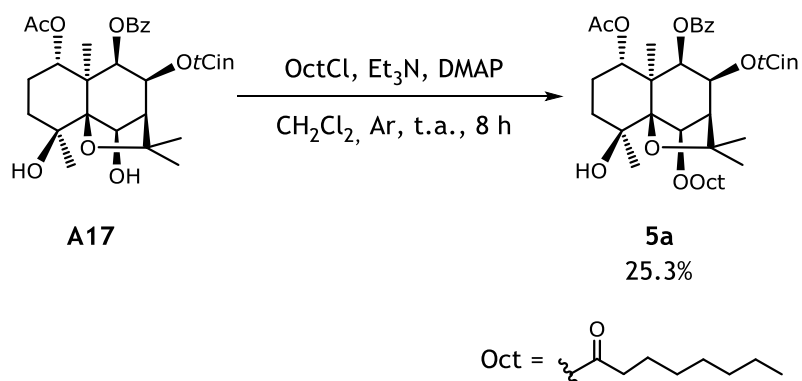


A una disolución de **A17** (6.7 mg, 0.12 mmol) en 0.3 mL de cloroformo seco, a 0 °C y bajo atmósfera de argón, se le añadió de Et₃N seca (0.5 mL, 3.59 mmol), DMAP (8 mg, 0.07 mmol) y anhídrido butírico (25 µL, 0.15 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. Tras no observar ningún avance de la reacción mediante CCF, se calentó a reflujo durante 30 h. Posteriormente, se diluyó con cloroformo (20 mL) y se lavó con disolución saturada de NaHCO₃ (3 × 20 mL). La fase orgánica se secó sobre MgSO₄ anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante CCFP usando como fase móvil una mezcla de hexanos-AcOEt (3:2), obteniéndose 2.8 mg del derivado **4a** como un sólido amorfo (37.3% de rendimiento).

Derivado 4a

Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo incoloro (2.8 mg).</p> <p>$[\alpha]_D^{28}$: -67.4° (c 0.41, CHCl₃).</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 1.33 (3H, s, Me-14), 1.46 (3H, s, Me-15), 1.48* (1H, H-2α), 1.57 (3H, s, Me-12), 1.67 (3H, s, OAc), 1.69* (1H, H-3α), 1.71 (3H, s, Me-13), 1.92 (2H, m, H-2β, H-3β), 2.52 (1H, d, J = 3.3 Hz, H-7), 2.85 (1H, s_A, OH-4), 5.36 (1H, dd, J = 3.7, 11.9 Hz, H-1), 5.45 (1H, d, J = 6.4 Hz, H-9), 5.61 (1H, s, H-6), 5.72 (1H, dd, J = 3.3, 6.4 Hz, H-8), 6.21 (1H, d, J = 16.1 Hz, OtCin), 7.24 (2H, d, J = 7.8 Hz, OtCin), 7.30 (2H, t, J = 7.0 Hz, OtCin), 7.34 (1H, tt, J = 1.4, 7.2 Hz, OtCin), 7.38 (1H, d, J = 16.1 Hz, OtCin), 7.44 (2H, t, J = 7.9 Hz, OBz), 7.58 (1H, tt, J = 1.4, 7.7 Hz, OBz), 8.05 (2H, dd, J = 1.2, 8.5 Hz, OBz), OBut [0.96 (3H, t, J = 7.7 Hz), 1.72* (2H), 2.37 (2H, m)].</p> <p style="text-align: right;">* señal solapada.</p> <p>RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 19.6 (c, C-15), 20.8 (c, OAc), 23.3 (t, C-2), 24.0 (c, C-14), 26.5 (c, C-13), 30.3 (c, C-12), 38.5 (t, C-3), 49.9 (s, C-10), 53.9 (d, C-7), 69.1 (d, C-8), 70.4 (s, C-4), 72.2 (d, C-1), 72.3 (d, C-9), 77.2 (d, C-6), 84.6 (s, C-11), 91.4 (s, C-5), 117.1 (d, OtCin), 128.1 (2 \times d, OtCin), 128.4 (2 \times d, OtCin), 128.7 (2 \times d, OBz), 129.4 (s, OBz), 130.2 (2 \times d, OBz), 130.4 (d, OtCin), 133.3 (d, OBz), 134.0 (s, OtCin), 145.6 (d, OtCin), 164.9 (s, OtCin), 165.5 (s, OBz), 169.9 (s, OAc), OBut [13.7 (c), 18.1 (t), 36.8 (t), 172.6 (s)].</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IE) m/z (%): 648 [M⁺] (0.2), 633 (10), 560 (20), 511 (27), 500 (11), 430 (7), 370 (2), 233 (3), 220 (3), 202 (15), 166 (5), 131 (100), 105 (87), 103 (13), 83 (6), 77 (10), 71 (12), 68 (8).</p> <p>EMAR (IE) m/z: Calculado para C₃₇H₄₄O₁₀ [M⁺] 648.2934, observado 648.2960.</p>

Preparación del derivado 5a

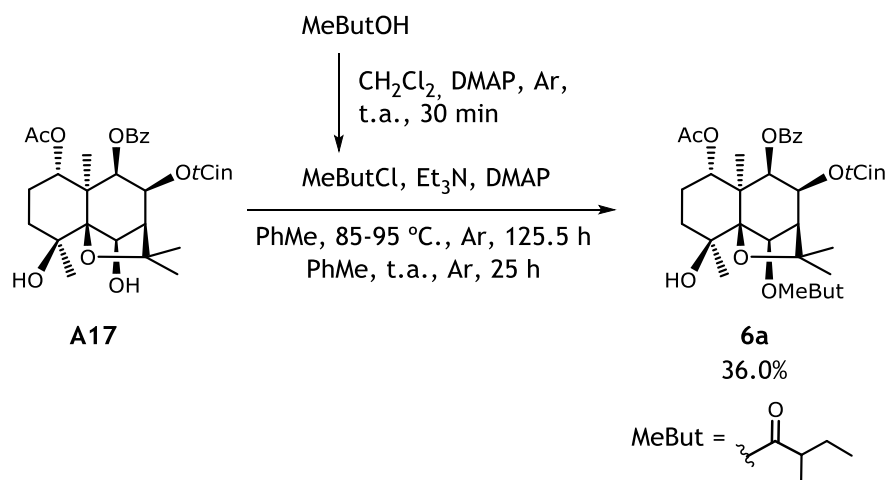


A una disolución de **A17** (5.2 mg, 0.009 mmol) en 1 mL de CH₂Cl₂ seco, a 0 °C y bajo atmósfera de argón, se le añadió Et₃N seca (32 μL, 0.23 mmol), cloruro de octanoílo (70 μL, x mmol) y DMAP (5 mg, 0.04 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 8 h a temperatura ambiente, tras lo cual se llevó a sequedad en el rotavapor. El crudo se fraccionó por CC de gel de sílice con gradientes hexanos-CH₂Cl₂ y hexanos-AcOEt. Posteriormente, se purificó mediante CCFP con hexanos-AcOEt (3:2) como fase móvil, rindiendo el producto **5a** (1.6 mg, 25.3% de rendimiento) como un sólido amorfo.

Derivado 5a

Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo incoloro (1.6 mg).</p> <p>$[\alpha]_D^{28}$: -47.9° (c 0.22, CHCl₃).</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 1.33 (3H, s, Me-14), 1.47 (3H, s, Me-15), 1.49* (1H, H-2α), 1.56 (3H, s, Me-12), 1.67 (3H, s, OAc), 1.70* (1H, H-3α), 1.71 (3H, s, Me-13), 1.91 (1H, m, H-3β), 1.93 (1H, m, H-2β), 2.51 (1H, d, J = 3.3 Hz, H-7), 2.85 (1H, s_A, OH-4), 5.36 (1H, dd, J = 3.6, 11.9 Hz, H-1), 5.45 (1H, d, J = 6.4 Hz, H-9), 5.60 (1H, s, H-6), 5.72 (1H, dd, J = 3.3, 6.4 Hz, H-8), 6.21 (1H, d, J = 16.0 Hz, OtCin), 7.24 (2H, d, J = 7.6 Hz, OtCin), 7.30 (2H, t, J = 7.5 Hz, OtCin), 7.34 (1H, t, J = 7.0 Hz, OtCin), 7.38 (1H, d, J = 16.0 Hz, OtCin), 7.44 (2H, t, J = 7.8 Hz, OBz), 7.59 (1H, t, J = 7.3 Hz, OBz), 8.05 (2H, d, J = 7.8 Hz, OBz), 00ct [0.79–1.01 (8H, señal compleja), 0.87 (3H, t, J = 7.0 Hz), 1.28* (2H), 2.38 (2H, m)]. * señal solapada.</p> <p>RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 19.6 (c, C-15), 20.8 (c, OAc), 23.3 (t, C-2), 24.0 (c, C-14), 26.5 (c, C-13), 30.3 (c, C-12), 38.5 (t, C-3), 49.9 (s, C-10), 53.9 (d, C-7), 69.1 (d, C-8), 70.4 (s, C-4), 72.2 (d, C-1), 72.3 (d, C-9), 77.2* (C-6), 84.6 (s, C-11), 91.4 (s, C-5), 117.1 (d, OtCin), 128.1 (2 \times d, OtCin), 128.4 (2 \times d, OtCin), 128.7 (2 \times d, OBz), 129.4 (s, OBz), 130.2 (2 \times d, OBz), 130.4 (d, OtCin), 133.3 (d, OBz), 134.0 (s, OtCin), 145.6 (d, OtCin), 164.9 (s, OtCin), 165.5 (s, OBz), 169.9 (s, OAc), 00ct [14.1 (c), 22.6 (t), 24.6 (t), 28.9 (t), 29.1 (t), 31.6 (t), 34.8 (t), 172.8 (s)]. * señal solapada.</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IE) m/z (%): 689 [M – CH₃]⁺ (8), 567 (17), 560 (14), 518 (6), 430 (7), 370 (2), 248 (6), 202 (18), 166 (7), 148 (5), 145 (2), 131 (61), 105 (100), 83 (11), 57 (24).</p> <p>EMAR (IE) m/z: Calculado para C₄₀H₄₉O₁₀ [M – CH₃]⁺: 689.3326, observado 689.3300.</p>

Preparación del derivado 6a

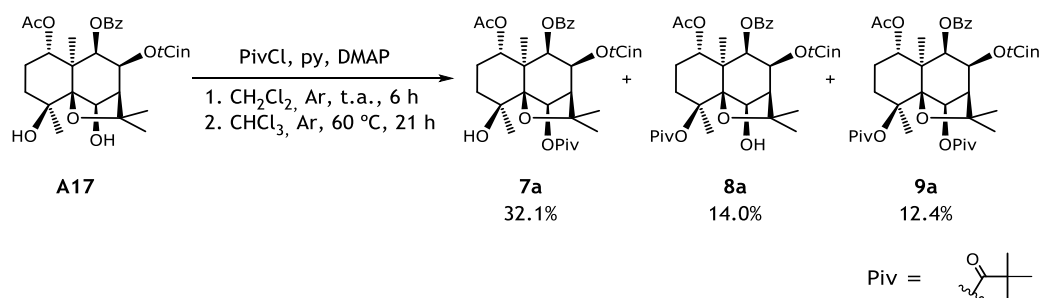


A una disolución de ácido 2-metilbutírico (45 μ L, 0.41 mmol) en 0.3 mL de CH_2Cl_2 seco, bajo atmósfera de argón y a temperatura ambiente, se le adicionó DCC (39.2 mg, 0.19 mmol). Tras observar la formación de un precipitado, se filtró por gel fina y se eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo se redisolvió en 0.2 mL de tolueno seco y se adicionó a una disolución previamente preparada de **A17** (6.8 mg, 0.12 mmol), DMAP (5 mg, 0.04 mmol) y Et_3N seca (0.2 mL, 1.43 mmol) en 0.3 mL de tolueno seco, a 85 $^\circ\text{C}$ y bajo atmósfera de argón. La reacción se agitó durante 2 h 30 min, tras lo cual se adicionó 0.1 mL (1.24 mmol) de piridina y calentó a 95 $^\circ\text{C}$. A las 123 h se dejó evolucionar a temperatura ambiente durante 25 h, tras lo cual se añadió 0.5 mL de MeOH y se dejó agitando durante 30 min. Posteriormente, se eliminó el disolvente a vacío, el crudo de reacción fue disuelto en 10 mL de CH_2Cl_2 , lavado con 10 mL de HCl 1 M, secado sobre MgSO_4 anhidro, filtrado y llevado a sequedad a presión reducida. El crudo se purificó mediante CCFP con fases móviles de hexanos–AcOEt (3:2), CH_2Cl_2 –acetona (9:1) y hexanos–1,4-dioxano (13:7), obteniéndose el producto **6a** como una en mezcla diastereomérica (2.8 mg, 36.0% de rendimiento).

Derivado 6a

Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo incoloro (2.8 mg).</p> <p>$[\alpha]_D^{28}$: -68.3° (c 0.30, CHCl₃).</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 1.32 (3H, s, Me-14), 1.46* (1H, H-2α), 1.47 (3H, s, Me-15), 1.58 (3H, s, Me-12), 1.68 (3H, s, OAc), 1.69* (1H, H-3α), 1.72 (3H, s, Me-13), 1.92 (2H, m, H-2β, H-3β), 2.49 (1H, s_A, H-7), 2.84 (1H, s_A, OH-4), 5.37 (1H, dd, <i>J</i> = 3.3, 11.8 Hz, H-1), 5.45 (1H, d, <i>J</i> = 6.3 Hz, H-9), 5.63 (1H, s, H-6), 5.73 (1H, dd, <i>J</i> = 3.4, 6.3 Hz, H-8), 6.21 (1H, d, <i>J</i> = 16.1 Hz, OtCin), 7.24 (2H, d, <i>J</i> = 7.7 Hz, OtCin), 7.30 (2H, t, <i>J</i> = 7.5 Hz, OtCin), 7.34 (1H, d, <i>J</i> = 7.0 Hz, OtCin), 7.39 (1H, d, <i>J</i> = 16.1 Hz, OtCin), 7.44 (2H, t, <i>J</i> = 7.7 Hz, OBz), 7.59 (1H, t, <i>J</i> = 7.3 Hz, OBz), 8.05 (2H, d, <i>J</i> = 8.0 Hz, OBz), O-D,L-MeBut [0.91 (3H, t, <i>J</i> = 7.3 Hz), 0.93 (3H, t, <i>J</i> = 7.3 Hz), 1.19 (3H, d, <i>J</i> = 7.0 Hz), 1.20 (3H, d, <i>J</i> = 7.0 Hz), 1.77 (2H, m), 2.44 (1H, dc, <i>J</i> = 2.7, 7.0 Hz)].</p> <p>RMN ¹³C (CDCl₃, 600 MHz) δ: 19.6 (c, C-15), 20.8 (c, OAc), 23.3 (t, C-2), 24.0 (c, C-14), 26.5 (c, C-13), 30.3 (c, C-12), 30.4 (c, C-12'), 38.4 (t, C-3), 50.0 (s, C-10), 54.0 (d, C-7), 69.1 (d, C-8), 70.5 (s, C-4), 72.2 (d, C-1), 72.3 (d, C-9), 77.1 (d, C-6), 84.6 (d, C-11), 91.5 (d, C-5), 117.1 (d, OtCin), 128.1 (2 × d, OtCin), 128.4 (2 × d, OtCin), 128.7 (2 × d, OBz), 129.4 (s, OBz), 130.2 (2 × d, OBz), 130.4 (d, OtCin), 133.3 (d, OBz), 134.0 (s, OtCin), 145.6 (d, OtCin), 164.9 (s, OtCin), 165.5 (s, OBz), 169.9 (s, OAc), O-D,L-MeBut [11.7 (c), 16.2 (c), 16.3 (c), 26.1 (t), 26.3 (t), 41.4 (d), 41.6 (d), 175.5 (s), 175.7 (s)].</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IE) <i>m/z</i> (%): 662 [M⁺] (0.4), 647 (9), 560 (17), 525 (24), 514 (9), 430 (4), 248 (6), 202 (12), 148 (5), 131 (100), 105 (91), 103 (14), 85 (10), 77 (11), 68 (8), 57 (30).</p> <p>EMAR (IE) <i>m/z</i>: Calculado para C₃₈H₄₆O₁₀ [M⁺]: 662.3091, observado 662.3093.</p>

Preparación de los derivados 7a-9a



A una disolución de **A17** (5.0 mg, 0.009 mmol) en 0.5 mL de CH_2Cl_2 seco, bajo atmósfera de argón y a temperatura ambiente, se le añadió DMAP (10 mg, 0.08 mmol) y cloruro de pivaloilo (20 μL , 0.16 mmol). La reacción se agitó durante 6 horas, tras lo cual se añadió tolueno seco y se calentó a 60 °C. Dado que la reacción no evolucionaba, añadimos una cantidad adicional de DMAP (5 mg, 0.04 mmol) y cloruro de pivaloilo (0.15 mL, 1.21 mmol). Una vez finalizada la reacción, se adicionó 3.5 mL de EtOH y, tras agitación durante media hora, se eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo se fraccionó por CC de gel de sílice con un gradiente de CH_2Cl_2 -acetona y, posteriormente, se purificó mediante CCFP usando como fase móvil hexanos-AcOEt (7:3). Así, se obtuvieron los derivados **7a** (2.5 mg, 32.1% de rendimiento), **8a** (0.8 mg, 14% de rendimiento) y **9a** (0.8 mg, 12.4% de rendimiento) como sólidos amorfos.

Derivado 7a

Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo incoloro (2.5 mg).</p> <p>$[\alpha]_D^{28}$: -85.2° (c 0.21, CHCl₃).</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 1.32 (3H, s, Me-14), 1.45 (1H, m, H-2α), 1.47 (3H, s, Me-15), 1.59 (3H, s, Me-12), 1.67 (3H, s, OAc), 1.69* (1H, H-3α), 1.72 (3H, s, Me-13), 1.90 (1H, m, H-2β), 1.93 (1H, m, H-3β), 2.49 (1H, d, J = 3.0 Hz, H-7), 5.37 (1H, dd, J = 3.0, 11.7 Hz, H-1), 5.45 (1H, d, J = 6.5 Hz, H-9), 5.63 (1H, s, H-6), 5.73 (1H, dd, J = 3.0, 6.5 Hz, H-8), 6.20 (1H, d, J = 16.1 Hz, OtCin), 7.24 (2H, d, J = 7.5 Hz, OtCin), 7.30 (2H, t, J = 7.6 Hz, OtCin), 7.34 (1H, t, J = 7.0 Hz, OtCin), 7.38 (1H, d, J = 16.1 Hz, OtCin), 7.44 (2H, t, J = 7.5 Hz, OBz), 7.59 (1H, t, J = 7.6 Hz, OBz), 8.06 (2H, d, J = 7.7 Hz, OBz), OPiv [1.24 (9H, s)].</p> <p style="text-align: right;">* señal solapada.</p> <p>RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 19.6 (c, C-15), 20.8 (c, OAc), 23.3 (t, C-2), 24.0 (c, C-14), 26.5 (c, C-13), 30.4 (c, C-12), 38.4 (t, C-3), 50.1 (s, C-10), 53.9 (d, C-7), 69.2 (d, C-8), 70.4 (s, C-4), 72.2 (d, C-1), 72.3 (d, C-9), 77.4 (d, C-6), 84.5 (s, C-11), 91.6 (s, C-5), 117.1 (d, OtCin), 128.1 (2 × d, OtCin), 128.4 (2 × d, OtCin), 128.7 (2 × d, OBz), 129.4 (s, OBz), 130.2 (2 × d, OBz), 130.4 (d, OtCin), 133.3 (d, OBz), 134.0 (s, OtCin), 145.6 (d, OtCin), 164.9 (s, OtCin), 165.5 (s, OBz), 169.9 (s, OAc), OPiv [27.0 (3 × c), 38.7 (s), 177.6 (s)].</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IE) m/z (%): 662 [M⁺] (1), 647 (9), 560 (15), 525 (22), 514 (11), 270 (5), 191 (5), 173 (2), 148 (12), 131 (81), 105 (100), 83 (11), 57 (34).</p> <p>EMAR (IE) m/z: Calculado para C₃₈H₄₆O₁₀ [M⁺]: 662.3091, observado 662.3098.</p>

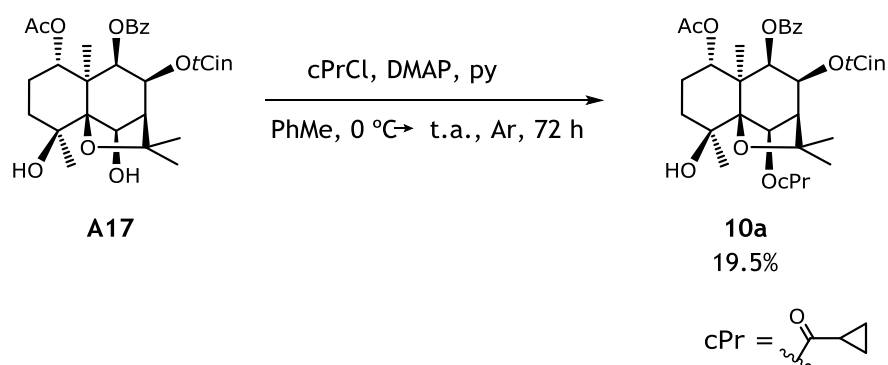
Derivado 8a

Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo incoloro (0.8 mg).</p> <p>$[\alpha]_D^{20}$: -37.3° (c 0.07, CHCl₃).</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 1.50 (3H, s, Me-15), 1.51* (1H, H-2α), 1.63 (3H, s, Me-12), 1.68 (3H, s, OAc), 1.75 (3H, s, Me-13), 1.91 (3H, s, Me-14), 2.05 (1H, m, H-2β), 2.12 (1H, dt, J = 3.8, 13.8 Hz, H-3β), 2.59 (1H, d, J = 2.9 Hz, H-7), 2.95 (1H, td, J = 3.4, 13.3 Hz, H-3α), 3.67 (1H, d, J = 6.3 Hz, OH-6), 4.57 (1H, d, J = 6.3 Hz, H-6), 5.41 (1H, d, J = 6.6 Hz, H-9), 5.49 (1H, dd, J = 4.3, 11.9 Hz, H-1), 5.55 (1H, dd, J = 2.9, 6.6 Hz, H-8), 6.22 (1H, d, J = 16.1 Hz, OtCin), 7.22 (2H, d, J = 7.5 Hz, OtCin), 7.30 (2H, t, J = 7.3 Hz, OtCin), 7.34 (1H, t, J = 7.3 Hz, OtCin), 7.36 (1H, d, J = 16.1 Hz, OtCin), 7.44 (2H, t, J = 7.7 Hz, OBz), 7.59 (1H, t, J = 7.3 Hz, OBz), 8.08 (2H, d, J = 7.6 Hz, OBz), OPiv [1.23 (9H, s)]. * señal solapada.</p> <p>RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 20.7 (c, C-15), 20.8 (c, OAc), 22.2 (c, C-14), 22.9 (t, C-2), 27.3 (c, C-13), 31.0 (t, C-3), 32.3 (c, C-12), 50.7 (s, C-10), 55.0 (d, C-7), 69.4 (d, C-8), 72.0 (d, C-1), 73.2 (d, C-9), 78.7 (d, C-6), 84.4 (s, C-11), 86.1 (s, C-4), 91.5 (s, C-5), 117.3 (d, OtCin), 128.1 (2 × d, OtCin), 128.4 (2 × d, OtCin), 128.7 (2 × d, OBz), 129.3 (s, OBz), 130.3 (2 × d, OBz), 130.4 (d, OtCin), 133.4 (d, OBz), 134.0 (s, OtCin), 145.5 (d, OtCin), 165.1 (s, OtCin), 165.5 (s, OBz), 169.9 (s, OAc), OPiv [27.0 (3 × c), 39.7 (s), 177.0 (s)].</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IES) m/z (%): 685 [M + Na]⁺ (100).</p> <p>EMAR (IES) m/z: Calculado para C₃₈H₄₆O₁₀Na [M + Na]⁺: 685.2989, observado 685.2986.</p>

Derivado 9a

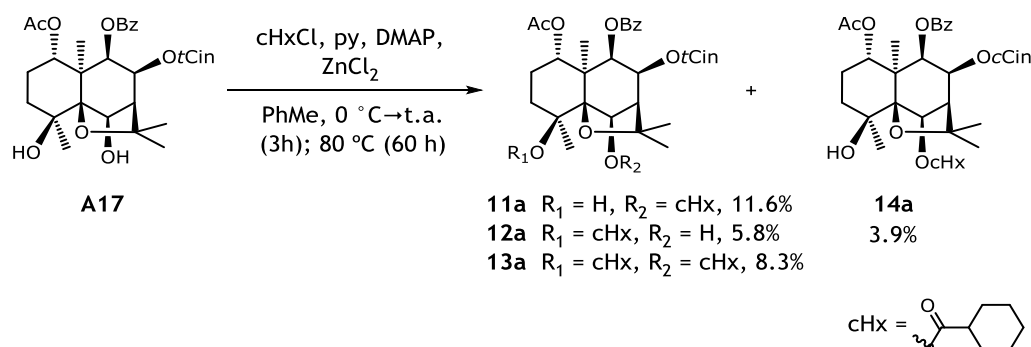
Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo incoloro (0.8 mg).</p> <p>$[\alpha]_D^{20}$: -13.8° (c 0.03, CHCl₃).</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 1.50* (1H, H-2α), 1.54 (3H, s, Me-15), 1.65 (3H, s, Me-12), 1.66 (3H, s, OAc), 1.69 (3H, s, Me-14), 1.76 (3H, s, Me-13), 1.93 (1H, m, H-3β), 1.96 (1H, m, H-2β), 2.48 (1H, d_A, J = 3.1 Hz, H-7), 2.84 (1H, d_A, J = 13.5 Hz, H-3α), 5.45 (1H, dd, J = 3.9, 11.9 Hz, H-1), 5.47 (1H, d, J = 6.4 Hz, H-9), 5.65 (1H, s, H-6), 5.74 (1H, dd, J = 3.1, 6.4 Hz, H-8), 6.20 (1H, d, J = 16.1 Hz, OtCin), 7.24 (2H, d, J = 7.6 Hz, OtCin), 7.30 (2H, t, J = 7.2 Hz, OtCin), 7.34 (1H, t, J = 7.1 Hz, OtCin), 7.38 (1H, d, J = 16.1 Hz, OtCin), 7.44 (2H, t, J = 7.7 Hz, OBz), 7.59 (1H, t, J = 7.1 Hz, OBz), 8.09 (2H, d, J = 7.9 Hz, OBz), OPiv × 2 [1.22 (9H, s), 1.28 (9H, s)]. * señal solapada.</p> <p>RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 20.2 (c, C-15), 20.8 (c, OAc), 22.6 (t, C-2), 23.1 (c, C-14), 26.4 (c, C-13), 31.6 (t, C-3), 32.0 (c, C-12), 52.0 (s, C-10), 54.0 (d, C-7), 69.2 (d, C-8), 72.2 (d, C-1), 73.1 (d, C-9), 78.5 (d, C-6), 82.5 (s, C-4), 84.7 (s, C-11), 90.9 (s, C-5), 117.3 (d, OtCin), 128.1 (2 × d, OtCin), 128.4 (2 × d, OtCin), 128.7 (2 × d, OBz), 129.4 (s, OBz), 130.3 (2 × d, OBz), 130.4 (d, OtCin), 133.4 (d, OBz), 134.1 (s, OtCin), 145.5 (d, OtCin), 164.9 (s, OtCin), 165.6 (s, OBz), 170.1 (s, OAc), OPiv × 2 [27.0 (3 × c), 27.6 (3 × c), 38.7 (s), 40.2 (s), 177.7 (s), 178.6 (s)].</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IES) m/z (%): 769 [M + Na]⁺ (100).</p> <p>EMAR (IES) m/z: Calculado para C₄₃H₅₄O₁₁Na [M + Na]⁺: 769.3564, observado 769.3558.</p>

Preparación del derivado 10a



A una disolución de **A17** (7.2 mg, 0.012 mmol) en 0.2 mL de tolueno seco, bajo atmósfera de argón y a 0 °C, se le añadió DMAP (15 mg, 0.12 mmol), piridina (30 μ L, 0.39 mmol) y cloruro de ciclopropilcarbonilo (40 μ L, 0.44 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 72 h a temperatura ambiente, tras lo cual fue diluida con CH_2Cl_2 y lavada con HCl 0.5 M (5 mL), disolución saturada de NaHCO_3 (10 mL) y disolución saturada de NaCl (10 mL). La fase orgánica se secó sobre MgSO_4 anhidro, se filtró y se llevó a sequedad a presión reducida. El residuo fue purificado mediante CCFP usando como fase móvil una mezclas de hexanos-AcOEt (4:1, 3:2), rindiendo el producto **10a** como un sólido amorfo (1.4 mg, 19.5% de rendimiento).

Preparación de los derivados 11a-14a



A una disolución de **A17** (8.7 mg, 0.015 mmol) en 0.2 mL de tolueno seco, a 0 °C y bajo atmósfera de argón, se le añadió DMAP (4.8 mg, 0.04 mmol), piridina (30 µL, 0.37 mmol) y cloruro de ciclohexilcarbonilo (40 µL, 0.30 mmol). La reacción se dejó bajo agitación a temperatura ambiente y se siguió mediante CCF. Después de 3 h, tras comprobar por análisis de CCF que la reacción no había evolucionado, se calentó a 80 °C durante 63 h. Posteriormente, se diluyó con CH₂Cl₂, se lavó con de HCl (1 M, 5 mL), disolución saturada de NaHCO₃ (10 mL) y disolución saturada de NaCl (10 mL). La fase orgánica se secó sobre MgSO₄ anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente en el rotavapor. El residuo se purificó mediante CCF preparativa de gel de sílice usando como móvil de hexanos–AcOEt (3:1), obteniéndose los derivados **11a** (1.2 mg, 11.6% de rendimiento), **12a** (0.6 mg, 5.8% de rendimiento), **13a** (1.0 mg, 8.3% de rendimiento) y **14a** (0.4 mg, 3.9% de rendimiento) como sólidos amorfos.

Derivado 11a

Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo incoloro (1.2 mg).</p> <p>$[\alpha]_D^{20}$: -73.7° (c 0.11, CHCl₃).</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 1.32 (3H, s, Me-14), 1.47 (3H, s, Me-15), 1.49 (1H, m, H-2α), 1.58 (3H, s, Me-12), 1.67 (3H, s, OAc), 1.70* (1H, H-3α), 1.71 (3H, s, Me-13), 1.92 (2H, m, H-2β, H-3β), 2.50 (1H, d, J = 3.1 Hz, H-7), 2.86 (1H, s, OH-7), 5.37 (1H, dd, J = 3.9, 12.0 Hz, H-1), 5.45 (1H, d, J = 6.4 Hz, H-9), 5.62 (1H, s, H-6), 5.72 (1H, dd, J = 3.1, 6.4 Hz, H-8), 6.20 (1H, d, J = 16.1 Hz, OtCin), 7.24 (2H, d, J = 7.5 Hz, OtCin), 7.30 (2H, t, J = 7.1 Hz, OtCin), 7.34 (1H, t, J = 7.1 Hz, OtCin), 7.38 (1H, d, J = 16.1 Hz, OtCin), 7.44 (2H, t, J = 7.6 Hz, OBz), 7.59 (1H, t, J = 7.3 Hz, OBz), 8.05 (2H, d, J = 7.9 Hz, OBz), OcHx [1.22–1.36 (4H, m), 1.40–1.53 (2H, m), 1.76 (2H, m), 1.92 (1H, m), 2.01 (1H, m), 2.34 (1H, m)].</p> <p style="text-align: right;">* señal solapada.</p> <p>RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 19.6 (c, C-15), 20.8 (c, OAc), 23.3 (t, C-2), 24.1 (c, C-14), 26.5 (c, C-13), 30.4 (c, C-12), 38.4 (t, C-3), 50.0 (s, C-10), 53.9 (d, C-7), 69.1 (d, C-8), 70.5 (s, C-4), 72.2 (d, C-1), 72.3 (d, C-9), 77.1 (d, C-6), 84.6 (s, C-11), 91.5 (s, C-5), 117.1 (d, OtCin), 128.1 (2 \times d, OtCin), 128.4 (2 \times d, OtCin), 128.7 (2 \times d, OBz), 129.4 (s, OBz), 130.2 (2 \times d, OBz), 130.4 (d, OtCin), 133.3 (d, OBz), 134.0 (s, OtCin), 145.6 (d, OtCin), 164.9 (s, OtCin), 165.5 (s, OBz), 169.9 (s, OAc), OcHx [25.4 (t), 25.4 (t), 25.7 (t), 28.6 (t), 28.7 (t), 43.5 (d), 175.0 (s)].</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IES) m/z (%): 711 [M + Na]⁺ (100).</p> <p>EMAR (IES) m/z: Calculado para C₄₀H₄₈O₁₀Na [M + Na]⁺: 711.3145, observado 711.3135.</p>

Derivado 12a

Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo incoloro (0.6 mg).</p> <p>$[\alpha]_D^{20}$: -48.4° (c 0.10, CHCl₃).</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 1.46 (3H, s, Me-15), 1.48* (1H, H-2α), 1.59 (3H, s, Me-12), 1.64 (3H, s, OAc), 1.72 (3H, s, Me-13), 1.90 (3H, s, Me-14 (duda)), 2.03 (1H, m, H-2β), 2.11 (1H, dt, J = 3.8, 13.9 Hz, H-3β), 2.59 (1H, d, J = 2.9 Hz, H-7), 2.89 (1H, td, J = 3.4, 13.3 Hz, H-3α), 3.68 (1H, d, J = 7.0 Hz, OH-6), 4.54 (1H, d, J = 7.0 Hz, H-6), 5.39 (1H, d, J = 6.6 Hz, H-9), 5.48 (1H, dd, J = 4.2, 12.0 Hz, H-1), 5.54 (1H, dd, J = 2.9, 6.6 Hz, H-8), 6.22 (1H, d, J = 16.0 Hz, OtCin), 7.22 (2H, d, J = 7.4 Hz, OtCin), 7.30 (2H, t, J = 7.2 Hz, OtCin), 7.34 (1H, t, J = 7.3 Hz, OtCin), 7.37 (1H, d, J = 16.0 Hz, OtCin), 7.44 (2H, t, J = 7.7 Hz, OBz), 7.59 (1H, t, J = 7.4 Hz, OBz), 8.07 (2H, d, J = 7.4 Hz, OBz), OcHx [1.38-1.70 (6H), 1.80 (3H, m), 1.97 (1H, m), 2.20 (1H, m)].</p> <p style="text-align: right;">* señal solapada.</p> <p>RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 20.1 (c, C-15), 20.7 (c, OAc), 22.9 (t, C-2), 27.3 (c, C-14), 28.8 (c, C-13), 30.5 (c, C-12), 31.3 (t, C-3), 50.4 (s, C-10), 55.3 (d, C-7), 69.6 (d, C-8), 72.0 (d, C-1), 73.1 (d, C-9), 78.8 (d, C-6), 84.2 (s, C-4), 85.0 (s, C-11), 91.2 (s, C-5), 117.3 (d, OtCin), 128.1 (2 × d, OtCin), 128.4 (2 × d, OtCin), 128.7 (2 × d, OBz), 129.4 (s, OBz), 130.3 (2 × d, OBz), 130.4 (d, OtCin), 133.4 (d, OBz), 134.0 (s, OtCin), 145.5 (d, OtCin), 165.1 (s, OtCin), 165.5 (s, OBz), 169.9 (s, OAc), OcHx [21.7 (t), 25.3 (2 × t), 25.6 (t), 29.2 (t), 44.7 (d), 174.4 (s)].</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IES) m/z (%): 711 [M + Na]⁺ (100).</p> <p>EMAR (IES) m/z: Calculado para C₄₀H₄₈O₁₀Na [M + Na]⁺: 711.3145, observado 711.3145.</p>

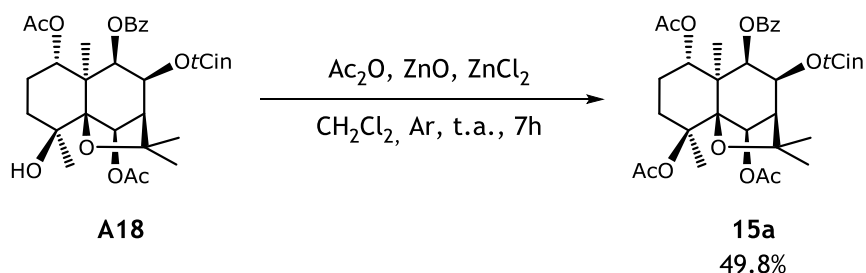
Derivado 13a

Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo incoloro (1.0 mg).</p> <p>$[\alpha]_D^{20}$: -50.0° (c 0.25, CHCl₃).</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 1.48 (1H, m, H-2α), 1.50 (3H, s, Me-15), 1.58 (3H, s, Me-12), 1.65 (3H, s, Me-14), 1.66 (3H, s, OAc), 1.69 (3H, s, Me-13), 1.97 (1H, m, H-2β), 2.02 (1H, m, H-3β), 2.50 (1H, d_A, J = 2.8 Hz, H-7), 2.85 (1H, td, J = 3.7, 12.8 Hz, H-3α), 5.45 (1H, d, J = 6.3 Hz, H-9), 5.47 (1H, dd, J = 4.1, 12.3 Hz, H-1), 5.60 (1H, s, H-6), 5.70 (1H, dd, J = 2.8, 6.3 Hz, H-8), 6.20 (1H, d, J = 16.1 Hz, OtCin), 7.23 (2H, d, J = 7.5 Hz, OtCin), 7.30 (2H, t, J = 7.5 Hz, OtCin), 7.34 (1H, d, J = 7.2 Hz, OtCin), 7.37 (1H, d, J = 16.1 Hz, OtCin), 7.44 (2H, t, J = 7.7 Hz, OBz), 7.58 (1H, t, J = 7.4 Hz, OBz), 8.08 (2H, d, J = 7.8 Hz, OBz), OcHx × 2 [1.25 (10H, m), 1.42 (4H, m), 1.79 (4H, m), 1.91 (2H, m), 2.28 (2H, dt, J = 3.3, 11.6 Hz)].</p> <p>RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 19.7 (c, C-15), 20.7 (c, OAc), 21.6 (c, C-14), 22.7 (t, C-2), 26.5 (c, C-13), 29.8 (c, C-12), 31.7 (t, C-3), 51.2 (s, C-10), 53.9 (d, C-7), 69.3 (d, C-8), 72.1 (d, C-1), 73.0 (d, C-9), 77.5 (d, C-6), 81.3 (s, C-4), 84.5 (s, C-11), 90.7 (s, C-5), 117.2 (d, OtCin), 128.1 (2 × d, OtCin), 128.4 (2 × d, OtCin), 128.7 (2 × d, OBz), 129.4 (s, OBz), 130.3 (2 × d, OBz), 130.4 (d, OtCin), 133.3 (d, OBz), 134.0 (s, OtCin), 145.5 (d, OtCin), 164.9 (s, OtCin), 165.6 (s, OBz), 169.9 (s, OAc), OcHx × 2 [25.3 (t), 25.4 (t), 25.5 (t), 25.6 (t), 25.7 (2 × t), 28.4 (t), 28.6 (t), 28.8 (t), 29.7 (t), 43.7 (d), 44.9 (d), 174.8 (s), 175.3 (s)].</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IE) m/z (%): [m/z 50-800] 783 [M - CH₃]⁺ (3), 670 (9), 560 (15), 551 (13), 522 (21), 500 (28), 202 (5), 131 (87), 111 (19), 105 (100), 83 (79), 77 (13), 57 (3).</p> <p>EM (IE) m/z (%) [m/z 500-1500]: 798 [M⁺] (3), 783 (12), 677 (16), 647 (7), 560 (68), 551 (100), 501 (37).</p> <p>EMAR (IE) m/z: Calculado para C₄₇H₅₈O₁₁ [M⁺]: 798.3979, observado 798.3983.</p>

Derivado 14a

Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo incoloro (0.4 mg).</p> <p>$[\alpha]_D^{20}$: -10.2° (c 0.04, CHCl₃).</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 1.42 (3H, s, Me-15), 1.44* (1H, H-2α), 1.52 (6H, s, Me-12, Me-13), 1.62 (3H, s, OAc), 1.88 (3H, s, Me-14), 2.03 (1H, m, H-2β), 2.08 (1H, m, H-3β), 2.44 (1H, d, J = 2.8 Hz, H-7), 2.87 (1H, td, J = 3.6, 12.9 Hz, H-3α), 3.66 (1H, d, J = 7.1 Hz, OH-6), 4.47 (1H, d, J = 7.1 Hz, H-6), 5.34 (1H, d, J = 6.5 Hz, H-9), 5.43 (1H, dd, J = 4.3, 12.0 Hz, H-1), 5.47 (1H, dd, J = 2.8, 6.5 Hz, H-8), 5.69 (1H, d, J = 12.6 Hz, OcCin), 6.89 (1H, d, J = 12.6 Hz, OcCin), 7.35 (3H, m, OcCin), 7.45 (2H, m, OcCin), 7.58 (3H, d, J = 6.7 Hz, OBz), 8.07 (2H, d, J = 7.4 Hz, OBz), OcHx [1.38–1.74 (6H), 1.80 (3H, m), 1.95 (1H, m), 2.18 (1H, m)]. * señal solapada.</p> <p>RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 20.0 (c, C-15), 20.7 (c, OAc), 22.8 (t, C-2), 27.0 (c, C-14), 28.8 (c, C-13), 30.5 (c, C-12), 31.3 (t, C-3), 50.4 (s, C-10), 55.2 (d, C-7), 69.3 (d, C-8), 72.0 (d, C-1), 73.1 (d, C-9), 78.9 (d, C-6), 84.3 (s, C-4), 85.0 (s, C-11), 91.2 (s, C-5), 118.7 (d, OcCin), 128.0 (4 × d, OcCin), 128.3 (2 × d, OBz), 129.2 (s, OBz), 129.8 (2 × d, OBz), 130.2 (d, OcCin), 133.3 (d, OBz), 137.7 (s, OcCin), 144.8 (d, OcCin), 164.4 (s, OcCin), 165.6 (s, OBz), 169.9 (s, OAc), OcHx [21.7 (t), 25.3 (2 × t), 25.6 (t), 29.2 (t), 44.7 (d), 174.4 (s)].</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IES) m/z (%): 711 [M + Na]⁺ (100).</p> <p>EMAR (IES) m/z: Calculado para C₄₀H₄₈O₁₀Na [M + Na]⁺: 711.3145, observado 711.3143.</p>

Preparación del derivado 15a

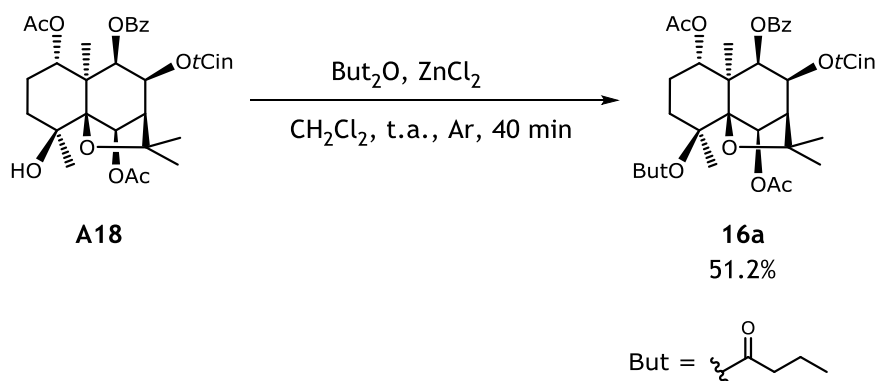


A una disolución de **A18** (7.9 mg, 0.013 mmol) en 0.2 mL de CH_2Cl_2 seco, se añadió ZnO (7 mg, 0.09 mmol) y anhídrido acético (10 μL , 0.11 mmol), a temperatura ambiente y bajo atmósfera de argón. La reacción se agitó durante 6 h y, tras no observar avance de la misma mediante CCF, se adicionó ZnCl_2 (4 mg, 0.03 mmol) y se agitó durante 1 h. Posteriormente, se añadió 10 mL de CH_2Cl_2 y 4 mL de agua para finalizar la reacción. La fase acuosa fue eliminada mediante decantación y la fase orgánica se lavó con 10 mL de disolución saturada de NaHCO_3 y 10 mL de disolución saturada de NaCl . Finalmente, se secó sobre MgSO_4 anhidro, se filtró y se llevó a sequedad en el rotavapor. El residuo se purificó mediante CCF preparativa de gel de sílice, usando como fase móvil de hexanos– AcOEt (3:2). Así, se obtuvieron 4.2 mg del compuesto **15a** como un sólido amorfo (49.8% de rendimiento).

Derivado 15a

Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo incoloro (4.2 mg).</p> <p>$[\alpha]_D^{20}$: -65.7° (c 0.30, CHCl₃).</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 1.48* (1H, H-2α), 1.50 (3H, s, Me-15), 1.58 (3H, s, Me-12), 1.67 (6H, s, Me-14, OAc-1), 1.71 (3H, s, Me-13), 2.00 (1H, m, H-2β), 2.06* (1H, H-3β), 2.11 (3H, s, OAc-6), 2.55 (1H, d_A, J = 2.4 Hz, H-7), 2.86 (1H, d_A, J = 14.5 Hz, H-3α), 5.45 (1H, d, J = 6.4 Hz, H-9), 5.48 (1H, dd, J = 3.9, 11.9 Hz, H-1), 5.59 (1H, s, H-6), 5.69 (1H, dd, J = 2.4, 6.4 Hz, H-8), 6.21 (1H, d, J = 16.1 Hz, OtCin), 7.23 (2H, d, J = 7.6 Hz, OtCin), 7.30 (2H, t, J = 7.4 Hz, OtCin), 7.34 (1H, t, J = 7.3 Hz, OtCin), 7.38 (1H, d, J = 16.1 Hz, OtCin), 7.43 (2H, t, J = 7.5 Hz, OBz), 7.58 (1H, t, J = 7.4 Hz, OBz), 8.07 (2H, d, J = 7.8 Hz, OBz), OAc-4 [2.05 (3H, s)]. * señal solapada</p> <p>RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 19.7 (c, C-15), 20.7 (c, OAc-1), 21.2 (c, C-14), 21.3 (c, OAc-6), 22.7 (t, C-2), 26.5 (c, C-13), 29.8 (c, C-12), 31.8 (t, C-3), 51.0 (s, C-10), 53.7 (d, C-7), 69.2 (d, C-8), 71.9 (d, C-1), 72.9 (d, C-9), 77.6 (d, C-6), 81.8 (s, C-4), 84.7 (s, C-11), 90.6 (s, C-5), 117.1 (d, OtCin), 128.1 (2 × d, OtCin), 128.4 (2 × d, OtCin), 128.7 (2 × d, OBz), 129.3 (s, OBz), 130.3 (2 × d, OBz), 130.4 (d, OtCin), 133.3 (d, OBz), 134.0 (s, OtCin), 145.6 (d, OtCin), 164.9 (s, OtCin), 165.5 (s, OBz), 169.6 (s, OAc-6), 169.8 (s, OAc-1), OAc-4 [22.9 (c), 169.5 (s)].</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IE) m/z (%): 662 [M⁺] (0.5), 647 (3), 620 (5), 560 (21), 500 (18), 483 (29), 215 (5), 202 (4), 131 (100), 105 (82), 83 (9), 77 (10).</p> <p>EMAR (IE) m/z: Calculado para C₃₇H₄₂O₁₁ [M⁺]: 662.2727, observado 662.2748.</p>

Preparación del derivado 16a

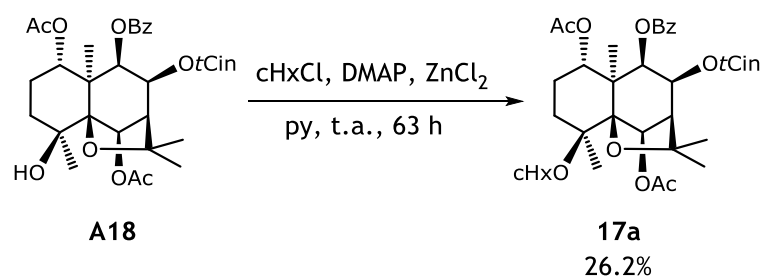


A una disolución de **A18** (7.9 mg, 0.013 mmol) en 0.3 mL de CH_2Cl_2 seco, a temperatura ambiente y bajo atmósfera de argón, se le añadió ZnCl_2 (7 mg, 0.05 mmol) y anhídrido butírico (But_2O , 20 μL , 0.12 mmol). La reacción se agitó durante 40 min, tras lo cual se lavó con 10 mL de disolución saturada de NaHCO_3 y 10 mL de disolución saturada de NaCl . La fase orgánica se secó sobre MgSO_4 anhidro, se filtró y se llevó a sequedad a vacío. El crudo se purificó mediante CCF preparativa de gel de sílice, usando como fase móvil hexanos- AcOEt (3:2), para obtener el producto **16a** (4.5 mg, rendimiento de 51.2%) como un sólido amorfo.

Derivado 16a

Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo incoloro (4.5 mg).</p> <p>$[\alpha]_D^{28}$: -64.6° (c 0.45, CHCl₃).</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 1.48* (1H, H-2α), 1.50 (3H, s, Me-15), 1.58 (3H, s, Me-12), 1.66 (3H, s, OAc-1), 1.67 (3H, s, Me-14), 1.70 (3H, s, Me-13), 1.99 (1H, m, H-2β), 2.07* (1H, H-3β), 2.10 (3H, s, OAc-6), 2.54 (1H, d, J = 3.1 Hz, H-7), 2.88 (1H, td, J = 3.2, 13.4 Hz, H-3α), 5.45 (1H, d, J = 6.5 Hz, H-9), 5.48 (1H, dd, J = 4.3, 12.0 Hz, H-1), 5.59 (1H, s, H-6), 5.69 (1H, dd, J = 3.1, 6.5 Hz, H-8), 6.21 (1H, d, J = 16.0 Hz, OtCin), 7.23 (2H, d, J = 7.1 Hz, OtCin), 7.30 (2H, t, J = 7.5 Hz, OtCin), 7.34 (1H, t, J = 7.2 Hz, OtCin), 7.37 (1H, d, J = 16.0 Hz, OtCin), 7.43 (2H, t, J = 7.8 Hz, OBz), 7.58 (1H, t, J = 7.5 Hz, OBz), 8.07 (2H, d, J = 8.1 Hz, OBz), OBut [0.97 (3H, t, J = 7.3 Hz, -OOC(CH₂)₂CH₃), 1.65* (2H), 2.27 (2H, m)]. * señal solapada.</p> <p>RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 19.7 (c, C-15), 20.7 (c, OAc-1), 21.4 (c, C-14), 21.4 (c, OAc-6), 22.7 (t, C-2), 26.5 (c, C-13), 29.9 (c, C-12), 31.9 (t, C-3), 51.1 (s, C-10), 53.7 (d, C-7), 69.2 (d, C-8), 71.9 (d, C-1), 72.9 (d, C-9), 77.6 (d, C-6), 81.6 (s, C-4), 84.6 (s, C-11), 90.6 (s, C-5), 117.1 (d, OtCin), 128.1 (2 × d, OtCin), 128.4 (2 × d, OtCin), 128.7 (2 × d, OBz), 129.3 (s, OBz), 130.3 (2 × d, OBz), 130.4 (d, OtCin), 133.3 (d, OBz), 134.0 (s, OtCin), 145.6 (d, OtCin), 164.9 (s, OtCin), 165.6 (s, OBz), 169.6 (s, OAc-6), 169.8 (s, OAc-1), OBut [13.8 (c), 18.4 (t), 37.6 (t), 172.3 (s)].</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IE) m/z (%): 690 [M⁺] (1), 675 (3), 648 (4), 561 (8), 560 (24), 500 (21), 483 (32), 215 (5), 202 (5), 131 (100), 105 (84), 83 (9), 77 (9), 71 (7).</p> <p>EMAR (IE) m/z: Calculado para C₃₉H₄₆O₁₁ [M⁺]: 690.3040, observado 690.3036.</p>

Preparación del derivado 17a

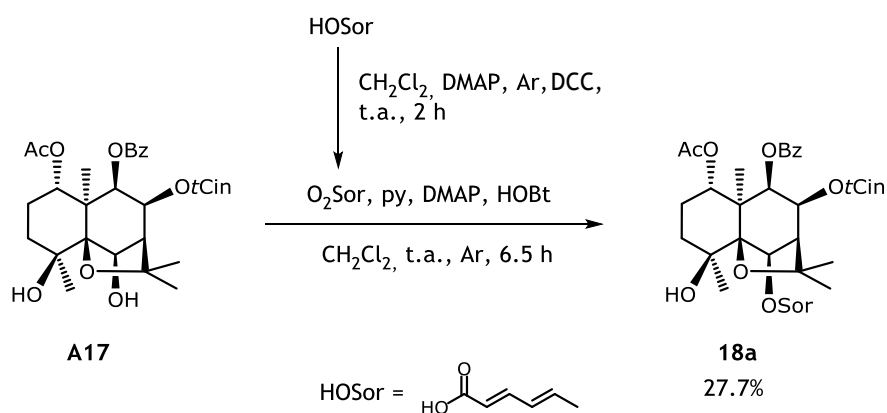


A una disolución de **A18** (6.8 mg, 0.011 mmol) en 0.2 mL de piridina, a 0 °C y bajo atmósfera de argón, se le añadió DMAP (6.6 mg, 0.05 mmol), ZnCl₂ (26.1 mg, 0.19 mmol) y cloruro de ciclohexilcarbonilo (40 µL, 0.30 mmol). La mezcla de reacción se dejó agitar a temperatura ambiente durante 63 h. La reacción se paró diluyendo con CH₂Cl₂ y, posteriormente, se lavó con HCl (0.5 M, 10 mL), disolución saturada de NaHCO₃ (10 mL) y disolución saturada de NaCl (10 mL). La fase orgánica se secó sobre MgSO₄ anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a vacío. El crudo fue purificado mediante CCF preparativa usando como fase móvil una mezcla de hexanos–AcOEt (4:1), obteniéndose el producto **17a** como un sólido amorfo (2.1 mg, 26.2% de rendimiento).

Derivado 17a

Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo incoloro (2.1 mg).</p> <p>$[\alpha]_D^{20}$: -51.4° (c 0.21, CHCl₃).</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 1.48* (1H, H-2α), 1.50 (3H, s, Me-15), 1.59* (3H, Me-12), 1.66 (6H, s, Me-14, OAc-1), 1.70 (3H, s, Me-13), 1.98 (1H, m, H-2β), 2.03 (1H, m, H-3β), 2.09 (3H, s, OAc-6), 2.53 (1H, d, J = 3.1 Hz, H-7), 2.87 (1H, td, J = 3.2, 13.2 Hz, H-3α), 5.45 (1H, d, J = 6.4 Hz, H-9), 5.47 (1H, dd, J = 4.2, 12.2 Hz, H-1), 5.60 (1H, s, H-6), 5.69 (1H, dd, J = 3.1, 6.4 Hz, H-8), 6.21 (1H, d, J = 16.1 Hz, OtCin), 7.23 (2H, d, J = 7.5 Hz, OtCin), 7.30 (2H, t, J = 7.6 Hz, OtCin), 7.34 (1H, d, J = 7.1 Hz, OtCin), 7.37 (1H, d, J = 16.1 Hz, OtCin), 7.43 (2H, t, J = 7.6 Hz, OBz), 7.59 (1H, t, J = 7.4 Hz, OBz), 8.07 (2H, d, J = 7.8 Hz, OBz), OcHx [1.45 (2H, m), 1.79 (4H, m), 1.93 (4H, m), 2.26 (1H, tt, J = 3.0, 11.9 Hz)]. * señal solapada.</p> <p>RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 19.8 (c, C-15), 20.7 (c, OAc-1), 21.5 (c, C-14), 21.6 (c, OAc-6), 22.7 (t, C-2), 26.5 (c, C-13), 29.7 (c, C-12), 31.9 (t, C-3), 51.2 (s, C-10), 53.8 (d, C-7), 69.2 (d, C-8), 72.0 (d, C-1), 72.9 (d, C-9), 77.8 (d, C-6), 81.3 (s, C-4), 84.6 (s, C-11), 90.7 (s, C-5), 117.2 (d, OtCin), 128.1 (2 × d, OtCin), 128.4 (2 × d, OtCin), 128.7 (2 × d, OBz), 129.3 (s, OBz), 130.3 (2 × d, OBz), 130.4 (d, OtCin), 133.3 (d, OBz), 134.0 (s, OtCin), 145.6 (d, OtCin), 164.9 (s, OtCin), 165.6 (s, OBz), 169.7 (s, OAc-6), 169.9 (s, OAc-1), OcHx [25.4 (t), 25.7 (t), 29.0 (t), 29.2 (t), 29.7 (t), 44.6 (d), 175.2 (s)].</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IE) m/z (%): 730 [M⁺] (1), 715 (1), 609 (3), 483 (13), 308 (2), 247 (2), 230 (3), 215 (3), 202 (4), 178 (6), 165 (4), 131 (100), 105 (98), 83 (30), 77 (13), 57 (7).</p> <p>EMAR (IE) m/z: Calculado para C₄₂H₅₀O₁₁ [M⁺]: 730.3353, observado 730.3331.</p>

Preparación del derivado 18a



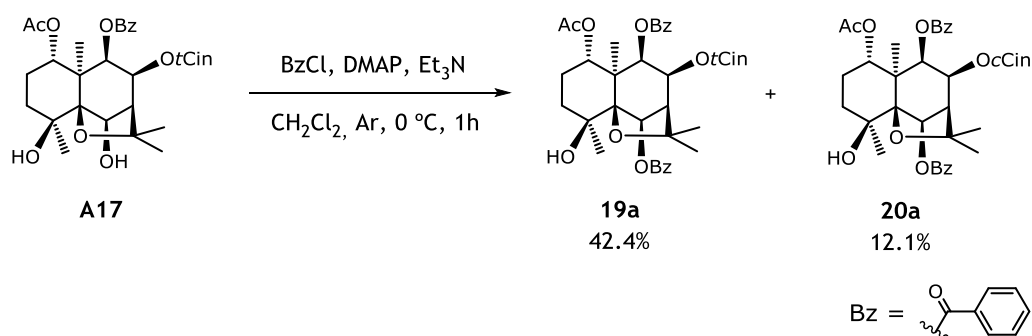
A una disolución de ácido sórbico (7.0 mg, 0.06 mmol) en 1 mL de CH₂Cl₂ seco, a temperatura ambiente y bajo atmósfera de argón, se le añadió DCC (18.9 mg, 0.09 mmol) y se dejó con agitación durante 2 h, periodo tras el cual se filtró sobre celita y se eliminó el disolvente en el rotavapor. El residuo se disolvió en 0.2 mL de CH₂Cl₂ seco y se adicionó a una mezcla de **A17** (10.0 mg, 0.017 mmol), piridina (20 µL, 0.25 mmol) y DMAP (3 mg, 0.02 mmol) bajo atmósfera de argón y a temperatura ambiente. La mezcla se agitó durante 30 min y, tras no observar ninguna evolución de la reacción por CCF, se le adicionó HOBT (5 mg, 0.04 mmol). La mezcla se agitó entonces durante 6 h, bajo atmósfera de argón y a temperatura ambiente. Tras este periodo se paró la reacción, adicionando 0.1 mL de MeOH, se agitó durante 30 min y se llevó a sequedad a presión reducida.

El crudo se fraccionó mediante CC de gel de sílice usando como fase móvil un gradiente de polaridad de hexanos-AcOEt. El producto fue purificado mediante CCF preparativa de gel de sílice, usando como eluyente una mezcla de hexanos-AcOEt (3:2), rindiendo el producto **18a** como un sólido amorfo (3.1 mg, 26.7% de rendimiento).

Derivado 18a

Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo incoloro (3.1 mg).</p> <p>$[\alpha]_D^{28}$: -15.2° (c 0.65, CHCl₃).</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 1.33 (3H, s, Me-14), 1.47 (3H, s, Me-15), 1.51* (1H, H-2α), 1.56 (3H, s, Me-12), 1.68 (3H, s, OAc), 1.72 (3H, s, Me-13), 1.73* (1H, H-3α), 1.94* (1H, H-2β), 1.95* (1H, H-3β), 2.59 (1H, d, J = 3.0 Hz, H-7), 2.93 (1H, s_A, OH-4), 5.37 (1H, dd, J = 3.4, 12.2 Hz, H-1), 5.46 (1H, d, J = 6.5 Hz, H-9), 5.59 (1H, s, H-6), 5.76 (1H, dd, J = 3.0, 6.5 Hz, H-8), 6.21 (1H, d, J = 16.0 Hz, OtCin), 7.25 (2H, d, J = 8.2 Hz, OtCin), 7.30 (2H, t, J = 7.6 Hz, OtCin), 7.34 (1H, t, J = 7.7 Hz, OtCin), 7.39 (1H, d, J = 16.0 Hz, OtCin), 7.44 (2H, t, J = 7.8 Hz, OBz), 7.59 (1H, t, J = 7.3 Hz, OBz), 8.06 (2H, d, J = 7.4 Hz, OBz), OSor [1.86 (3H, d, J = 4.6 Hz), 5.82 (1H, d, J = 15.3 Hz), 6.20 (2H, m), 7.33 (1H, d, J = 15.3 Hz)]. * señal solapada.</p> <p>RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 19.6 (c, C-15), 20.8 (c, OAc), 23.3 (t, C-2), 23.9 (c, C-14), 26.5 (c, C-13), 30.3 (c, C-12), 38.7 (t, C-3), 49.9 (s, C-10), 53.8 (d, C-7), 69.1 (d, C-8), 70.6 (s, C-4), 72.2 (d, C-1), 72.3 (d, C-9), 77.4 (d, C-6), 84.6 (s, C-11), 91.4 (s, C-5), 117.2 (d, OtCin), 128.1 (2 × d, OtCin), 128.4 (2 × d, OtCin), 128.7 (2 × d, OBz), 129.4 (s, OBz), 130.2 (2 × d, OBz), 130.4 (d, OtCin), 133.3 (d, OBz), 134.0 (s, OtCin), 145.6 (d, OtCin), 164.9 (s, OtCin), 165.5 (s, OBz), 169.9 (s, OAc), OSor [18.7 (c), 118.4 (d), 129.8 (d), 140.7 (d), 146.9 (d), 166.1 (s)].</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IE) m/z (%): 672 [M⁺] (0.5), 657 (7), 563 (6), 560 (14), 545 (11), 535 (11), 524 (7), 441 (5), 430 (4), 248 (6), 202 (14), 148 (6), 131 (91), 105 (100), 95 (48), 77 (14), 57 (3).</p> <p>EMAR (IE) m/z: Calculado para C₃₉H₄₄O₁₀ [M⁺]: 672.2934, observado 672.2946.</p>

Preparación de los derivados **19a** y **20a**



A una disolución de **A17** (4.2 mg, 0.007 mmol) en 1.5 mL de CH₂Cl₂ seco, bajo atmósfera de argón y a 0 °C, se adicionó DMAP (5 mg, 0.04 mmol), Et₃N (0.20 mL, 1.43 mmol) y cloruro de benzoflo (0.35 mL, 3.015 mmol). La reacción se agitó durante 1 h y se siguió mediante CCF. Trascurrido ese tiempo, se añadió 0.5 mL de MeOH, se agitó durante 30 min y se llevó a sequedad. El residuo se fraccionó por CC de gel de sílice con fases móviles de polaridad creciente (hexanos-CH₂Cl₂ y CH₂Cl₂-acetona) y se purificó mediante CCF preparativa de gel de sílice, usando como fases móviles hexanos-AcOEt (4:1 y 3:2) y hexanos-AcOEt-HOAc (60:40:1) para obtener los derivados **19a** (2.1 mg, 42.4% de rendimiento) y **20a** (0.6 mg, 12.1% de rendimiento), ambos como sólidos amorfos.

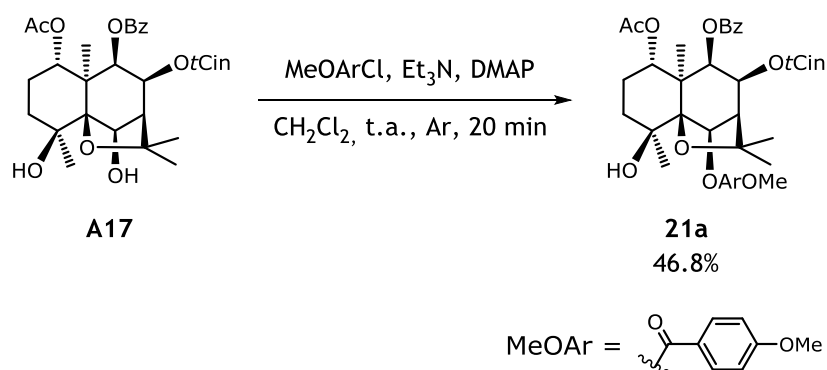
Derivado 19a

Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo incoloro (2.1 mg).</p> <p>$[\alpha]_D^{20}$: -47.7° (c 0.20, CHCl₃).</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 1.38 (3H, s, Me-14), 1.51* (1H, H-2α), 1.52 (3H, s, Me-15), 1.58 (3H, s, Me-12), 1.69 (3H, s, OAc), 1.74 (3H, s, Me-13), 1.76 (1H, m, H-3α), 1.94 (1H, m, H-2β), 1.99 (1H, m, H-3β), 2.73 (1H, d, J = 2.9 Hz, H-7), 3.06 (1H, s_A, OH-4), 5.41 (1H, dd, J = 4.1, 12.2 Hz, H-1), 5.51 (1H, d, J = 6.3 Hz, H-9), 5.72 (1H, s, H-6), 5.85 (1H, dd, J = 2.9, 6.3 Hz, H-8), 6.22 (1H, d, J = 16.1 Hz, OtCin), 7.26* (2H, OtCin), 7.30 (2H, t, J = 7.5 Hz, OtCin), 7.34 (1H, t, J = 7.4 Hz, OtCin), 7.41 (1H, d, J = 16.1 Hz, OtCin), 7.45 (2H, t, J = 7.6 Hz, OBz-9), 7.59 (1H, t, J = 7.2 Hz, OBz-9), 8.07 (2H, d, J = 7.7 Hz, OBz-9), OBz-6 [7.48 (2H, t, J = 7.7 Hz), 7.59 (1H, t, J = 7.2 Hz), 8.22 (2H, d, J = 7.6 Hz)].</p> <p>* señal solapada.</p> <p>RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 19.7 (c, C-15), 20.8 (c, OAc), 23.3 (t, C-2), 23.8 (c, C-14), 26.5 (c, C-13), 30.3 (c, C-12), 38.8 (t, C-3), 49.9 (s, C-10), 53.7 (d, C-7), 69.1 (d, C-8), 70.7 (s, C-4), 72.2 (d, C-1), 72.3 (d, C-9), 78.2 (d, C-6), 84.7 (s, C-11), 91.3 (s, C-5), 117.1 (d, OtCin), 128.1 (2 × d, OtCin), 128.4 (2 × d, OtCin), 128.7 (2 × d, OBz-9), 129.4 (s, OBz-9), 130.2 (2 × d, OBz-9), 130.4 (d, OtCin), 133.4 (d, OBz-9), 134.0 (s, OtCin), 145.6 (d, OtCin), 164.9 (s, OtCin), 165.5 (s, OBz-9), 169.9 (s, OAc), OBz-6 [128.6 (2 × d), 129.6 (s), 130.2 (2 × d), 133.3 (d), 165.7 (s)].</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IE) m/z (%): 67 [M - CH₃]⁺ (2), 560 (2), 545 (8), 270 (4), 215 (3), 173 (2), 165 (1), 148 (7), 131 (60), 105 (100), 77 (15).</p> <p>EMAR (IE) m/z: Calculado para C₃₉H₃₉O₁₀ [M - CH₃]⁺: 667.2543, observado 667.2553.</p>

Derivado 20a

Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo incoloro (0.6 mg).</p> <p>$[\alpha]_D^{20}$: -104.2° (c 0.02, CHCl₃).</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 1.35 (3H, s, Me-14), 1.47 (1H, m, H-2α), 1.48 (3H, s, Me-13), 1.51 (3H, s, Me-15), 1.54* (3H, Me-12), 1.67 (3H, s, OAc), 1.70* (1H, H-3α), 1.92 (1H, m, H-2β), 1.96 (1H, m, H-3β), 2.57 (1H, d, J = 2.9 Hz, H-7), 3.03 (1H, s_A, OH-4), 5.36 (1H, dd, J = 3.7, 12.1 Hz, H-1), 5.46 (1H, d, J = 6.2 Hz, H-9), 5.66 (1H, s, H-6), 5.69 (1H, d, J = 12.5 Hz, OcCin), 5.77 (1H, dd, J = 2.9, 6.2 Hz, H-8), 6.90 (1H, d, J = 12.5 Hz, OcCin), 7.33 (3H, m, OcCin), 7.47 (2H, t, J = 7.9 Hz, OcCin), 7.59 (3H, t, J = 7.1 Hz, OBz-9), 8.07 (2H, d, J = 7.7 Hz, OBz-9), OBz-6 [7.48 (2H, t, J = 7.8 Hz), 7.59 (1H, t, J = 7.1 Hz), 8.21 (2H, d, J = 7.7 Hz)].</p> <p style="text-align: right;">* señal solapada.</p> <p>RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 19.6 (c, C-15), 20.8 (c, OAc), 23.3 (t, C-2), 23.9 (c, C-14), 26.2 (c, C-13), 30.3 (c, C-12), 38.8 (t, C-3), 49.9 (s, C-10), 53.6 (d, C-7), 68.7 (d, C-8), 70.7 (s, C-4), 72.2 (d, C-1), 72.4 (d, C-9), 78.3 (d, C-6), 84.8 (s, C-11), 91.3 (s, C-5), 118.6 (d, OcCin), 128.0 (2 × d, OcCin), 128.3 (2 × d, OBz-9), 128.7 (2 × d, OcCin), 129.2 (d, OcCin), 129.4 (s, OBz-9), 129.9 (2 × d, OBz-9), 133.3 (d, OBz-9), 134.6 (s, OcCin), 145.0 (d, OcCin), 164.1 (s, OcCin), 165.5 (s, OBz-9), 169.9 (s, OAc), OBz-6 [129.6 (s), 130.1 (2 × d), 130.2 (2 × d), 133.4 (d), 165.7 (s)].</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IES) m/z (%): 705 [M + Na]⁺ (100).</p> <p>EMAR (IES) m/z: Calculado para C₄₀H₄₂O₁₀Na [M + Na]⁺: 705.2676, observado 705.2667.</p>

Preparación del derivado 21a

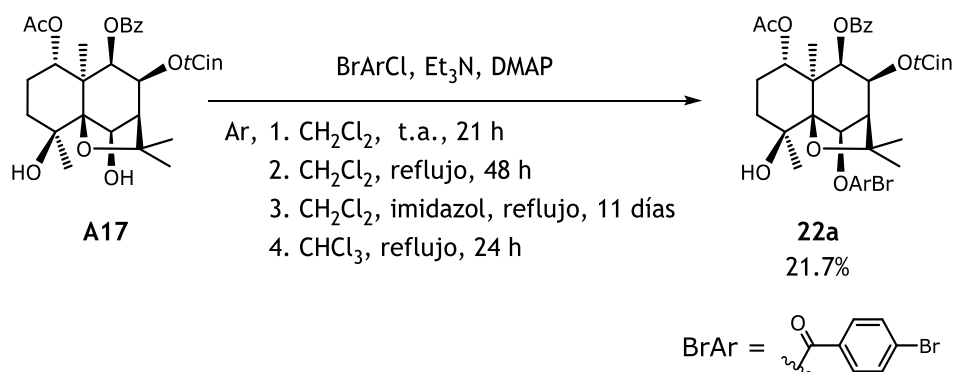


A una disolución de **A17** (5.2 mg, 0.009 mmol) en 0.5 mL de CH_2Cl_2 seco, a temperatura ambiente y bajo atmósfera de argón, se le añadió Et_3N (0.2 mL, 1.43 mmol), DMAP (5 mg, 0.04 mmol) y cloruro de 4-metoxibenzoílo (0.25 mL, 1.85 mmol). La reacción se agitó durante 20 min y se siguió mediante CCF. Para parar la reacción, se añadió 0.5 mL de agua y se agitó durante 30 min. Se lavó con 30 mL de disolución saturada de NaHCO_3 y la fase orgánica se secó sobre MgSO_4 anhidro, se filtró y se llevó a sequedad a vacío. El residuo fue fraccionado por CC de gel de sílice usando como fases móviles gradientes de hexanos–AcOEt y hexanos– CH_2Cl_2 . Finalmente, se purificó mediante CCFP con fases móviles de hexanos–acetona (3:1) y CH_2Cl_2 –acetona (9:1), rindiendo el producto **21a** como un sólido amorfo (3.0 mg, 46.8% de rendimiento).

Derivado 21a

Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo incoloro (3.0 mg).</p> <p>$[\alpha]_D^{28}$: -36.2° (c 0.27, CHCl_3).</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ^1H (CDCl_3, 400 MHz) δ: 1.37 (3H, s, Me-14), 1.50 (3H, s, Me-15), 1.52* (1H, H-2α), 1.58* (3H, Me-12), 1.69 (3H, s, OAc), 1.74 (3H, s, Me-13), 1.75* (1H, H-3α), 1.94* (1H, H-2β), 1.98* (1H, H-3β), 2.72 (1H, d, $J = 2.9$ Hz, H-7), 3.05 (1H, s_A, OH-4), 5.41 (1H, dd, $J = 4.0, 12.0$ Hz, H-1), 5.50 (1H, d, $J = 6.4$ Hz, H-9), 5.69 (1H, s, H-6), 5.84 (1H, dd, $J = 2.9, 6.4$ Hz, H-8), 6.22 (1H, d, $J = 16.1$ Hz, OtCin), 7.25* (2H, OtCin), 7.30 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, OtCin), 7.32 (1H, t, $J = 7.2$ Hz, OtCin), 7.41 (1H, d, $J = 16.1$ Hz, OtCin), 7.45 (2H, t, $J = 7.7$ Hz, OBz), 7.59 (1H, t, $J = 7.4$ Hz, OBz), 8.07 (2H, d, $J = 7.5$ Hz, OBz), MeOArO [3.86 (3H, s), 6.95 (2H, d, $J = 8.8$ Hz), 8.17 (2H, d, $J = 8.8$ Hz)]. * señal solapada.</p> <p>RMN ^{13}C (CDCl_3, 150 MHz) δ: 19.7 (c, C-15), 20.8 (c, OAc), 23.3 (t, C-2), 23.8 (c, C-14), 26.6 (c, C-13), 30.3 (c, C-12), 38.8 (t, C-3), 49.9 (s, C-10), 53.7 (d, C-7), 69.1 (d, C-8), 70.7 (s, C-4), 72.2 (d, C-1), 72.3 (d, C-9), 78.0 (d, C-6), 84.7 (s, C-11), 91.3 (s, C-5), 117.2 (d, OtCin), 128.1 (2 \times d, OtCin), 128.4 (2 \times d, OtCin), 128.7 (2 \times d, OBz), 129.4 (s, OBz), 130.2 (2 \times d, OBz), 130.4 (d, OtCin), 133.3 (d, OBz), 134.0 (s, OtCin), 145.6 (d, OtCin), 164.9 (s, OtCin), 165.6 (s, OBz), 169.9 (s, OAc), MeOArO [55.4 (c), 113.9 (2 \times d), 122.0 (s), 132.3 (2 \times d), 163.8 (s), 165.5 (s)].</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IE) m/z (%): 697 [M^+] (5), 575 (7), 560 (5), 500 (1), 270 (1), 148 (2), 135 (100), 131 (26), 105 (30), 77 (5).</p> <p>EMAR (IE) m/z: Calculado para $\text{C}_{40}\text{H}_{41}\text{O}_{11}$ [M^+]: 697.2649, observado 697.2645.</p>

Preparación del derivado 22a

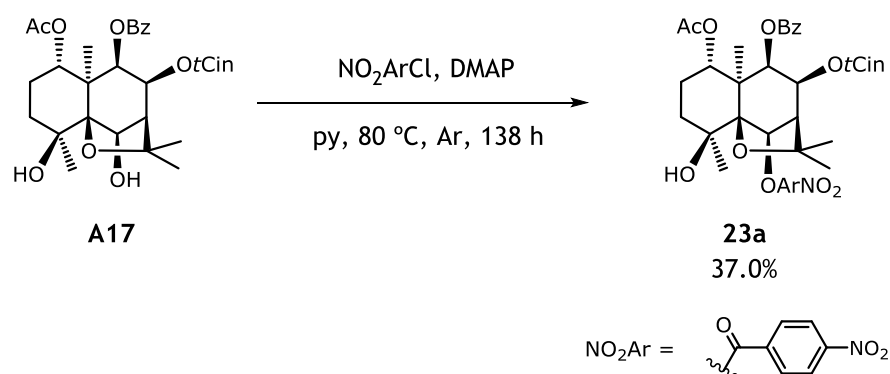


A una disolución de **A17** (4.9 mg, 0.009 mmol) en 0.5 mL de CH₂Cl₂ seco, a temperatura ambiente y bajo atmósfera de argón, se le añadió DMAP (10 mg, 0.08 mmol), Et₃N (0.2 mL, 1.43 mmol) y cloruro de 4-bromobenzoílo (17.8 mg, 0.08 mmol). La reacción se calentó a reflujo, se agitó durante 6 días y se siguió mediante CCF. Dado que la reacción no evolucionaba, se añadió imidazol (9 mg, 0.13 mmol), Et₃N (0.1 mL, 0.72 mmol) y cloruro de 4-bromobenzoílo (23.2 mg, 0.11 mmol) calentando a reflujo durante 6 días con agitación. Posteriormente, se paró añadiendo 0.5 mL de agua con agitación, se eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo se redisolvió en CH₂Cl₂, se lavó con 30 mL de disolución saturada de NaHCO₃, se secó sobre MgSO₄ anhidro, se filtró y se llevó a sequedad en el rotavapor. El residuo se purificó mediante CCFP usando como fases móviles mezclas de hexanos-AcOEt (3:2) y hexanos-acetona (3:1), obteniéndose el producto **22a** (1.4 mg, 21.7% de rendimiento) como un sólido amorfo.

Derivado 22a

Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo incoloro (1.4 mg).</p> <p>$[\alpha]_D^{28}$: -10.9° (c 0.11, CHCl₃).</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 1.36 (3H, s, Me-14), 1.51 (3H, s, Me-15), 1.52* (1H, H-2α), 1.55 (3H, s, Me-12), 1.69 (3H, s, OAc), 1.74 (3H, s, Me-13), 1.75* (1H, H-3α), 1.96 (2H, m, 2β, H-3β), 2.73 (1H, d, J = 3.2 Hz, H-7), 5.40 (1H, dd, J = 3.8, 11.7 Hz, H-1), 5.50 (1H, d, J = 6.4 Hz, H-9), 5.68 (1H, s, H-6), 5.83 (1H, dd, J = 3.2, 6.4 Hz, H-8), 6.22 (1H, d, J = 16.1 Hz, OtCin), 7.25* (2H, OtCin), 7.30 (2H, t, J = 7.7 Hz, OtCin), 7.33 (1H, t, J = 7.3 Hz, OtCin), 7.41 (1H, d, J = 16.1 Hz, OtCin), 7.45 (2H, t, J = 7.8 Hz, OBz), 7.60 (1H, tt, J = 1.0, 7.7 Hz, OBz), 8.07 (2H, dd, J = 1.3, 7.8 Hz, OBz), BrArO [7.62 (2H, d, J = 8.5 Hz), 8.08 (2H, d, J = 8.5 Hz)].</p> <p style="text-align: right;">* señal solapada.</p> <p>RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 19.7 (c, C-15), 20.8 (c, OAc), 23.3 (t, C-2), 23.8 (c, C-14), 26.6 (c, C-13), 30.3 (c, C-12), 38.8 (t, C-3), 49.9 (s, C-10), 53.8 (d, C-7), 69.1 (d, C-8), 70.7 (s, C-4), 72.2 (d, C-1), 72.3 (d, C-9), 78.5 (d, C-6), 84.8 (s, C-11), 91.3 (s, C-5), 117.1 (d, OtCin), 128.2 (2 × d, OtCin), 128.4 (2 × d, OtCin), 128.8 (2 × d, OBz), 129.4 (s, OBz), 130.3 (2 × d, OBz), 130.5 (d, OtCin), 133.4 (d, OBz), 134.0 (s, OtCin), 145.7 (d, OtCin), 164.9 (s, OtCin), 165.5 (s, OBz), 169.9 (s, OAc), BrArO [128.5 (s), 128.8 (s), 131.8 (2 × d), 132.1 (2 × d), 165.1 (s)].</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IE) m/z (%): 747 [M + 2 - CH₃]⁺ (4), 745 [M - CH₃]⁺ (4), 625 (13), 623 (12), 614 (4), 612 (4), 560 (17), 270 (5), 185 (28), 183 (29), 148 (12), 131 (71), 105 (100), 83 (17), 77 (9), 57 (14).</p> <p>EMAR (IE) m/z: Calculado para C₃₉H₃₈⁸¹BrO₁₀ [M + 2 - CH₃]⁺: 747.1628, observado 747.1625 y para C₃₉H₃₈⁷⁹BrO₁₀ [M - CH₃]⁺: calculado 745.1648, observado 745.1558.</p>

Preparación del derivado 23a

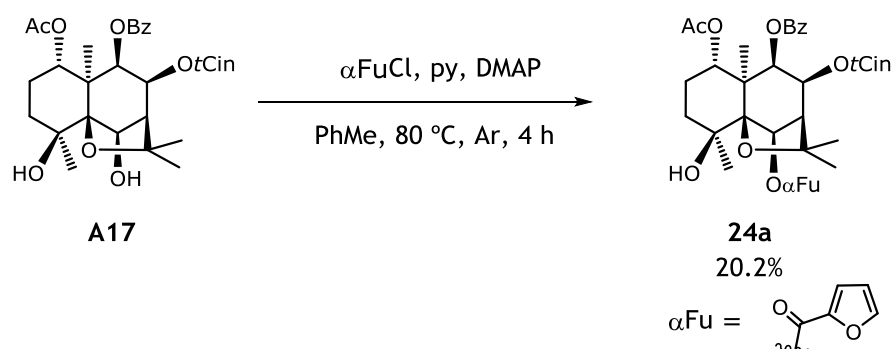


A una disolución de **A17** (5.8 mg, 0.010 mmol) en 0.5 mL de piridina (6.2 mmol), bajo atmósfera de argón y a temperatura ambiente, se le adicionó DMAP (12.3 mg, 0.10 mmol) y cloruro de 4-nitrobenzoílo (12.2 mg, 0.07 mmol). La mezcla se agitó a 80 °C durante 138 h, tras lo cual se diluyó con CH_2Cl_2 y se lavó con disolución saturada de NaHCO_3 (2×30 mL). La fase orgánica se secó sobre MgSO_4 anhidro, se filtró y se concentró a vacío. El crudo se purificó mediante CCF preparativa de gel de sílice, utilizando como fase móvil una mezcla de hexanos-AcOEt (1:1). Se obtuvieron 2.7 mg del producto **23a** como un sólido amorfo (37.0% de rendimiento).

Derivado 23a

Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo incoloro (2.7 mg).</p> <p>$[\alpha]_D^{20}$: -26.4° (c 0.13, CHCl₃).</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 1.37 (3H, s, Me-14), 1.50* (1H, H-2α), 1.52 (3H, s, Me-15), 1.55 (3H, s, Me-12), 1.70 (3H, s, OAc), 1.75 (3H, s, Me-13), 1.76* (1H, H-3α), 1.97 (2H, m, H-2β, H-3β), 2.76 (1H, d, J = 3.1 Hz, H-7), 3.02 (1H, s_A, OH-4), 5.41 (1H, dd, J = 4.1, 12.0 Hz, H-1), 5.51 (1H, d, J = 6.3 Hz, H-9), 5.72 (1H, s, H-6), 5.83 (1H, dd, J = 3.1, 6.3 Hz, H-8), 6.22 (1H, d, J = 16.0 Hz, OtCin), 7.26* (2H, OtCin), 7.31 (2H, d, J = 7.5 Hz, OtCin), 7.34 (1H, d, J = 7.3 Hz, OtCin), 7.41 (1H, d, J = 16.0 Hz, OtCin), 7.46 (2H, t, J = 7.8 Hz, OBz), 7.61 (1H, t, J = 7.1 Hz, OBz), 8.07 (2H, d, J = 7.8 Hz, OBz), NO₂ArO [8.32 (2H, d, J = 8.7 Hz), 8.41 (2H, d, J = 8.7 Hz)]. * señal solapada.</p> <p>RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 19.6 (c, C-15), 20.8 (c, OAc), 23.3 (t, C-2), 23.9 (c, C-14), 26.5 (c, C-13), 30.3 (c, C-12), 38.7 (t, C-3), 49.9 (s, C-10), 53.7 (d, C-7), 69.0 (d, C-8), 70.8 (s, C-4), 72.0 (d, C-1), 72.1 (d, C-9), 79.0 (d, C-6), 84.7 (s, C-11), 91.3 (s, C-5), 117.0 (d, OtCin), 128.2 (2 × d, OtCin), 128.4 (2 × d, OtCin), 128.8 (2 × d, OBz), 129.3 (s, OBz), 130.2 (2 × d, OBz), 130.5 (d, OtCin), 133.5 (d, OBz), 133.9 (s, OtCin), 145.8 (d, OtCin), 164.9 (s, OtCin), 165.5 (s, OBz), 169.9 (s, OAc), NO₂ArO [123.8 (2 × d), 131.4 (2 × d), 134.9 (s), 150.8 (s), 163.9 (s)].</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IE) m/z (%): 727 [M⁺] (0.1), 662 (3), 647 (6), 288 (6), 167 (19), 148 (79), 131 (5), 111 (24), 105 (8), 97 (36), 83 (41), 71 (59), 69 (45), 57 (100), 55 (60).</p> <p>EMAR (IE) m/z: Calculado para C₄₀H₄₁NO₁₂ [M⁺]: 727.2629, observado 727.2619.</p>

Preparación del derivado 24a

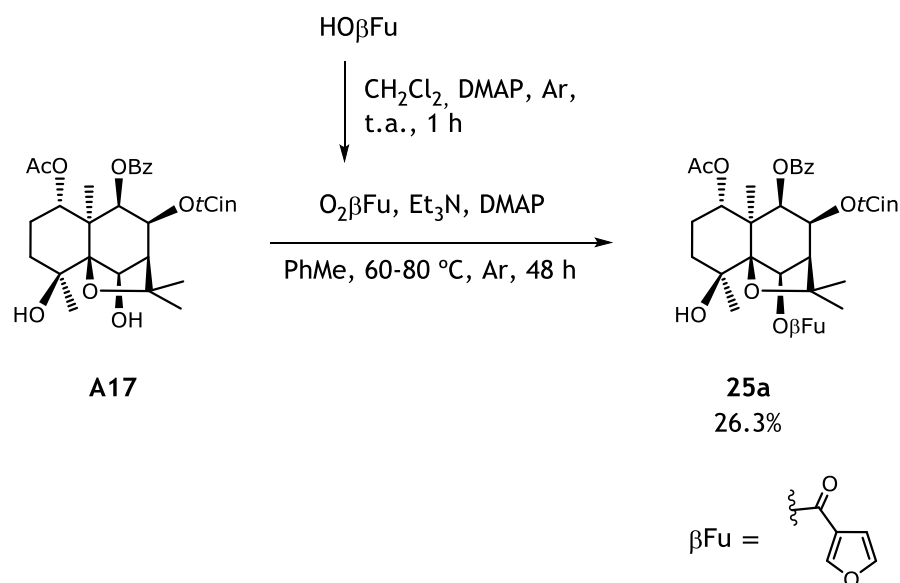


A una disolución de **A17** (6.4 mg, 0.011 mmol) en 0.5 mL de tolueno, bajo atmósfera de argón y a 80 °C, se le añadió DMAP (5 mg, 0.04 mmol), piridina (35 μL , 0.43 mmol) y cloruro de 2-furoilo (35 μL , 0.36 mmol). La reacción se siguió mediante CCF y se agitó durante 4 horas. Una vez finalizada la reacción, se paró diluyendo con 5 mL de CH_2Cl_2 y, posteriormente, lavamos con 50 mL de disolución saturada de CuSO_4 y 25 mL disolución saturada de NaHCO_3 . La fase orgánica se secó sobre MgSO_4 anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo fue fraccionado por CC de gel de sílice con un gradiente de hexanos- CH_2Cl_2 y, finalmente, se purificó mediante CCF preparativa de gel de sílice con una fase móvil de hexanos-AcOEt (3:2). De esta manera, se obtuvo el producto **24a** como un sólido amorfo (1.5 mg, 20.2% de rendimiento).

Derivado 24a

Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo incoloro (1.5 mg).</p> <p>$[\alpha]_D^{28}$: -20.9° (c 0.30, CHCl₃).</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 1.36 (3H, s, Me-14), 1.48* (1H, H-2α), 1.50 (3H, s, Me-15), 1.60 (3H, s, Me-12), 1.68 (3H, s, OAc), 1.72* (1H, H-3α), 1.74 (3H, s, Me-13), 1.94 (1H, m, H-2β), 1.97 (1H, m, H-3β), 2.69 (1H, d_A, J = 2.9 Hz, H-7), 2.98 (1H, s_A, OH-4), 5.40 (1H, dd, J = 3.9, 12.2 Hz, H-1), 5.48 (1H, d, J = 6.4 Hz, H-9), 5.70 (1H, s, H-6), 5.80 (1H, dd, J = 2.9, 6.4 Hz, H-8), 6.22 (1H, d, J = 16.1 Hz, OtCin), 7.26* (2H, OtCin), 7.30 (2H, t, J = 7.6 Hz, OtCin), 7.34 (1H, t, J = 7.2 Hz, OtCin), 7.40 (1H, d, J = 16.1 Hz, OtCin), 7.45 (2H, t, J = 7.6 Hz, OBz), 7.59 (1H, t, J = 7.2 Hz, OBz), 8.06 (2H, d, J = 7.8 Hz, OBz), OαFu [6.53 (1H, s_A), 7.35 (1H, s), 7.64 (1H, s)]. * señal solapada.</p> <p>RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 19.6 (c, C-15), 20.8 (c, OAc), 23.3 (t, C-2), 24.1 (c, C-14), 26.6 (c, C-13), 30.3 (c, C-12), 38.5 (t, C-3), 49.9 (s, C-10), 53.8 (d, C-7), 69.0 (d, C-8), 70.6 (s, C-4), 72.2 (d, C-1), 72.3 (d, C-9), 77.9 (d, C-6), 84.7 (s, C-11), 91.3 (s, C-5), 117.1 (d, OtCin), 128.1 (2 × d, OtCin), 128.4 (2 × d, OtCin), 128.7 (2 × d, OBz), 129.4 (s, OBz), 130.2 (2 × d, OBz), 130.4 (d, OtCin), 133.4 (d, OBz), 134.0 (s, OtCin), 145.7 (d, OtCin), 164.9 (s, OtCin), 165.5 (s, OBz), 169.9 (s, OAc), OαFu [112.1 (d), 119.6 (d), 144.2 (s), 147.3 (d), 157.4 (s)].</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IE) m/z (%): 657 [M - CH₃]⁺ (8), 560 (15), 535 (20), 475 (3), 248 (4), 173 (3), 131 (100), 105 (98), 103 (18), 95 (30), 83 (8), 77 (14).</p> <p>EMAR (IE) m/z: Calculado para C₃₇H₃₇O₁₁ [M - CH₃]⁺: 657.2336, observado 657.2335.</p>

Preparación del derivado 25a

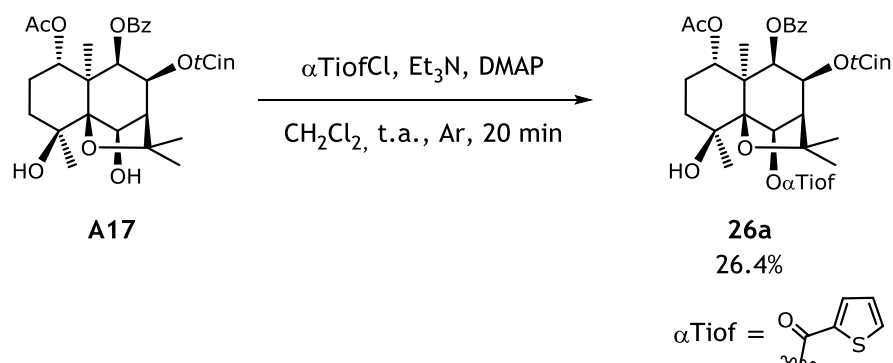


Una mezcla de ácido 3-furoico (11.8 mg, 0.11 mmol) y DCC (38.2 mg, 0.19 mmol) en 1 mL de CH_2Cl_2 seco, bajo atmósfera de argón y a temperatura ambiente, se agitó durante 1 h, se filtró sobre gel fina, se llevó a sequedad y se redisolvió en 0.5 mL de tolueno seco. La mezcla se añadió a **A17** (7.2 mg, 0.012 mmol) y DMAP (6 mg, 0.05 mmol), bajo atmósfera de argón y a 60 °C, tras lo cual se adicionó Et_3N (20 μL , 0.14 mmol) y se calentó a 80 °C. La reacción se agitó durante 48 h, tras lo cual se paró añadiendo 0.5 mL de EtOH con agitación durante 30 min. La mezcla se concentró a presión reducida, el residuo se disolvió en CH_2Cl_2 y se lavó con disolución saturada de NaHCO_3 (10 mL). La fase orgánica se secó sobre MgSO_4 anhidro, se filtró y se llevó a sequedad en el rotavapor. El crudo se purificó mediante CCFP usando como fases móviles hexanos-AcOEt (3:2, 4:1) y CH_2Cl_2 -acetona (3:2), obteniéndose el producto **25a** como un sólido amorfo (2.2 mg, 26.3 % de rendimiento).

Derivado 25a

Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo incoloro (2.2 mg).</p> <p>$[\alpha]_D^{20}$: -39.0° (c 0.12, CHCl₃).</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 1.36 (3H, s, Me-14), 1.47 (1H, m, H-2α), 1.49 (3H, s, Me-15), 1.57* (3H, Me-12), 1.69 (3H, s, OAc), 1.72* (1H, H-3α), 1.73 (3H, s, Me-13), 1.95 (2H, m, H-2β, H-3β), 2.69 (1H, d, J = 3.0 Hz, H-7), 2.94 (1H, s, OH-4), 5.39 (1H, dd, J = 4.0, 12.0 Hz, H-1), 5.48 (1H, d, J = 6.3 Hz, H-9), 5.63 (1H, s, H-6), 5.80 (1H, dd, J = 3.0, 6.3 Hz, H-8), 6.22 (1H, d, J = 16.1 Hz, OtCin), 7.25* (2H, OtCin), 7.30 (2H, t, J = 7.5 Hz, OtCin), 7.34 (1H, t, J = 7.1 Hz, OtCin), 7.40 (1H, d, J = 16.1 Hz, OtCin), 7.45 (2H, t, J = 8.0 Hz, OBz), 7.59 (1H, t, J = 7.4 Hz, OBz), 8.06 (2H, d, J = 7.5 Hz, OBz), OβFu [6.84 (1H, s), 7.44 (1H, s), 8.18 (1H, s)]. * señal solapada.</p> <p>RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 19.6 (c, C-15), 20.8 (c, OAc), 23.3 (t, C-2), 23.8 (c, C-14), 26.5 (c, C-13), 30.3 (c, C-12), 38.8 (t, C-3), 49.8 (s, C-10), 53.7 (d, C-7), 69.0 (d, C-8), 70.6 (s, C-4), 72.2 (d, C-1), 72.3 (d, C-9), 77.5 (d, C-6), 84.7 (s, C-11), 91.3 (s, C-5), 117.1 (d, OtCin), 128.1 (2 × d, OtCin), 128.4 (2 × d, OtCin), 128.7 (2 × d, OBz), 129.4 (s, OBz), 130.2 (2 × d, OBz), 130.4 (d, OtCin), 133.4 (d, OBz), 134.0 (s, OtCin), 145.7 (d, OtCin), 164.9 (s, OtCin), 165.5 (s, OBz), 169.9 (s, OAc), OβFu [109.8 (d), 119.1 (s), 144.0 (d), 149.2 (d), 161.9 (s)].</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IE) m/z (%): 657 [M - CH₃]⁺ (1), 560 (3), 535 (5), 270 (2), 215 (3), 173 (2), 155 (1), 131 (100), 105 (90), 95 (32), 83 (11), 77 (13), 57 (4).</p> <p>EMAR (IE) m/z: Calculado para C₃₇H₃₇O₁₁ [M - CH₃]⁺: 657.2336, observado 657.2311.</p>

Preparación del derivado 26a

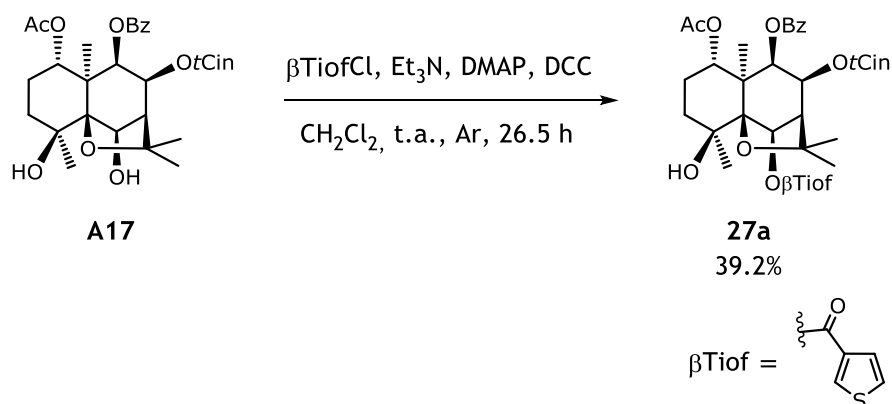


A una disolución de **A17** (5.1 mg 0.009 mmol) en 0.5 mL de CH_2Cl_2 seco, bajo atmósfera de argón y a temperatura ambiente, se le añadió Et_3N seca (0.2 mL, 1.43 mmol), DMAP (5 mg, 0.05 mmol) y cloruro de 2-tiofencarbonilo (0.2 mL, 1.84 mmol). La reacción se agitó durante 20 min, tras lo cual se paró añadiendo 0.5 mL de agua con agitación durante 30 min. La mezcla se lavó con 20 mL de disolución saturada de NaHCO_3 . La fase orgánica se secó sobre MgSO_4 anhidro, se filtró y se llevó a sequedad a vacío. El residuo fue fraccionado por CC de gel de sílice con un gradiente de hexanos- AcOEt y hexanos- CH_2Cl_2 y se purificó mediante CCF preparativa utilizando como fase móvil hexanos- AcOEt (3:1). De esta manera, se obtuvo el producto **26a** como un sólido amorfo (1.6 mg, 26.4% de rendimiento).

Derivado 26a

Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo incoloro (1.6 mg).</p> <p>$[\alpha]_D^{28}$: -48.1° (c 0.64, CHCl_3).</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ^1H (CDCl_3, 600 MHz) δ: 1.38 (3H, s, Me-14), 1.50* (1H, H-2α), 1.51 (3H, s, Me-15), 1.61 (3H, s, Me-12), 1.69 (3H, s, OAc), 1.73* (1H, H-3α), 1.74 (3H, s, Me-13), 1.94 (1H, m, H-2β), 1.97 (1H, dt, $J = 3.9$, 14.0 Hz, H-3β), 2.71 (1H, d, $J = 3.1$ Hz, H-7), 2.98 (1H, s_A, OH-4), 5.40 (1H, dd, $J = 4.0$, 12.2 Hz, H-1), 5.49 (1H, d, $J = 6.3$ Hz, H-9), 5.70 (1H, s, H-6), 5.81 (1H, dd, $J = 3.1$, 6.3 Hz, H-8), 6.22 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, OtCin), 7.25 (2H, d, $J = 7.7$ Hz, OtCin), 7.30 (2H, t, $J = 7.1$ Hz, OtCin), 7.34 (1H, t, $J = 7.2$ Hz, OtCin), 7.40 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, OtCin), 7.44 (2H, t, $J = 7.7$ Hz, OBz), 7.59 (1H, t, $J = 7.3$ Hz, OBz), 8.07 (2H, d, $J = 7.7$ Hz, OBz), OαTiof [7.13 (1H, t_A, $J = 4.4$ Hz), 7.61 (1H, d, $J = 4.4$ Hz), 7.96 (1H, d, $J = 3.6$ Hz)]. * señal solapada.</p> <p>RMN ^{13}C (CDCl_3, 150 MHz) δ: 19.6 (c, C-15), 20.8 (c, OAc), 23.3 (t, C-2), 23.9 (c, C-14), 26.5 (c, C-13), 30.4 (c, C-12), 38.7 (t, C-3), 49.9 (s, C-10), 53.8 (d, C-7), 69.1 (d, C-8), 70.6 (s, C-4), 72.2 (d, C-1), 72.3 (d, C-9), 78.2 (d, C-6), 84.7 (s, C-11), 91.3 (s, C-5), 117.1 (d, OtCin), 128.1 (2 \times d, OtCin), 128.4 (2 \times d, OtCin), 128.7 (2 \times d, OBz), 129.4 (s, OBz), 130.2 (2 \times d, OBz), 130.4 (d, OtCin), 133.4 (d, OBz), 134.0 (s, OtCin), 145.6 (d, OtCin), 164.9 (s, OtCin), 165.5 (s, OBz), 169.9 (s, OAc), OαTiof [128.0 (d), 133.2 (s), 133.5 (d), 134.7 (d), 161.2 (s)].</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IE) m/z (%): 673 [$\text{M} - \text{CH}_3$]⁺ (10), 560 (19), 551 (23), 449 (3), 369 (2), 270 (5), 230 (3), 148 (14), 131 (94), 111 (67), 105 (100), 77 (12).</p> <p>EMAR (IE) m/z: Calculado para $\text{C}_{37}\text{H}_{37}\text{SO}_{10}$ [$\text{M} - \text{CH}_3$]⁺: 673.2107, observado 673.2087.</p>

Preparación del derivado 27a



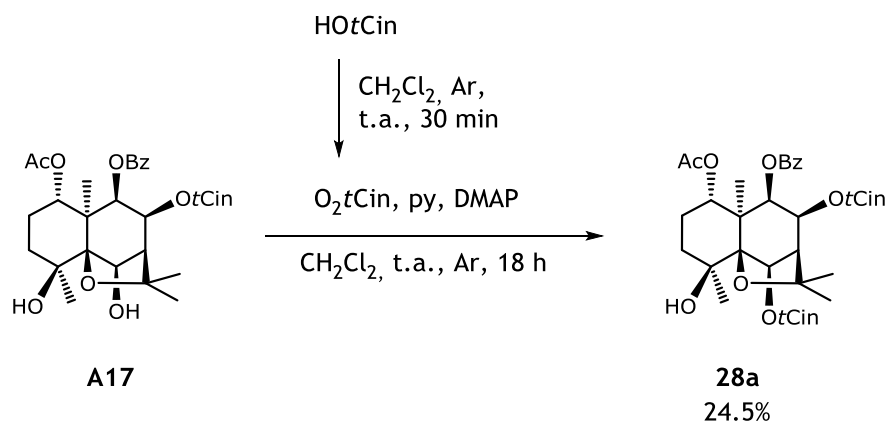
A una disolución de **A17** (8.8 mg, 0.015 mmol) en 0.3 mL de CH_2Cl_2 seco, se le añadió Et_3N seca (0.1 mL, 0.72 mmol), DMAP (5 mg, 0.05 mmol) y cloruro de 3-tiofencarbonilo (10.8 mg, 0.07 mmol), bajo atmósfera de argón, a temperatura ambiente y con agitación durante 60 min. Al no observarse evolución, se le añadió DCC (6 mg, 0.03 mmol), cloruro de ácido (6.6 mg, 0.05 mmol), DMAP (5 mg, 0.05 mmol) y Et_3N seca (0.1 mL, 0.72 mmol). Tras agitación durante 26 h 30 min, el crudo de reacción se llevó a sequedad en el rotavapor.

El residuo fue disuelto con CH_2Cl_2 , se lavó con 10 mL de HCl 1 M y disolución saturada de NaHCO_3 (10 mL). La fase orgánica se secó sobre MgSO_4 anhidro, se filtró y se llevó a sequedad en el rotavapor. El residuo fue purificado mediante CCF preparativa con fases móviles de hexanos–AcOEt (3:2), CH_2Cl_2 –acetona (9:1) y hexanos–1,4-dioxano (13:7), obteniéndose el producto **27a** como un sólido amorfo (4.1 mg, 39.2% de rendimiento).

Derivado 27a

Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo incoloro (4.1 mg).</p> <p>$[\alpha]_D^{28}$: -80.2° (c 0.40, CHCl₃).</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 1.36 (3H, s, Me-15), 1.45 (3H, s, Me-14), 1.49 (1H, m, H-2α), 1.61 (3H, s, Me-12), 1.67 (3H, s, OAc), 1.75 (3H, s, Me-13), 1.76 (1H, m, H-3α), 1.94 (1H, m, H-2β), 1.96 (1H, m, H-3β), 2.65 (1H, d, J = 3.1 Hz, H-7), 2.96 (1H, s_A, OH-4), 5.38 (1H, dd, J = 4.0, 11.9 Hz, H-1), 5.44 (1H, d, J = 6.5 Hz, H-9), 5.62 (1H, s, H-6), 5.71 (1H, dd, J = 3.1, 6.5 Hz, H-8), 6.19 (1H, d, J = 16.1 Hz, OtCin), 7.24 (2H, d, J = 7.5 Hz, OtCin), 7.30 (2H, t, J = 7.5 Hz, OtCin), 7.34 (1H, t, J = 7.5 Hz, OtCin), 7.38 (1H, d, J = 16.1 Hz, OtCin), 7.44 (2H, t, J = 7.8 Hz, OBz), 7.59 (1H, tt, J = 1.2, 7.5 Hz, OBz), 8.05 (2H, dd, J = 1.1, 8.1 Hz, OBz), OβTiof [7.33 (1H, d, J = 2.0 Hz), 7.48 (2H, t, J = 2.0 Hz), 7.71 (1H, d, J = 2.0 Hz)].</p> <p>RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 19.6 (c, C-15), 20.7 (c, OAc), 23.3 (t, C-2), 23.9 (c, C-14), 26.5 (c, C-13), 30.4 (c, C-12), 38.8 (t, C-3), 49.9 (s, C-10), 53.8 (d, C-7), 68.9 (d, C-8), 70.6 (s, C-4), 72.1 (d, C-1), 72.2 (d, C-9), 77.9 (d, C-6), 84.8 (s, C-11), 91.4 (s, C-5), 117.0 (d, OtCin), 128.1 (2 × d, OtCin), 128.4 (2 × d, OtCin), 128.7 (2 × d, OBz), 129.3 (s, OBz), 130.2 (2 × d, OBz), 130.4 (d, OtCin), 133.4 (d, OBz), 133.9 (s, OtCin), 145.7 (d, OtCin), 164.8 (s, OtCin), 165.5 (s, OBz), 169.9 (s, OAc), OβTiof [126.1 (2 × d), 139.8 (s), 139.9 (d), 157.9 (s)].</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IE) m/z (%): 688 [M⁺] (2), 617 (11), 611 (31), 600 (7), 560 (21), 336 (8), 248 (5), 230 (4), 202 (3), 189 (15), 171 (96), 148 (8), 131 (99), 105 (100), 83 (8), 77 (12).</p> <p>EMAR (IE) m/z: Calculado para C₃₈H₄₀SO₁₀ [M⁺] 688.2342, observado 688.2382.</p>

Preparación del derivado 28a

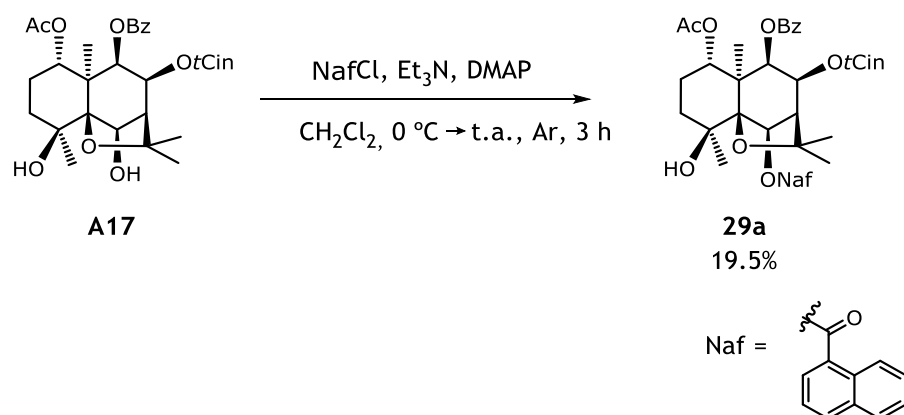


A una disolución de ácido cinámico (27.2 mg, 0.183 mmol) en 0.4 mL de CH₂Cl₂ seco, a temperatura ambiente y bajo atmósfera de argón, se le añadió de DCC (26.2 mg, 0.127 mmol), se agitó durante 30 min y se filtró. El filtrado se añadió a una mezcla de **A17** (7.0 mg, 0.012 mmol), piridina (15 µL, 0.185 mmol) y DMAP (11.0 mg, 0.09 mmol) a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón. La mezcla de reacción se agitó durante 18 h, período tras el cual se diluyó con CH₂Cl₂, se lavó con 10 mL de HCl (0.5 M), 10 mL de disolución saturada de NaHCO₃ y 10 mL de disolución saturada de NaCl. La fase orgánica se secó sobre MgSO₄ anhidro, se filtró y se llevó a sequedad a presión reducida. El residuo se purificó mediante CCF preparativa de gel de sílice usando como fases móviles hexanos-AcOEt (4:1 y 7:3) y hexanos-CH₂Cl₂ (3:2), rindiendo el producto **28a** (2.1 mg, 24.5% de rendimiento) como un sólido amorfo.

Derivado 28a

Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo incoloro (2.1 mg).</p> <p>$[\alpha]_D^{20}$: -34.8° (c 0.32, CHCl₃).</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 1.38 (3H, s, Me-14), 1.49* (1H, H-2α), 1.50 (3H, s, Me-15), 1.61 (3H, s, Me-12), 1.69 (3H, s, OAc), 1.73 (1H, m, H-3α), 1.74 (3H, s, Me-13), 1.94 (1H, m, H-2β), 1.96 (1H, m, H-3β), 2.65 (1H, d, J = 2.9 Hz, H-7), 2.98 (1H, s, OH-4), 5.39 (1H, dd, J = 3.9, 12.0 Hz, H-1), 5.48 (1H, d, J = 6.3 Hz, H-9), 5.65 (1H, s, H-6), 5.80 (1H, dd, J = 2.9, 6.3 Hz, H-8), 6.22 (1H, d, J = 16.0 Hz, OtCin-8), 7.25* (2H, OtCin-8), 7.30 (2H, t, J = 7.5 Hz, OtCin-8), 7.34 (1H, t, J = 7.3 Hz, OtCin-8), 7.41 (1H, d, J = 16.0 Hz, OtCin-8), 7.45 (2H, t, J = 7.6 Hz, OBz), 7.59 (1H, t, J = 7.5 Hz, OBz), 8.07 (2H, d, J = 7.8 Hz, OBz), OtCin-6 [6.48 (1H, d, J = 16.0 Hz), 7.40 (3H, m), 7.56 (2H, t, J = 3.3 Hz), 7.88 (1H, d, J = 16.0 Hz)]. * señal solapada.</p> <p>RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 19.6 (c, C-15), 20.8 (c, OAc), 23.3 (t, C-2), 23.9 (c, C-14), 26.5 (c, C-13), 30.3 (c, C-12), 38.7 (t, C-3), 49.9 (s, C-10), 53.8 (d, C-7), 69.1 (d, C-8), 70.6 (s, C-4), 72.2 (d, C-1), 72.3 (d, C-9), 77.7 (d, C-6), 84.7 (s, C-11), 91.4 (s, C-5), 117.2 (d, OtCin-8), 128.1 (2 × d, OtCin-8), 128.4 (2 × d, OtCin-8), 128.7 (2 × d, OBz), 129.4 (s, OBz), 130.2 (2 × d, OBz), 130.4 (d, OtCin-8), 133.3 (d, OBz), 134.0 (s, OtCin-8), 146.7 (d, OtCin-8), 164.9 (s, OtCin-8), 165.5 (s, OBz), 169.9 (s, OAc), OtCin-6 [117.5 (d), 128.4 (2 × d), 128.9 (2 × d), 130.6 (d), 134.2 (s), 145.6 (d), 165.9 (s)].</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IE) m/z (%): 708 [M⁺] (0.1), 693 (1), 571 (4), 270 (1), 248 (2), 202 (4), 155 (1), 131 (100), 105 (61), 77 (8), 57 (1).</p> <p>EMAR (IE) m/z: Calculado para C₄₂H₄₄O₁₀ [M⁺]: 708.2934, observado 708.2930.</p>

Preparación del derivado 29a

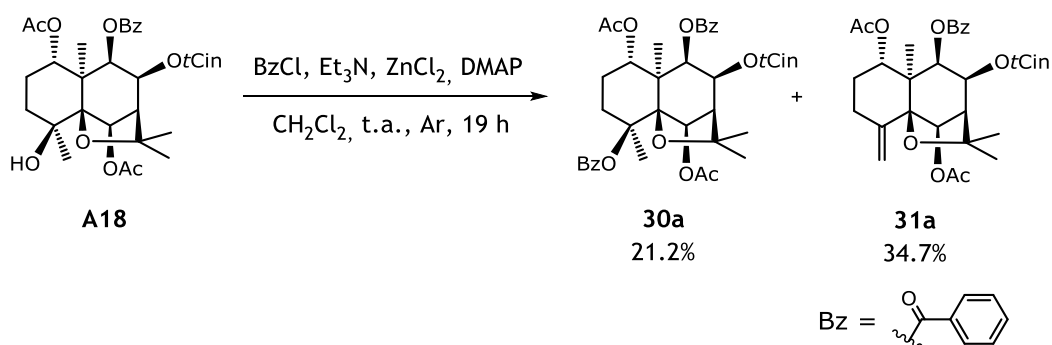


A una disolución de **A17** (7.7 mg, 0.013 mmol) en 1.5 mL de CH₂Cl₂ seco, bajo atmósfera de argón y a 0 °C, se le añadió Et₃N (0.25 mL, 1.78 mmol), cloruro de naftóilo (0.4 mL, 2.65 mmol) y DMAP (10 mg, 0.08 mmol). La mezcla se agitó durante 3 h y a temperatura ambiente, siguiendo la evolución de la reacción mediante CCF, tras lo cual la reacción se paró añadiendo 0.5 mL de MeOH. Se eliminó el disolvente a presión reducida y el crudo se fraccionó mediante CC de gel de sílice con un gradiente de hexanos–AcOEt. El crudo se llevó a sequedad, se disolvió en CH₂Cl₂, el cual se lavó con agua (2 × 20 mL). La fase orgánica se filtró y se llevó a sequedad. El residuo se purificó mediante CCFP usando como eluyente una mezcla de hexanos–AcOEt (7:3 y 3:2), obteniéndose 1.9 mg de producto **29a** como un sólido amorfo (19.5% de rendimiento).

Derivado 29a

Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo incoloro (1.9 mg).</p> <p>$[\alpha]_D^{20}$: -39.4° (c 0.09, CHCl₃).</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 1.44 (3H, s, Me-14), 1.52 (1H, m, H-2α), 1.56* (3H, Me-15), 1.60 (3H, s, Me-12), 1.70 (3H, s, OAc), 1.75 (3H, s, Me-13), 1.77* (1H, H-3α), 1.97 (1H, m, H-2β), 2.03 (1H, m, H-3β), 2.75 (1H, s_A, H-7), 3.12 (1H, s_A, OH-4), 5.43 (1H, dd, J = 3.1, 11.8 Hz, H-1), 5.54 (1H, d, J = 6.2 Hz, H-9), 5.91 (1H, dd, J = 3.1, 6.2 Hz, H-8), 5.93 (1H, s, H-6), 6.24 (1H, d, J = 16.1 Hz, OtCin), 7.26* (2H, OtCin), 7.31 (2H, t, J = 7.2 Hz, OtCin), 7.35 (1H, t, J = 7.2 Hz, OtCin), 7.42 (1H, d, J = 16.1 Hz, OtCin), 7.46 (2H, t, J = 7.7 Hz, OBz), 7.56 (1H, t, J = 7.4 Hz, OBz), 8.09 (2H, d, J = 7.7 Hz, OBz), ONaf [7.56 (1H, t, J = 7.4 Hz), 7.60 (1H, t, J = 7.4 Hz), 7.66 (1H, t, J = 8.2 Hz), 7.90 (1H, d, J = 8.1 Hz), 8.07 (1H, d, J = 8.5 Hz), 8.71 (1H, d, J = 7.8 Hz), 9.20 (1H, d, J = 8.6 Hz)]. * señal solapada.</p> <p>RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 19.7 (c, C-15), 20.8 (c, OAc), 23.3 (t, C-2), 23.9 (c, C-14), 26.6 (c, C-13), 30.5 (c, C-12), 38.8 (t, C-3), 50.0 (d, C-19), 54.0 (d, C-7), 69.2 (d, C-8), 70.7 (s, C-4), 72.2 (d, C-1), 72.3 (d, C-9), 77.5 (d, C-6), 84.9 (s, C-11), 91.5 (s, C-5), 117.2 (d, OtCin), 128.2 (2 \times d, OtCin), 128.5 (2 \times d, OtCin), 128.8 (2 \times d, OBz), 129.4 (s, OBz), 130.3 (2 \times d, OBz), 130.5 (d, OtCin), 133.4 (d, OBz), 133.8 (s, OtCin), 145.7 (d, OtCin), 165.0 (s, OtCin), 165.6 (s, OBz), 170.0 (s, OAc), ONaf [125.0 (d), 125.4 (s), 125.7 (d), 126.3 (d), 128.2 (d), 128.6 (d), 131.9 (s), 132.1 (d), 134.0 (s), 134.2 (d), 165.9 (s)].</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IE) m/z (%): 717 [M - CH₃]⁺ (0.6), 662 (2), 647 (3), 595 (2), 172 (6), 155 (100), 131 (44), 105 (50), 57 (32).</p> <p>EMAR (IE) m/z: Calculado para C₄₃H₄₁O₁₀ [M - CH₃]⁺: 717.2700, observado 717.2712.</p>

Preparación de los derivados 30a y 31a



A una disolución de **A18** (8.9 mg, 0.014 mmol) en 0.4 mL de CH_2Cl_2 seco, a temperatura ambiente y bajo atmósfera de argón, se le añadió Et_3N (15 μL , 0.11 mmol), cloruro de benzoilo (30 μL , 0.26 mmol) y ZnCl_2 (12 mg, 0.088 mmol). La mezcla se agitó durante 2 h. Al observar por CCF que la reacción no evolucionaba, se le añadió DMAP (5 mg, 0.04 mmol) y se agitó durante 17 h a temperatura ambiente, periodo tras lo cual se diluyó con CH_2Cl_2 , se lavó con de disolución saturada de NaHCO_3 (10 mL) y de NaCl (10 mL). La fase orgánica se secó sobre MgSO_4 anhidro, se filtró y se llevó a sequedad a vacío. El residuo fue purificado por CCFP usando como fase móvil hexanos-AcOEt (4:1), obteniéndose **30a** (2.2 mg, 21.2% de rendimiento) y **31a** (3.0 mg, 34.7% de rendimiento) como sólidos amorfos.

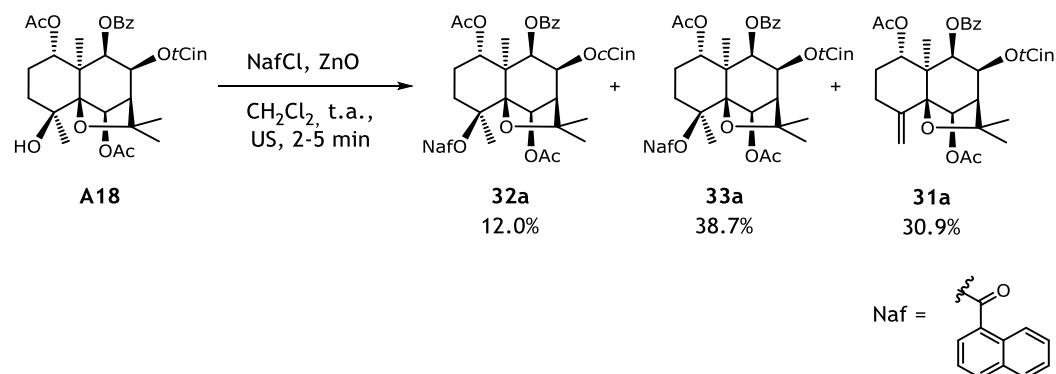
Derivado 30a

Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo incoloro (2.2 mg).</p> <p>$[\alpha]_D^{20}$: -83.0° (c 0.15, CHCl₃).</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 1.56* (1H, H-2α), 1.58 (3H, s, Me-15), 1.63 (3H, s, Me-12), 1.67 (3H, s, OAc-1), 1.75 (3H, s, Me-13), 1.84 (3H, s, Me-14), 2.01 (3H, s, OAc-6), 2.07 (1H, m, H-2β), 2.32 (1H, dt, J = 4.3, 13.9 Hz, H-3β), 2.57 (1H, d, J = 3.1 Hz, H-7), 3.02 (1H, td, J = 3.3, 13.6 Hz, H-3α), 5.49 (1H, d, J = 6.4 Hz, H-9), 5.53 (1H, dd, J = 4.3, 12.1 Hz, H-1), 5.71 (1H, s, H-6), 5.73 (1H, dd, J = 3.1, 6.4 Hz, H-8), 6.22 (1H, d, J = 16.0 Hz, OtCin), 7.25 (2H, d, J = 7.3 Hz, OtCin), 7.30 (2H, t, J = 7.4 Hz, OtCin), 7.34 (1H, t, J = 7.5 Hz, OtCin), 7.39 (1H, d, J = 16.0 Hz, OtCin), 7.44 (2H, t, J = 7.8 Hz, OBz-9), 7.59 (1H, t, J = 7.7 Hz, OBz-9), 8.06 (2H, d, J = 7.7 Hz, OBz-9), OBz-4 [7.42 (2H, t, J = 6.5 Hz), 7.53 (1H, t, J = 7.5 Hz), 8.08 (2H, d, J = 7.7 Hz)].</p> <p style="text-align: right;">* señal solapada.</p> <p>RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 20.4 (c, C-15), 20.7 (c, OAc-1), 21.4 (c, OAc-6), 22.6 (c, C-14), 22.8 (t, C-2), 26.7 (c, C-13), 31.5 (c, C-12), 32.1 (t, C-3), 51.3 (s, C-10), 53.7 (d, C-7), 69.1 (d, C-8), 71.9 (d, C-1), 73.0 (d, C-9), 77.8 (d, C-6), 83.7 (s, C-4), 84.9 (s, C-11), 91.1 (s, C-5), 117.1 (d, OtCin), 128.1 (2 × d, OtCin), 128.4 (2 × d, OtCin), 128.7 (2 × d, OBz-9), 129.3 (s, OBz-9), 130.3 (2 × d, OBz-9), 130.4 (d, OtCin), 133.4 (d, OBz-9), 134.0 (s, OtCin), 145.7 (d, OtCin), 164.9 (s, OtCin), 165.5 (s, OBz-9), 169.8 (s, OAc-6), 169.9 (s, OAc-1), OBz-4 [128.0 (2 × d), 129.3 (2 × d), 132.3 (d), 132.9 (s), 166.9 (s)].</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IE) m/z (%): 724 [M⁺] (0.8), 560 (8), 500 (8), 483 (5), 454 (4), 302 (1), 202 (2), 131 (49), 122 (10), 105 (100), 77 (23), 57 (2).</p> <p>EMAR (IE) m/z: Calculado para C₄₂H₄₄O₁₁ [M⁺]: 724.2884, observado 724.2913.</p>

Derivado 31a

Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo incoloro (1.8 mg).</p> <p>$[\alpha]_{\text{D}}^{28}$: -94.3° (c 0.18, CHCl₃).</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 1.28 (3H, s, Me-15), 1.37 (1H, m, H-2α), 1.46 (3H, s, Me-12), 1.62 (3H, s, OAc-1), 1.73 (3H, s, Me-13), 2.12 (3H, s, OAc-6), 2.15* (1H, H-2β), 2.17* (1H, H-3α), 2.56 (1H, d_A, J = 2.7 Hz, H-7), 2.72 (1H, dt, J = 4.4, 13.5 Hz, H-3β), 4.81 (1H, s, H-14), 5.09 (1H, s, H-14), 5.45 (1H, s, H-6), 5.57 (1H, d, J = 6.8 Hz, H-9), 5.64 (1H, dd, J = 4.8, 11.9 Hz, H-1), 5.76 (1H, dd, J = 2.7, 6.8 Hz, H-8), 6.19 (1H, d, J = 16.1 Hz, OtCin), 7.18 (2H, d, J = 7.8 Hz, OtCin), 7.28 (2H, t, J = 7.3 Hz, OtCin), 7.32 (1H, d, J = 16.1 Hz, OtCin), 7.33 (1H, t, J = 7.7 Hz, OtCin), 7.44 (2H, t, J = 7.5 Hz, OBz), 7.59 (1H, t, J = 7.7 Hz, OBz), 8.07 (2H, d, J = 7.7 Hz, OBz). * señal solapada.</p> <p>RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 19.0 (c, C-15), 20.8 (c, OAc-1), 21.3 (c, OAc-6), 26.8 (c, C-13), 27.5 (t, C-2), 31.8 (t, C-3), 31.9 (c, C-12), 50.4 (s, C-10), 53.3 (d, C-7), 69.0 (d, C-8), 70.6 (d, C-1), 72.6 (d, C-9), 77.2 (d, C-6), 83.0 (s, C-11), 88.6 (s, C-5), 112.8 (t, C-14), 117.2 (d, OtCin), 128.1 (2 × d, OtCin), 128.4 (2 × d, OtCin), 128.7 (2 × d, OBz), 129.3 (s, OBz), 130.3 (2 × d, OBz), 130.4 (d, OtCin), 133.3 (d, OBz), 134.0 (s, OtCin), 142.7 (s, C-4), 145.5 (d, OtCin), 164.8 (s, OtCin), 165.5 (s, OBz), 169.6 (s, OAc-6), 169.9 (s, OAc-1).</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IE) m/z (%): 602 [M⁺] (6), 587 (7), 560 (16), 500 (38), 471 (14), 454 (36), 423 (5), 369 (11), 230 (5), 202 (4), 131 (88), 105 (100), 83 (8), 77 (14).</p> <p>EMAR (IE) m/z: Calculado para C₃₅H₃₈O₉ [M⁺]: 602.2516, observado 602.2507.</p>

Preparación de los derivados **32a** y **33a**



Una mezcla de ZnO (11.8 mg, 0.14 mmol) y cloruro de naftoilo (40 μL , 0.27 mmol) se sonicó durante 2–5 min hasta obtener una suspensión gris, la cual se añadió a una disolución, previamente preparada, de **A18** (6.0 mg, 0.010 mmol) en 0.2 mL de CH_2Cl_2 seco dejando con ultrasonido durante 2–5 min. Se diluyó con CH_2Cl_2 , se filtró y se lavó con disolución saturada de NaHCO_3 (10 mL) y disolución saturada de NaCl (10 mL). La fase orgánica se secó sobre MgSO_4 anhidro, se filtró y se llevó a sequedad en el rotavapor. El residuo se fraccionó por cromatografía circular (Chromatotron, placa 1 mm) usando como eluyente hexanos– AcOEt (3:1). Las fracciones fueron reunidas de acuerdo con la similitud presentada en el análisis de CCF. El producto impuro se disolvió en Et_2O (5 mL) y se trató con KF (70.1 mg) y agitación durante 4 h a temperatura ambiente. Se filtró sobre celita y se purificó mediante CCFP con hexanos– AcOEt (4:1) y hexanos– CH_2Cl_2 (3:2), obteniéndose 0.9 mg de **32a** (12.0% de rendimiento), 2.9 mg de producto **33a** (38.7% de rendimiento), y 1.8 mg de **31a** (30.9% de rendimiento) como sólidos amorfos.

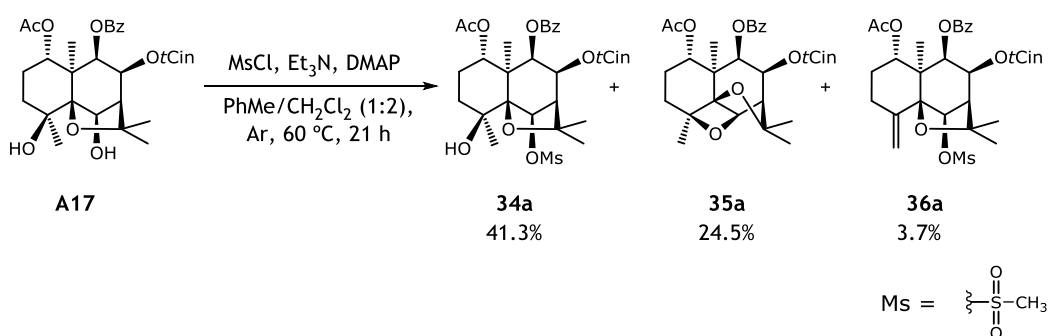
Derivado 32a

Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo incoloro (0.9 mg).</p> <p>$[\alpha]_D^{20}$: -33.3° (c 0.07, CHCl₃).</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 1.45 (3H, s, Me-15), 1.53* (1H, H-2α), 1.55* (3H, Me-12), 1.58 (3H, s, Me-13), 1.68 (3H, s, OAc-1), 1.85 (3H, s, Me-14), 1.93 (3H, s, OAc-6), 2.11 (1H, m, H-2β), 2.31 (1H, d, J = 2.6 Hz, H-7), 2.39 (1H, t_A, J = 13.8 Hz, H-3β), 3.12 (1H, d_A, J = 13.8 Hz, H-3α), 5.44 (1H, d, J = 6.3 Hz, H-9), 5.52 (1H, dd, J = 4.0, 12.3 Hz, H-1), 5.57 (1H, s, H-6), 5.62 (1H, dd, J = 2.6, 6.3 Hz, H-8), 5.65 (1H, d, J = 12.6 Hz, OcCin), 6.88 (1H, d, J = 12.6 Hz, OcCin), 7.32 (3H, m, OcCin), 7.46 (2H, m, OcCin), 7.59 (3H, m, OBz), 8.10 (2H, d, J = 7.8 Hz, OBz), ONaf [7.47 (2H, t, J = 8.1 Hz), 7.54 (1H, d, J = 7.5 Hz), 7.88 (1H, d, J = 8.1 Hz), 7.95 (2H, d, J = 7.5 Hz), 8.43 (1H, t, J = 8.1 Hz)].</p> <p style="text-align: right;">* señal solapada.</p> <p>RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 20.1 (c, C-15), 20.8 (c, OAc-1), 21.2 (c, OAc-6), 22.1 (c, C-14), 22.8 (t, C-2), 26.3 (c, C-13), 30.4 (c, C-12), 32.1 (t, C-3), 51.2 (s, C-10), 53.6 (d, C-7), 68.8 (d, C-8), 72.0 (d, C-1), 73.0 (d, C-9), 77.8 (d, C-6), 83.4 (s, C-4), 85.0 (s, C-11), 90.7 (d, C-5), 118.5 (d, OcCin), 128.0 (2 × d, OcCin), 128.3 (2 × d, OBz), 129.2 (d, OcCin), 129.3 (s, OBz), 129.9 (2 × d, OBz), 130.2 (2 × d, OcCin), 133.3 (d, OBz), 134.6 (s, OcCin), 145.0 (d, OcCin), 164.0 (s, OcCin), 165.6 (s, OBz), 169.7 (s, OAc-6), 169.9 (s, OAc-1), ONaf [124.1 (d), 125.4 (s), 126.3 (d), 127.3 (d), 127.5 (d), 128.1 (d), 131.3 (s), 131.4 (d), 133.5 (s), 134.0 (d), 167.7 (s)].</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IES) m/z (%): 797 [M + Na]⁺ (100).</p> <p>EMAR (IES) m/z: Calculado para C₄₆H₄₆O₁₁Na [M + Na]⁺: 797.2938, observado 797.2932.</p>

Derivado 33a

Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo incoloro (2.9 mg).</p> <p>$[\alpha]_D^{20}$: -97.5° (c 0.12, CHCl₃).</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 1.51* (1H, H-2α), 1.56* (3H, Me-15), 1.59 (3H, s, Me-12), 1.66 (3H, s, Me-13), 1.69 (3H, s, OAc-1), 1.87 (3H, s, Me-14), 1.96 (3H, s, OAc-6), 2.12 (1H, m, H-2β), 2.42 (1H, dt, J = 3.6, 13.7 Hz, H-3β), 2.46 (1H, d, J = 2.9 Hz, H-7), 3.15 (1H, td, J = 3.3, 13.4 Hz, H-3α), 5.49 (1H, d, J = 6.5 Hz, H-9), 5.58 (1H, dd, J = 4.2, 12.2 Hz, H-1), 5.64 (1H, s, H-6), 5.69 (1H, dd, J = 2.9, 6.5 Hz, H-8), 6.19 (1H, d, J = 16.1 Hz, OtCin), 7.23 (2H, d, J = 7.4 Hz, OtCin), 7.29 (2H, t, J = 7.7 Hz, OtCin), 7.33 (1H, t, J = 7.3 Hz, OtCin), 7.37 (1H, d, J = 16.1 Hz, OtCin), 7.46 (1H, t, J = 8.0 Hz, OBz), 7.54 (1H, t, J = 7.6 Hz, OBz), 7.61 (1H, t, J = 7.8 Hz, OBz), 8.10 (2H, d, J = 7.6 Hz, OBz), ONaf [7.47 (2H, t, J = 8.5 Hz), 7.60 (1H, t, J = 7.8 Hz), 7.88 (1H, d, J = 8.2 Hz), 7.96 (2H, t, J = 7.8 Hz), 8.43 (1H, d, J = 8.4 Hz)].</p> <p style="text-align: right;">* señal solapada.</p> <p>RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 20.1 (c, C-15), 20.7 (c, OAc-1), 21.2 (c, OAc-6), 22.1 (c, C-14), 22.8 (t, C-2), 26.6 (c, C-13), 30.5 (c, C-12), 32.1 (t, C-3), 51.2 (s, C-10), 53.7 (d, C-7), 69.2 (d, C-8), 72.0 (d, C-1), 73.0 (d, C-9), 77.7 (d, C-6), 83.4 (s, C-4), 85.0 (s, C-11), 90.8 (s, C-5), 117.1 (d, OtCin), 128.1 (2 × d, OtCin), 128.4 (2 × d, OtCin), 128.7 (2 × d, OBz), 129.3 (s, OBz), 130.3 (2 × d, OBz), 130.4 (d, OtCin), 133.4 (d, OBz), 133.5 (s, OtCin), 145.6 (d, OtCin), 164.9 (s, OtCin), 165.6 (s, OBz), 169.7 (s, OAc-6), 169.9 (s, OAc-1), ONaf [124.1 (d), 125.3 (s), 126.3 (d), 127.3 (d), 127.5 (d), 128.3 (d), 131.3 (s), 131.4 (d), 134.0 (s, d), 167.7 (s)].</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IES) m/z (%): 797 [M + Na]⁺ (100).</p> <p>EMAR (IES) m/z: Calculado para C₄₆H₄₆O₁₁Na [M + Na]⁺: 797.2938, observado 797.2927.</p>

Preparación de los derivados 34a–36a



A una disolución de **A17** (19.4 mg, 0.034 mmol) en 0.5 mL de tolueno seco, a 0 °C y bajo atmósfera de argón, le añadimos DMAP (5 mg, 0.04 mmol), Et₃N (0.3 mL, 2.15 mmol) y cloruro de metilsulfónico (0.05 mL, 0.65 mmol). Se observó la formación de un precipitado, por lo cual se adicionó 1 mL de CH₂Cl₂ seco. La reacción se agitó durante 1 h 40 min y se siguió mediante CCF. Una vez finalizada la reacción, se añadió hielo y se dejó agitando durante 30 min. La mezcla se diluyó con CH₂Cl₂ y se lavó con disolución saturada de NaHCO₃ (2 × 30 mL). La fase orgánica se secó sobre MgSO₄ anhidro, se filtró y se llevó a sequedad a presión reducida. El crudo se purificó mediante CCF preparativa con diferentes mezclas de hexanos–AcOEt (4:1, 3:2 y 11:9). Así, se obtuvieron los derivados **34a** (9.1 mg, 41.3% de rendimiento), **35a** (4.6 mg, 24.5% de rendimiento) y **36a** (0.8 mg, 3.7% de rendimiento) como sólidos amorfos.

Derivado 34a

Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo incoloro (9.1 mg).</p> <p>$[\alpha]_D^{28}$: -70.0° (c 1.01, CHCl₃).</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 1.48 (3H, s, Me-15), 1.49* (1H, H-2α), 1.50 (3H, s, Me-14), 1.60 (3H, s, Me-12), 1.68 (3H, s, OAc), 1.70 (1H, m, H-3α), 1.74 (3H, s, Me-13), 1.90 (1H, m, H-3β), 1.93 (1H, m, H-2β), 2.91 (1H, d, J = 3.1 Hz, H-7), 5.35 (1H, dd, J = 4.2, 12.2 Hz, H-1), 5.36 (1H, s, H-6), 5.43 (1H, d, J = 6.4 Hz, H-9), 5.67 (1H, dd, J = 3.1, 6.4 Hz, H-8), 6.21 (1H, d, J = 16.0 Hz, OtCin), 7.26 (2H, d, J = 7.1 Hz, OtCin), 7.31 (2H, t, J = 7.6 Hz, OtCin), 7.35 (1H, tt, J = 1.4, 7.1 Hz, OtCin), 7.41 (1H, d, J = 16.0 Hz, OtCin), 7.44 (2H, t, J = 7.8 Hz, OBz), 7.59 (1H, tt, J = 1.3, 7.4 Hz, OBz), 8.04 (2H, dd, J = 1.1, 8.4 Hz, OBz), OMes [3.13 (3H, s)].</p> <p style="text-align: right;">* señal solapada.</p> <p>RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 19.5 (c, C-15), 20.7 (c, OAc), 23.2 (t, C-2), 23.6 (c, C-14), 26.5 (c, C-13), 30.4 (c, C-12), 38.6 (t, C-3), 50.1 (s, C-10), 54.0 (d, C-7), 68.7 (d, C-8), 70.6 (s, C-4), 71.8 (d, C-1), 72.0 (d, C-9), 81.6 (d, C-6), 85.1 (s, C-11), 91.4 (s, C-5), 116.9 (d, OtCin), 128.2 (2 \times d, OtCin), 128.4 (2 \times d, OtCin), 128.8 (2 \times d, OBz), 129.2 (s, OBz), 130.2 (2 \times d, OBz), 130.5 (d, OtCin), 133.4 (d, OBz), 133.9 (s, OtCin), 145.9 (d, OtCin), 164.8 (s, OtCin), 165.4 (s, OBz), 169.8 (s, OAc), OMes [39.3 (c)].</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IE) m/z (%): 596 [M - CH₃COOH]⁺ (4), 542 (3), 519 (8), 429 (5), 394 (4), 335 (3), 247 (6), 207 (6), 188 (12), 173 (14), 148 (3), 131 (85), 105 (100), 96 (3), 95 (3), 77 (17).</p> <p>EMAR (IE) m/z: Calculado para C₃₂H₃₆SO₉ [M - CH₃COOH]⁺: 596.2080, observado 596.2102.</p>

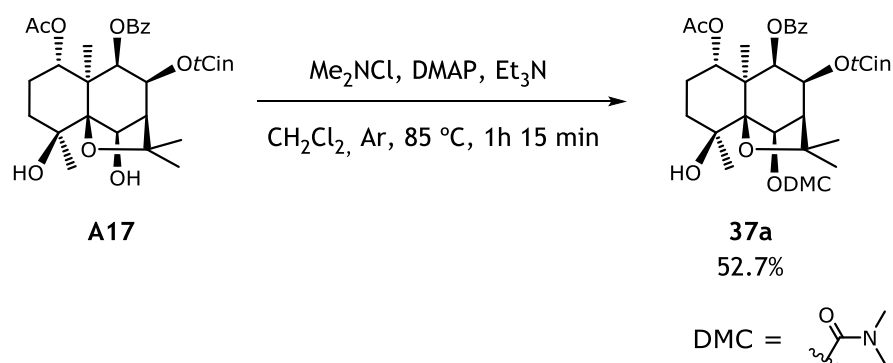
Derivado 35a

Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo incoloro (4.6 mg).</p> <p>$[\alpha]_D^{28}$: -51.9° (c 0.34, CHCl₃).</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ: 1.43 (3H, s, Me-15), 1.56* (1H, H-2α), 1.62 (3H, s, OAc), 1.69 (1H, d_A, J = 13.6 Hz, H-3α), 1.78 (3H, s, Me-12), 1.81 (3H, s, Me-13), 2.00 (3H, s, Me-14), 2.25 (1H, m, H-2β), 2.54 (1H, dt, J = 4.4, 13.6 Hz, H-3β), 2.75 (1H, s_A, H-7), 5.16 (1H, s, H-6), 5.49 (2H, s, H-8, H-9), 5.68 (1H, dd, J = 5.2, 11.8 Hz, H-1), 6.20 (1H, d, J = 16.1 Hz, OtCin), 7.21 (2H, d, J = 7.3 Hz, OtCin), 7.29 (2H, t, J = 7.7 Hz, OtCin), 7.34 (1H, t, J = 7.6 Hz, OtCin), 7.37 (1H, d, J = 16.1 Hz, OtCin), 7.46 (2H, t, J = 7.4 Hz, OBz), 7.62 (1H, t, J = 7.2 Hz, OBz), 8.07 (2H, d, J = 8.0 Hz, OBz). * señal solapada.</p> <p>RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ: 20.5 (c, C-15), 20.6 (c, OAc), 22.7 (t, C-2), 27.0 (c, C-14), 28.0 (c, C-13), 30.5 (c, C-12), 32.1 (t, C-3), 48.9 (s, C-10), 54.7 (d, C-7), 68.4 (d, C-8), 71.6 (d, C-1), 73.3 (d, C-9), 81.7 (s, C-4), 83.4 (s, C-5), 84.4 (d, C-6), 84.8 (s, C-11), 116.8 (d, OtCin), 128.1 (2 × d, OtCin), 128.5 (2 × d, OtCin), 128.7 (2 × d, OBz), 129.0 (s, OBz), 130.3 (2 × d, OBz), 130.5 (d, OtCin), 133.6 (d, OBz), 133.8 (s, OtCin), 146.0 (d, OtCin), 164.9 (s, OtCin), 165.4 (s, OBz), 169.7 (s, OAc).</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IE) m/z (%): 545 [M - CH₃]⁺ (23), 500 (2), 441 (1), 248 (1), 202 (1), 131 (50), 105 (100), 83 (2), 77 (12).</p> <p>EMAR (IE) m/z: Calculado para C₃₂H₃₃O₈ [M - CH₃]⁺: 545.2175, observado 545.2043.</p>

Derivado 36a

Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo incoloro (0.8 mg).</p> <p>$[\alpha]_D^{28}$: -58.6° (c 0.06, CHCl₃).</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 1.31 (3H, s, Me-15), 1.38 (1H, m, H-2α), 1.51 (3H, s, Me-12), 1.63 (3H, s, OAc), 1.76 (3H, s, Me-13), 2.15 (1H, m, H-2β), 2.17 (1H, m, H-3α), 2.70 (1H, dt, J = 3.7, 12.9 Hz, H-3β), 2.91 (1H, d, J = 3.3 Hz, H-7), 5.17 (2H, s, H14), 5.31 (1H, s, H-6), 5.56 (1H, d, J = 6.6 Hz, H-9), 5.62 (1H, dd, J = 4.9, 12.0 Hz, H-1), 5.69 (1H, dd, J = 3.3, 6.6 Hz, H-8), 6.20 (1H, d, J = 16.0 Hz, OtCin), 7.20 (2H, d, J = 7.7 Hz, OtCin), 7.29 (2H, t, J = 7.2 Hz, OtCin), 7.34 (1H, t, J = 7.4 Hz, OtCin), 7.36 (1H, d, J = 16.0 Hz, OtCin), 7.44 (2H, t, J = 7.6 Hz, OBz), 7.60 (1H, tt, J = 1.2, 7.5 Hz, OBz), 8.07 (2H, dd, J = 1.1, 7.4 Hz, OBz), OMs [3.11 (3H, s)].</p> <p>RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 19.0 (c, C-15), 20.8 (c, OAc), 26.8 (c, C-13), 27.6 (t, C-2), 31.8 (t, C-3), 31.9 (c, C-12), 50.8 (s, C-10), 53.6 (d, C-7), 68.8 (d, C-8), 70.3 (d, C-9), 72.4 (d, C-1), 81.5 (d, C-6), 83.4 (s, C-11), 88.9 (s, C-5), 113.8 (t, C-14), 116.9 (d, OtCin), 128.1 (2 \times d, OtCin), 128.4 (2 \times d, OtCin), 128.7 (2 \times d, OBz), 129.1 (s, OBz), 130.3 (2 \times d, OBz), 130.5 (d, OtCin), 133.4 (d, OBz), 133.9 (s, OtCin), 141.8 (s, C-4), 145.8 (d, OtCin), 164.8 (s, OtCin), 165.4 (s, OBz), 169.9 (s, OAc), OMs [39.2 (c)].</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IE) m/z (%): 638 [M⁺] (0.3), 623 (5), 559 (15), 507 (13), 411 (10), 289 (3), 229 (4), 189 (2), 131 (69), 105 (100), 103 (15), 95 (3), 77 (13), 57 (6).</p> <p>EMAR (IE) m/z: Calculado para C₃₄H₃₈SO₁₀ [M⁺]: 638.2186, observado 638.2197.</p>

Preparación del derivado 37a

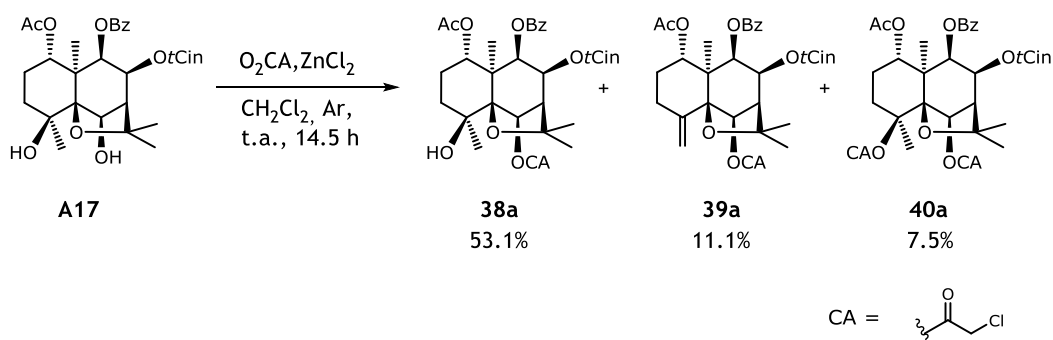


A una disolución **A17** (4.9 mg, 0.009 mmol) en 0.3 mL de tolueno seco, bajo atmósfera de argón y a temperatura ambiente, se le añadió DMAP (3 mg, 0.02 mmol), Et₃N seco (0.2 mL, 1.43 mmol) y cloruro de *N,N*-dimetilcarbamóilo (0.1 mL, 1.09 mmol). La reacción se siguió mediante CCF y se agitó a 85 °C durante 1 h 15 min. Trascurrido ese tiempo, se diluyó con CH₂Cl₂ y se lavó con 10 mL de HCl 1 M y 30 mL de disolución saturada de NaHCO₃. La fase orgánica se secó sobre MgSO₄ anhidro, se filtró y se llevó a sequedad en el rotavapor. El residuo se purificó mediante CCFP, usando como una fase móvil una mezcla de hexanos-AcOEt (1:1). Se obtuvo el producto **37a** como un sólido amorfo (2.9 mg, 52.7% de rendimiento).

Derivado 37a

Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo incoloro (2.9 mg).</p> <p>$[\alpha]_D^{28}$: -33.6° (c 0.13, CHCl₃).</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 1.36 (3H, s, Me-14), 1.47 (3H, s, Me-15), 1.49* (1H, H-2α), 1.57 (3H, s, Me-12), 1.67 (3H, s, OAc), 1.69* (1H, H-3α), 1.71 (3H, s, Me-13), 1.92 (2H, m, H-2β, H-3β), 2.62 (1H, d, J = 3.1 Hz, H-7), 2.90 (1H, s_A, OH-4), 5.36 (1H, dd, J = 3.9, 12.1 Hz, H-1), 5.45 (1H, d, J = 6.4 Hz, H-9), 5.49 (1H, s, H-6), 5.74 (1H, dd, J = 3.1, 6.4 Hz, H-8), 6.20 (1H, d, J = 16.1 Hz, OtCin), 7.24 (2H, d, J = 7.4 Hz, OtCin), 7.30 (2H, t, J = 7.5 Hz, OtCin), 7.34 (1H, t, J = 7.1 Hz, OtCin), 7.38 (1H, d, J = 16.1 Hz, OtCin), 7.44 (2H, t, J = 7.7 Hz, OBz), 7.58 (1H, t, J = 7.6 Hz, OBz), 8.05 (2H, d, J = 8.0 Hz, OBz), ODMC [2.96 (3H, s), 3.02 (3H, s)].</p> <p style="text-align: right;">* señal solapada.</p> <p>RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 19.6 (c, C-15), 20.8 (c, OAc), 22.7 (t, C-2), 23.8 (c, C-14), 26.6 (c, C-13), 30.0 (c, C-12), 38.8 (t, C-3), 49.9 (s, C-10), 53.9 (d, C-7), 69.2 (d, C-8), 70.5 (s, C-4), 72.3 (d, C-1), 72.4 (d, C-9), 78.7 (d, C-6), 84.6 (s, C-11), 91.6 (s, C-5), 117.3 (d, OtCin), 128.1 (2 × d, OtCin), 128.4 (2 × d, OtCin), 128.7 (2 × d, OBz), 129.4 (s, OBz), 130.2 (2 × d, OBz), 130.3 (d, OtCin), 133.3 (d, OBz), 134.0 (s, OtCin), 145.4 (d, OtCin), 164.8 (s, OtCin), 165.5 (s, OBz), 169.9 (s, OAc), ODMC [35.9 (c), 36.5 (c), 155.5 (s)].</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IE) m/z (%): 634 [M - CH₃]⁺ (9), 560 (5), 501 (6), 322 (5), 248 (6), 207 (8), 191 (5), 181 (6), 148 (8), 131 (92), 109 (14), 105 (100), 97 (23), 83 (31), 77 (13), 72 (54), 69 (41), 57 (44).</p> <p>EMAR (IE) m/z: Calculado para C₃₅H₄₀NO₁₀ [M - CH₃]⁺: 634.2652, observado 634.2754.</p>

Preparación de los derivados 38a–40a



A una disolución de **A17** (26.3 mg, 0.045 mmol) en 0.6 mL de CH_2Cl_2 seco, bajo atmósfera de argón y a temperatura ambiente, se le añadió ZnCl_2 (6 mg, 0.04 mmol) y anhídrido cloroacético (81.7 mg, 0.48 mmol). La reacción se dejó bajo agitación durante 14 h 30 min y se siguió mediante CCF. Se paró diluyendo con CH_2Cl_2 y se lavó con HCl 0.5 M (10 mL), disolución saturada de NaHCO_3 (10 mL) y disolución saturada de NaCl (10 mL). La fase orgánica se secó sobre MgSO_4 anhidro, se filtró y se llevó a sequedad a presión reducida. El residuo se purificó mediante CCF preparativa con una mezcla de hexanos– AcOEt (4:1) como eluyente, obteniéndose los derivados **38a** (15.8 mg, 53.1% de rendimiento), **39a** (3.2 mg, 11.1% de rendimiento) y **40a** (2.5 mg, 7.5% de rendimiento) como sólidos amorfos.

Derivado 38a

Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo incoloro (15.8 mg).</p> <p>$[\alpha]_D^{20}$: -77.9° (c 1.58, CHCl₃).</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 1.34 (3H, s, Me-14), 1.47 (3H, s, Me-15), 1.49* (1H, H-2α), 1.56 (3H, s, Me-12), 1.68 (3H, s, OAc), 1.70* (1H, H-3α), 1.73 (3H, s, Me-13), 1.91 (1H, m, H-3β), 1.93 (1H, m, H-2β), 2.59 (1H, d, J = 3.2 Hz, H-7), 2.82 (1H, s, OH-4), 5.37 (1H, dd, J = 4.2, 12.4 Hz, H-1), 5.45 (1H, d, J = 6.5 Hz, H-9), 5.66 (1H, s, H-6), 5.71 (1H, dd, J = 3.2, 6.5 Hz, H-8), 6.21 (1H, d, J = 16.1 Hz, OtCin), 7.24 (2H, d, J = 7.5 Hz, OtCin), 7.30 (2H, t, J = 7.8 Hz, OtCin), 7.34 (1H, d, J = 7.3 Hz, OtCin), 7.39 (1H, d, J = 16.1 Hz, OtCin), 7.45 (2H, t, J = 7.8 Hz, OBz), 7.60 (1H, t, J = 7.3 Hz, OBz), 8.05 (2H, d, J = 7.8 Hz, OBz), OCA [4.10, 4.15 (2H, d_{AB}, J = 14.9 Hz)]. * señal solapada.</p> <p>RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 19.5 (c, C-15), 20.7 (c, OAc), 23.2 (t, C-2), 24.1 (c, C-14), 26.5 (c, C-13), 30.3 (c, C-12), 38.3 (t, C-3), 50.0 (s, C-10), 53.7 (d, C-7), 69.0 (d, C-8), 70.5 (s, C-4), 72.0 (d, C-1), 72.1 (d, C-9), 79.1 (d, C-6), 84.7 (s, C-11), 91.4 (s, C-5), 116.9 (d, OtCin), 128.1 (2 \times d, OtCin), 128.4 (2 \times d, OtCin), 128.7 (2 \times d, OBz), 129.3 (s, OBz), 130.2 (2 \times d, OBz), 130.5 (d, OtCin), 133.4 (d, OBz), 133.9 (s, OtCin), 145.8 (d, OtCin), 164.9 (s, OtCin), 165.5 (s, OBz), 169.8 (s, OAc), OCA [40.9 (t), 166.5 (s)].</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IE) m/z (%): 641 [M - CH₃]⁺ (0.4), 639 [M - 2 - CH₃]⁺ (1), 519 (6), 517 (16), 207 (1), 205 (3), 173 (3), 148 (5), 145 (3), 131 (100), 105 (97), 83 (6), 77 (9), 57 (1).</p> <p>EMAR (IE) m/z: Calculado para C₃₄H₃₆³⁷ClO₁₀ [M - CH₃]⁺: 641.1968, observado 641.1982.</p>

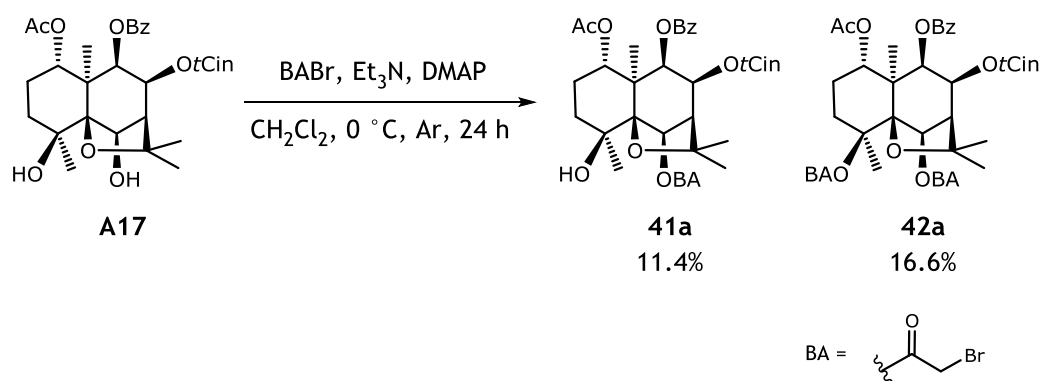
Derivado 39a

Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo incoloro (3.2 mg).</p> <p>$[\alpha]_D^{20}$: -74.5° (c 0.25, CHCl₃).</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 1.29 (3H, s, Me-15), 1.46 (3H, s, Me-12), 1.53* (1H, H-2α), 1.63 (3H, s, OAc), 1.74 (3H, s, Me-13), 2.16 (2H, m, H-2β, H-3α), 2.61 (1H, d, J = 3.1 Hz, H-7), 2.72 (1H, dt, J = 4.2, 13.0 Hz, H-3β), 4.78 (1H, s, H-14), 5.10 (1H, s, H-14), 5.52 (1H, s, H-6), 5.58 (1H, d, J = 6.8 Hz, H-9), 5.64 (1H, dd, J = 4.6, 11.9 Hz, H-1), 5.76 (1H, dd, J = 3.1, 6.8 Hz, H-8), 6.19 (1H, d, J = 16.1 Hz, OtCin), 7.18 (2H, d, J = 7.5 Hz, OtCin), 7.29 (2H, t, J = 7.6 Hz, OtCin), 7.32 (1H, t, J = 7.1 Hz, OtCin), 7.33 (1H, d, J = 16.1 Hz, OtCin), 7.44 (2H, t, J = 7.6 Hz, OBz), 7.60 (1H, t, J = 7.3 Hz, OBz), 8.07 (2H, d, J = 7.6 Hz, OBz), OCA [4.07, 4.11 (2H, d_{AB}, J = 14.7 Hz)].</p> <p style="text-align: right;">* señal solapada.</p> <p>RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 19.0 (c, C-15), 20.8 (c, OAc), 26.8 (c, C-13), 27.5 (t, C-2), 31.8 (t, C-3), 31.9 (c, C-12), 50.6 (s, C-10), 53.3 (d, C-7), 68.9 (d, C-8), 70.5 (d, C-1), 72.5 (d, C-9), 79.0 (d, C-6), 83.1 (s, C-11), 88.7 (s, C-5), 112.9 (t, C-14), 117.0 (d, OtCin), 128.1 (2 × d, OtCin), 128.4 (2 × d, OtCin), 128.7 (2 × d, OBz), 129.2 (s, OBz), 130.3 (2 × d, OBz), 130.4 (d, OtCin), 133.4 (d, OBz), 133.9 (s, OtCin), 142.5 (s, C-4), 145.7 (d, OtCin), 164.8 (s, OtCin), 165.4 (s, OBz), 169.9 (s, OAc), OCA [40.8 (t), 166.1 (s)].</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IE) m/z (%): 623 [M + 2 - CH₃]⁺ (1), 621 [M - CH₃]⁺ (2), 508 (2), 507 (8), 506 (6), 505 (22), 490 (4), 488 (10), 385 (3), 383 (8), 325 (2), 323 (8), 247 (5), 131 (79), 105 (100), 77 (15).</p> <p>EMAR (IE) m/z: Calculado para C₃₄H₃₄³⁷ClO₉ [M + 2 - CH₃]⁺: 623.1861, observado 623.1833 y para C₃₄H₃₄³⁵ClO₉ [M - CH₃]⁺: calculado 621.1891, observado 621.1918.</p>

Derivado 40a

Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo incoloro (2.5 mg).</p> <p>$[\alpha]_D^{20}$: -55.5° (c 0.33, CHCl₃).</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 1.49* (1H, H-2α), 1.51 (3H, s, Me-15), 1.56 (3H, s, Me-12), 1.67 (3H, s, OAc), 1.72 (3H, s, Me-13), 1.73 (3H, s, Me-14), 2.03 (1H, m, H-2β), 2.13 (1H, dt, J = 4.1, 13.9 Hz, H-3β), 2.62 (1H, d, J = 3.2 Hz, H-7), 2.87 (1H, td, J = 3.5, 13.4 Hz, H-3α), 5.46 (1H, d, J = 6.6 Hz, H-9), 5.48 (1H, dd, J = 4.3, 11.9 Hz, H-1), 5.65 (1H, s, H-6), 5.69 (1H, dd, J = 3.2, 6.6 Hz, H-8), 6.21 (1H, d, J = 16.0 Hz, OtCin), 7.24 (2H, d, J = 7.5 Hz, OtCin), 7.30 (2H, t, J = 7.9 Hz, OtCin), 7.35 (1H, t, J = 7.8 Hz, OtCin), 7.38 (1H, d, J = 16.0 Hz, OtCin), 7.44 (2H, t, J = 7.7 Hz, OBz), 7.60 (1H, t, J = 7.5 Hz, OBz), 8.06 (2H, d, J = 7.7 Hz, OBz), OCA × 2 [4.05, 4.09 (2H, d_{AB}, J = 14.5 Hz), 4.10, 4.12 (2H, d_{AB}, J = 15.0 Hz)]. * señal solapada.</p> <p>RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 19.7 (c, C-15), 20.7 (c, OAc), 21.5 (c, C-14), 22.7 (t, C-2), 26.4 (c, C-13), 29.8 (c, C-12), 31.8 (t, C-3), 51.2 (s, C-10), 53.6 (d, C-7), 69.0 (d, C-8), 71.6 (d, C-1), 72.6 (d, C-9), 79.5 (d, C-6), 83.9 (s, C-4), 84.9 (s, C-11), 90.4 (s, C-5), 116.9 (d, OtCin), 128.1 (2 × d, OtCin), 128.4 (2 × d, OtCin), 128.8 (2 × d, OBz), 129.2 (s, OBz), 130.2 (2 × d, OBz), 130.5 (d, OtCin), 133.5 (d, OBz), 133.9 (s, OtCin), 145.9 (d, OtCin), 164.9 (s, OtCin), 165.5 (s, OBz), 169.8 (s, OAc), OCA × 2 [40.7 (t), 42.3 (t), 165.5 (s), 166.1 (s)].</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IE) m/z (%): 719 [M + 4 - CH₃]⁺ (0.3), 717 [M + 2 - CH₃]⁺ (1), 715 [M - CH₃]⁺ (1), 603 (1), 601 (5), 599 (7), 521 (0.5), 519 (8), 517 (21), 490 (1), 488 (3), 323 (2), 247 (3), 173 (2), 131 (98), 105 (100), 83 (12), 77 (12), 57 (3).</p> <p>EMAR (IE) m/z: Calculado para C₃₆H₃₇³⁵Cl₂O₁₁ [M - CH₃]⁺: 715.1713, observado 715.1699.</p>

Preparación de los derivados **41a** y **42a**



A una disolución de **A17** (33.5 mg, 0.058 mmol) en 2 mL de CH_2Cl_2 seco, a $0\text{ }^\circ\text{C}$ bajo atmósfera de argón, se le añadió lentamente Et_3N (0.1 mL, 0.72 mmol) y bromuro de bromoacetilo (0.1 mL, 1.15 mmol). La mezcla se dejó agitando durante 24 h a temperatura ambiente, periodo tras lo cual se comprobó mediante CCF la conversión completa del producto de partida. Se paró la reacción adicionando, lentamente a $0\text{ }^\circ\text{C}$, 2 mL de EtOH y se dejó bajo agitación durante 1 h. Se eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo se fraccionó por CC de gel de sílice usando como eluyente un gradiente de CH_2Cl_2 -acetona. Posteriormente, el producto impuro se purificó mediante CCFP con fases móviles de hexanos-AcOEt (1:9, 4:1, 7:3, 3:2, 11:9), hexanos- CH_2Cl_2 (1:7), CH_2Cl_2 -acetona (19:1), hexanos-1,4-dioxano (7:3) y hexanos-éter etílico (2:3 y 3:7). Así se obtuvieron 4.6 mg del producto **41a** (11.4% de rendimiento) y 7.9 mg del producto **42a** (16.6% de rendimiento) como sólidos amorfos.

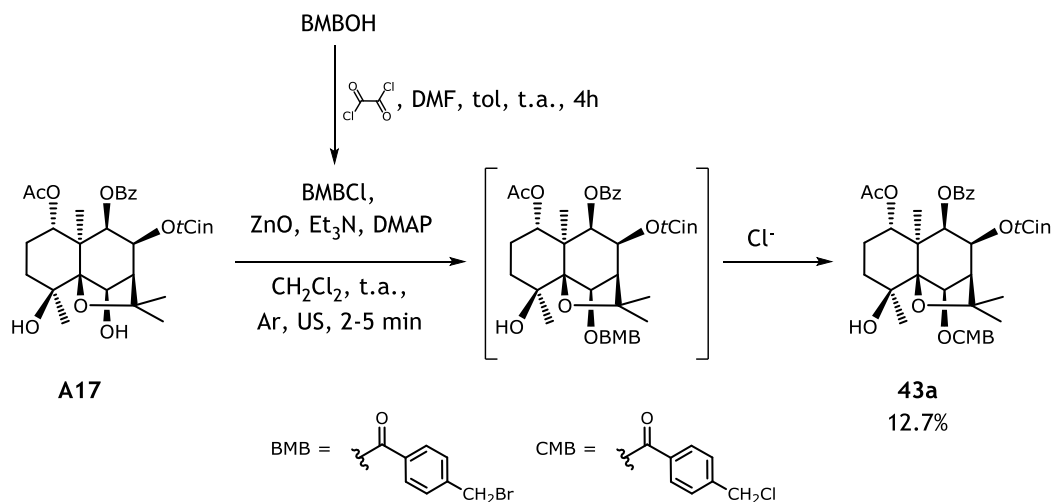
Derivado 41a

Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo incoloro (4.6 mg).</p> <p>$[\alpha]_D^{28}$: -129.5° (c 0.14, CHCl₃).</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 1.38 (3H, s, Me-14), 1.52 (3H, s, Me-15), 1.54 (1H, m, H-2α), 1.61 (3H, s, Me-12), 1.71 (3H, s, OAc), 1.73 (1H, m, H-3α), 1.76 (3H, s, Me-13), 1.96 (2H, m, H-2β, H-3β), 2.61 (1H, d, J = 3.3 Hz, H-7), 2.86 (1H, s_A, OH-4), 5.40 (1H, dd, J = 4.1, 11.9 Hz, H-1), 5.48 (1H, d, J = 6.4 Hz, H-9), 5.66 (1H, s, H-6), 5.74 (1H, dd, J = 3.4, 6.4 Hz, H-8), 6.21 (1H, d, J = 16.1 Hz, OtCin), 7.26 (2H, m, OtCin), 7.34 (2H, t, J = 7.6 Hz, OtCin), 7.38 (1H, t, J = 7.1 Hz, OtCin), 7.42 (1H, d, J = 16.1 Hz, OtCin), 7.48 (2H, t, J = 7.8 Hz, OBz), 7.63 (1H, t, J = 7.2 Hz, OBz), 8.09 (2H, d, J = 7.8 Hz, OBz), OBA [3.91, 3.93 (2H, d_{AB}, J = 12.2 Hz)].</p> <p>RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 19.6 (c, C-15), 20.7 (c, OAc), 23.3 (t, C-2), 24.2 (c, C-14), 26.5 (c, C-13), 30.5 (c, C-12), 38.4 (t, C-3), 50.0 (s, C-10), 53.7 (d, C-7), 69.0 (d, C-8), 70.5 (s, C-4), 72.1 (d, C-1), 72.2 (d, C-9), 79.2 (d, C-6), 84.8 (s, C-11), 91.4 (s, C-5), 117.0 (d, OtCin), 128.1 (2 × d, OtCin), 128.4 (2 × d, OtCin), 128.8 (2 × d, OBz), 129.3 (s, OBz), 130.2 (2 × d, OBz), 130.5 (d, OtCin), 133.4 (d, OBz), 133.9 (s, OtCin), 145.8 (d, OtCin), 164.9 (s, OtCin), 165.5 (s, OBz), 169.9 (s, OAc), OBA [25.6 (t), 166.4 (s)].</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IES) m/z (%): 723 [M + 2 + Na]⁺ (100), 721 [M + Na]⁺ (97).</p> <p>EMAR (IES) m/z: Calculado para C₃₅H₃₉⁷⁹BrO₁₀Na [M + Na]⁺: 721.1624, observado 721.1611 y para C₃₅H₃₉⁸¹BrO₁₀Na [M + 2 + Na]⁺: calculado 723.1604, observado 723.1616.</p>

Derivado 42a

Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo incoloro (7.9 mg).</p> <p>$[\alpha]_D^{20}$: -41.0° (c 0.44, CHCl₃).</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 1.50* (1H, H-2α), 1.51 (3H, s, Me-15), 1.58* (3H, Me-12), 1.67 (3H, s, OAc), 1.72 (3H, s, Me-14), 1.73 (3H, s, Me-13), 2.03 (1H, m, H-2β), 2.13 (1H, dt, <i>J</i> = 3.9, 14.0 Hz, H-3β), 2.60 (1H, d, <i>J</i> = 3.1 Hz, H-7), 2.86 (1H, td, <i>J</i> = 3.4, 13.3 Hz, H-3α), 5.46 (1H, d, <i>J</i> = 6.5 Hz, H-9), 5.48 (1H, dd, <i>J</i> = 4.2, 12.1 Hz, H-1), 5.63 (1H, s, H-6), 5.69 (1H, dd, <i>J</i> = 3.1, 6.5 Hz, H-8), 6.21 (1H, d, <i>J</i> = 16.0 Hz, OtCin), 7.24 (2H, d, <i>J</i> = 7.7 Hz, OtCin), 7.30 (2H, t, <i>J</i> = 7.3 Hz, OtCin), 7.35 (1H, t, <i>J</i> = 7.1 Hz, OtCin), 7.38 (1H, d, <i>J</i> = 16.0 Hz, OtCin), 7.44 (2H, t, <i>J</i> = 7.7 Hz, OBz), 7.59 (1H, t, <i>J</i> = 7.4 Hz, OBz), 8.06 (2H, d, <i>J</i> = 7.7 Hz, OBz), OBA × 2 [3.84, 3.87 (2H, d_{AB}, <i>J</i> = 11.9 Hz), 3.89, 3.91 (2H, d_{AB}, <i>J</i> = 12.0 Hz)]. * señal solapada.</p> <p>RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 19.7 (c, C-15), 20.7 (c, OAc), 21.4 (c, C-14), 22.6 (t, C-2), 26.4 (c, C-13), 29.9 (c, C-12), 31.6 (t, C-3), 51.2 (s, C-10), 53.6 (d, C-7), 69.0 (d, C-8), 71.6 (d, C-1), 72.6 (d, C-9), 79.5 (d, C-6), 83.9 (s, C-4), 84.9 (s, C-11), 90.4 (s, C-5), 116.9 (d, OtCin), 128.1 (2 × d, OtCin), 128.4 (2 × d, OtCin), 128.8 (2 × d, OBz), 129.2 (s, OBz), 130.3 (2 × d, OBz), 130.5 (d, OtCin), 133.4 (d, OBz), 133.9 (s, OtCin), 145.8 (d, OtCin), 164.9 (s, OtCin), 165.5 (s, OBz), 169.8 (s, OAc), OBA × 2 [25.3 (t), 28.0 (t), 165.5 (s), 166.2 (s)].</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IE) <i>m/z</i> (%): 690 [M - OtCin]⁺ (2), 688 (6), 686 (2), 563 (13), 561 (15), 551 (4), 549 (3), 534 (3), 532 (2), 218 (3), 131 (80), 105 (100), 77 (14), 57 (3).</p> <p>EM (IES) <i>m/z</i> (%): 845 [M + 4 + Na]⁺ (54), 843 [M + 2 + Na]⁺ (100), 841 [M + Na]⁺ (50).</p> <p>EMAR (IES) <i>m/z</i>: Calculado para C₃₇H₄₀⁸¹Br₂O₁₁Na [M + 4 + Na]⁺: 845.0794, observado 845.0810, calculado para C₃₇H₄₀⁷⁹Br⁸¹BrO₁₁Na [M + 2 + Na]⁺: 843.0815, observado 843.0809, calculado para C₃₇H₄₀⁷⁹Br₂O₁₁Na [M + Na]⁺: 841.0835, observado 841.0830.</p>

Preparación de los derivados 43a

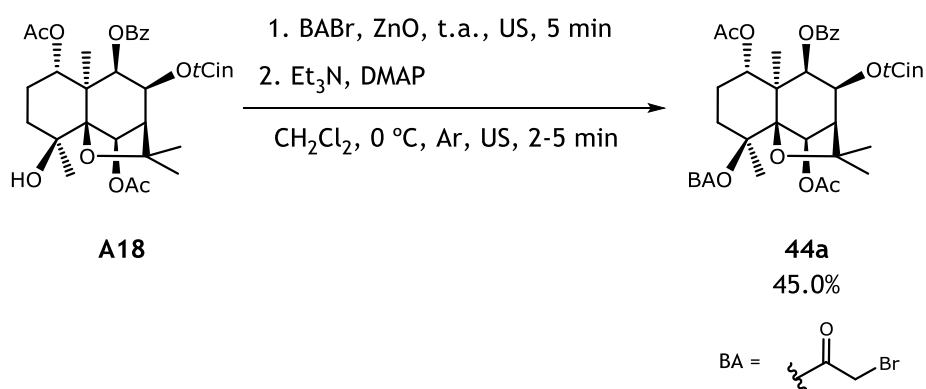


A una disolución de ácido 4-(bromometil)-benzoico (18.9 mg, 0.09 mmol) en 0.3 mL de tolueno seco y a temperatura ambiente, se le añadió cloruro de oxalilo (24 μ L, 0.28 mmol), *N,N*-dimetilformamida seca (DMF, 25 μ L, 0.32 mmol) y, tras agitación durante 4 h, ZnO (13 mg, 0.16 mmol). La disolución se adicionó a una mezcla de **A17** (11.2 mg, 0.019 mmol), DMAP (8.1 mg, 0.07 mmol) y Et₃N (35 μ L, 0.25 mmol), bajo atmósfera de argón y a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se sonicó durante 2–5 min, tras lo cual se diluyó con CH₂Cl₂, se lavó con HCl 1 M (10 mL), disolución saturada de NaHCO₃ (10 mL) y disolución saturada de NaCl (10 mL). La fase orgánica se secó sobre MgSO₄ anhidro, se filtró y se llevó a sequedad en el rotavapor. El residuo fue purificado mediante CCFP eluyendo con hexanos–AcOEt (3:2). Así, se obtuvo 1.8 mg de producto **43a** como un sólido amorfo (12.7% de rendimiento).

Derivado 43a

Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo incoloro (1.8 mg).</p> <p>$[\alpha]_D^{20}$: -42.6° (c 0.18, CHCl₃).</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 1.36 (3H, s, Me-14), 1.50* (1H, H-2α), 1.51 (3H, s, Me-15), 1.57 (3H, s, Me-12), 1.69 (3H, s, OAc), 1.74 (3H, s, Me-13), 1.79* (1H, H-3α), 1.95 (1H, m, H-3β), 2.01 (1H, m, H-2β), 2.73 (1H, d, J = 2.7 Hz, H-7), 3.05 (1H, s, OH-4), 5.41 (1H, dd, J = 3.5, 12.2 Hz, H-1), 5.50 (1H, d, J = 6.2 Hz, H-9), 5.70 (1H, s, H-6), 5.84 (1H, dd, J = 2.7, 6.2 Hz, H-8), 6.22 (1H, d, J = 16.0 Hz, OtCin), 7.25* (2H, OtCin), 7.30 (2H, t, J = 7.2 Hz, OtCin), 7.34 (1H, d, J = 6.6 Hz, OtCin), 7.41 (1H, d, J = 16.0 Hz, OtCin), 7.45 (2H, t, J = 7.7 Hz, OBz), 7.60 (1H, t, J = 6.6 Hz, OBz), 8.07 (2H, d, J = 7.5 Hz, OBz), OCMB [4.62 (2H, s), 7.56 (2H, d, J = 7.5 Hz), 8.22 (2H, d, J = 7.5 Hz)].</p> <p style="text-align: right;">* señal solapada.</p> <p>RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 19.6 (c, C-15), 20.8 (c, OAc), 23.3 (t, C-2), 23.8 (c, C-14), 26.5 (c, C-13), 30.3 (c, C-12), 38.8 (t, C-3), 49.9 (s, C-10), 53.7 (d, C-7), 69.0 (d, C-8), 70.7 (s, C-4), 72.2 (d, C-1), 72.3 (d, C-9), 78.3 (d, C-6), 84.7 (s, C-11), 91.3 (s, C-5), 117.1 (d, OtCin), 128.1 (2 × d, OtCin), 128.4 (2 × d, OtCin), 128.7 (2 × d, OBz), 129.4 (s, OBz), 130.2 (2 × d, OBz), 130.4 (d, OtCin), 133.4 (d, OBz), 134.0 (s, OtCin), 145.7 (d, OtCin), 164.9 (s, OtCin), 165.5 (s, OBz), 169.9 (s, OAc), OCMB [45.3 (t), 128.8 (2 × d), 129.6 (s), 130.7 (2 × d), 142.8 (s), 165.2 (s)].</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IES) m/z (%): 755 [M + 2 + Na]⁺ (47), 753 [M + Na]⁺ (100).</p> <p>EMAR (IES) m/z: Calculado para C₄₁H₄₃O₁₀³⁵ClNa [M + Na]⁺: 753.2442, observado 753.2443 y para C₄₁H₄₃O₁₀³⁷ClNa [M + 2 + Na]⁺: calculado 755.2413, observado 755.2448.</p>

Preparación del derivado 44a

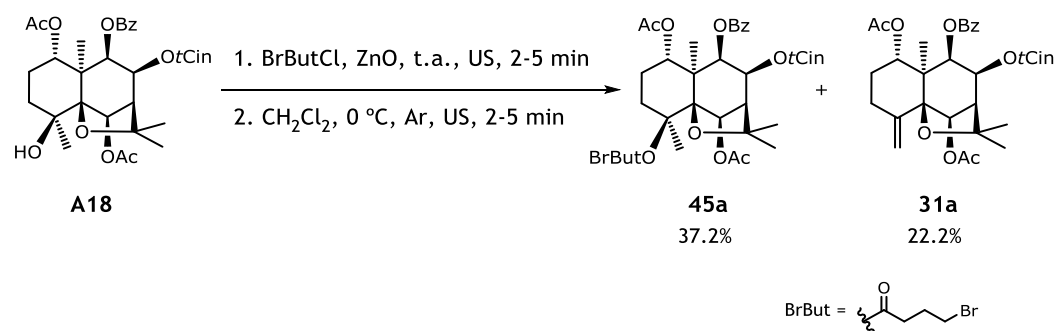


Una mezcla de bromuro de bromoacetilo (137 μ L, 1.57 mmol) y ZnO (14.0 mg, 0.17 mmol), bajo atmósfera de argón y a temperatura ambiente, fue sonicada durante 5 min. La mezcla se enfrió a 0 °C y se añadió a una disolución, previamente preparada, de **A18** (39.2 mg, 0.063 mmol) en 0.25 mL de CH₂Cl₂ seco bajo atmósfera de argón a 0 °C. La mezcla de reacción se sonicó durante 2–5 min, se diluyó con CH₂Cl₂, se lavó con disolución saturada de NaHCO₃ (10 mL) y disolución saturada de NaCl (10 mL). La fase orgánica se secó sobre MgSO₄ anhidro y se llevó a sequedad en el rotavapor. El crudo se fraccionó por cromatografía circular (Chromatotron, placa de 1 mm) usando como fase móvil hexanos–AcOEt (13:7) y el producto impuro se purificó mediante CCFP usando como fase móvil CH₂Cl₂–MeOH (1:1), rindiendo 19.9 mg del producto **44a** como un sólido amorfo (45.0 % de rendimiento).

Derivado 44a

Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo incoloro (19.9 mg).</p> <p>$[\alpha]_D^{28}$: -60.2° (c 0.24, CHCl₃).</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 1.49 (1H, m, H-2α), 1.51 (3H, s, Me-15), 1.57 (3H, s, Me-12), 1.67 (3H, s, OAc-1), 1.70 (3H, s, Me-14), 1.71 (3H, s, Me-13), 2.02 (1H, m, H-2β), 2.12 (1H, dt, J = 3.7, 13.5 Hz, H-3β), 2.17 (3H, s, OAc-6), 2.56 (1H, d, J = 3.3 Hz, H-7), 2.86 (1H, td, J = 3.5, 13.4 Hz, H-3α), 5.45 (1H, d, J = 6.6 Hz, H-9), 5.47 (1H, dd, J = 4.1, 12.0 Hz, H-1), 5.60 (1H, s, H-6), 5.70 (1H, dd, J = 3.3, 6.6 Hz, H-8), 6.21 (1H, d, J = 16.1 Hz, OtCin), 7.23 (2H, d, J = 8.0 Hz, OtCin), 7.30 (2H, t, J = 7.7 Hz, OtCin), 7.34 (1H, t, J = 7.0 Hz, OtCin), 7.38 (1H, d, J = 16.1 Hz, OtCin), 7.43 (2H, t, J = 8.0 Hz, OBz), 7.59 (1H, t_A, J = 7.4 Hz, OBz), 8.03 (2H, dd, J = 1.3, 8.1 Hz, OBz), OBA [3.77, 3.80 (2H, d_{AB}, J = 11.3 Hz)].</p> <p>RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 19.7 (c, C-15), 20.7 (c, OAc-1), 21.1 (c, C-14), 21.7 (c, OAc-6), 22.7 (t, C-2), 26.4 (c, C-13), 29.7 (c, C-12), 31.8 (t, C-3), 51.1 (s, C-10), 53.6 (d, C-7), 69.1 (d, C-8), 71.7 (d, C-1), 72.8 (d, C-9), 77.6 (d, C-6), 84.0 (s, C-4), 84.8 (s, C-11), 90.4 (s, C-5), 117.1 (d, OtCin), 128.1 (2 × d, OtCin), 128.4 (2 × d, OtCin), 128.7 (2 × d, OBz), 129.3 (s, OBz), 130.2 (2 × d, OBz), 130.4 (d, OtCin), 133.4 (d, OBz), 134.0 (s, OtCin), 145.7 (d, OtCin), 164.9 (s, OtCin), 165.5 (s, OBz), 169.8 (2 × s, OAc-1, OAc-6), OBA [27.5 (t), 165.4 (s)].</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IE) m/z (%): 742 [M + 2]⁺ (0.3), 740 [M⁺] (0.4), 728 (2), 727 (6), 726 (2), 725 (6), 700 (4), 698 (4), 560 (16), 500 (18), 483 (29), 454 (7), 247 (4), 202 (4), 131 (80), 105 (100), 83 (7), 77 (15).</p> <p>EMAR (IE) m/z: Calculado para C₃₇H₄₁⁸¹BrO₁₁ [M + 2]⁺ 742.1812, observado 742.1810 y para C₃₇H₄₁⁷⁹BrO₁₁ [M⁺]: calculado 740.1832, observado 740.1826.</p>

Preparación del derivado 45a

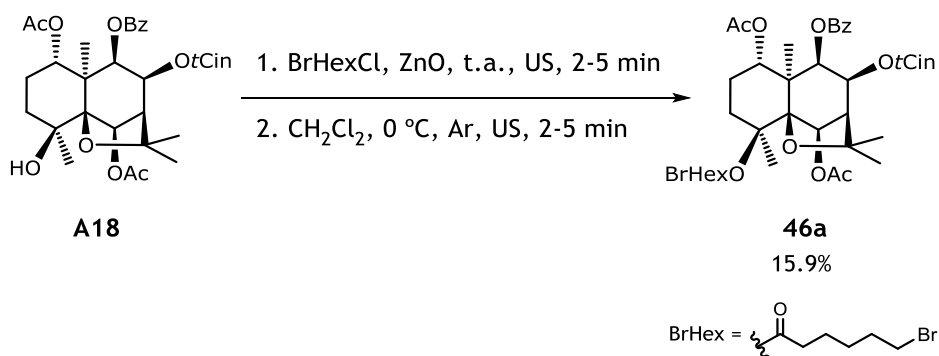


Una mezcla de cloruro de 4-bromobutirilo (50 μ L, 0.431 mmol) y ZnO (10.1 mg, 0.124 mmol) se sonicó durante 2–5 min, bajo atmósfera de argón a temperatura ambiente, y se adicionó a una disolución de **A18** (6.5 mg, 0.011 mmol) en 0.1 mL de CH₂Cl₂, bajo atmósfera de argón y a 0 °C. La mezcla se dejó durante 2–5 min con ultrasonido (US), se diluyó con CH₂Cl₂, se lavó con disolución saturada de NaHCO₃ (10 mL) y disolución saturada de NaCl (2 \times 10 mL). La fase orgánica se secó sobre MgSO₄ anhidro, se filtró y se llevó a sequedad en el rotavapor. El residuo se fraccionó por CC de exclusión molecular Sephadex LH-20, usando como fase móvil una mezcla de CHCl₃–MeOH (1:1) y, posteriormente, se purificó mediante CCFP usando como eluyente hexanos–AcOEt (7:3). Así se obtuvieron 3.0 mg del producto **45a** (37.2% de rendimiento) y 1.4 mg de **31a** (22.2% de rendimiento) como sólidos amorfos.

Derivado 45a

Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo incoloro (3.0 mg).</p> <p>$[\alpha]_D^{20}$: -60.1° (c 0.30, CHCl₃).</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 1.49 (3H, m, H-2α), 1.50 (3H, s, Me-15), 1.59 (3H, s, Me-12), 1.66 (3H, s, OAc-1), 1.67 (3H, s, Me-14), 1.71 (3H, s, Me-13), 2.00 (1H, m, H-2β), 2.09 (1H, dt, J = 3.9, 13.2, H-3β), 2.13 (3H, s, OAc-6), 2.55 (1H, d, J = 3.0, H-7), 2.85 (1H, td, J = 3.4, 13.6 Hz, H-3α), 5.45 (1H, d, J = 6.4 Hz, H-9), 5.48 (1H, dd, J = 4.2, 12.0 Hz, H-1), 5.59 (1H, s, H-6), 5.69 (1H, dd, J = 3.0, 6.4 Hz, H-8), 6.21 (1H, d, J = 16.0 Hz, OtCin), 7.24 (2H, d, J = 7.8 Hz, OtCin), 7.30 (2H, t, J = 7.5 Hz, OtCin), 7.34 (1H, d, J = 7.2 Hz, OtCin), 7.38 (1H, d, J = 16.0 Hz, OtCin), 7.43 (2H, t, J = 7.8 Hz, OBz), 7.59 (1H, t, J = 7.3 Hz, OBz), 8.07 (2H, d, J = 7.6 Hz, OBz), OButBr [2.17 (2H, m), 2.51 (2H, m), 3.51 (2H, m)].</p> <p>RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 19.7 (c, C-15), 20.7 (c, OAc-1), 21.4 (c, C-14), 21.5 (c, OAc-6), 22.7 (t, C-2), 26.5 (c, C-13), 29.9 (c, C-12), 31.9 (t, C-3), 51.0 (s, C-10), 53.7 (d, C-7), 69.2 (d, C-8), 71.9 (d, C-1), 72.9 (d, C-9), 77.6 (d, C-6), 82.2 (s, C-4), 84.7 (s, C-11), 90.6 (s, C-5), 117.1 (d, OtCin), 128.1 (2 × d, OtCin), 128.4 (2 × d, OtCin), 128.7 (2 × d, OBz), 129.3 (s, OBz), 130.3 (2 × d, OBz), 130.4 (d, OtCin), 133.4 (d, OBz), 134.0 (s, OtCin), 145.6 (d, OtCin), 164.9 (s, OtCin), 165.5 (s, OBz), 169.6 (s, OAc-6), 169.8 (s, OAc-1), OButBr [27.5 (t), 33.1 (t), 33.5 (t), 171.1 (s)].</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IES) m/z (%): 793 [M + 2 + Na]⁺ (100), 791 [M + Na]⁺ (100).</p> <p>EMAR (IES) m/z: Calculado para C₃₉H₄₅⁸¹BrO₁₁Na [M + 2 + Na]⁺: 793.2022, observado 793.2028 y para C₃₉H₄₅⁷⁹BrO₁₁Na [M + Na]⁺: calculado 791.2043, observado 791.2053.</p>

Preparación del derivado 46a

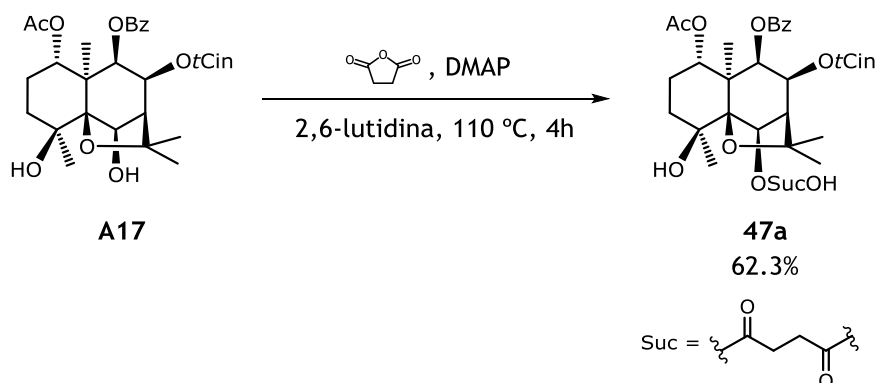


Una mezcla de cloruro de 6-bromohexanoílo (60 μ L, 0.392 mmol) y ZnO (16.8 mg, 0.206 mmol) se sonicó durante 2–5 min, tras lo cual se añadió a una disolución previamente preparada de **A18** (6.9 mg, 0.011 mmol) en 0.2 mL de CH₂Cl₂ seco. La mezcla de reacción se sonicó (ultrasonido, US) durante 2–5 min, se diluyó con CH₂Cl₂, se filtró, se lavó con disolución saturada de NaHCO₃ (10 mL) y disolución saturada de NaCl (10 mL). La fase orgánica se secó sobre MgSO₄ anhidro, se filtró y se llevó a sequedad en el rotavapor. El crudo se purificó mediante CCFP usando como fases móviles hexanos–AcOEt (4:1 y 3:2) y hexanos–CH₂Cl₂ (3:7), obteniendo 1.4 mg del producto **46a** como un sólido amorfo (15.9% de rendimiento).

Derivado 46a

Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo incoloro (1.4 mg).</p> <p>$[\alpha]_D^{20}$: -39.1° (c 0.15, CHCl₃).</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 1.49 (1H, s, H-2α), 1.50 (3H, s, Me-15), 1.58 (3H, s, Me-12), 1.67 (6H, s, Ac, Me-14), 1.70 (3H, s, Me-13), 2.00 (1H, m, H-2β), 2.09 (1H, m, H-3β), 2.10 (3H, s, OAc-6), 2.54 (1H, d, J = 3.0 Hz, H-7), 2.87 (1H, td, J = 3.5, 13.4 Hz, H-3α), 5.45 (1H, d, J = 6.5 Hz, H-9), 5.47 (1H, dd, J = 4.2, 12.1 Hz, H-1), 5.59 (1H, s, H-6), 5.69 (1H, dd, J = 3.0, 6.5 Hz, H-8), 6.21 (1H, d, J = 16.0 Hz, OtCin), 7.23 (2H, d, J = 7.6 Hz, OtCin), 7.30 (2H, t, J = 7.4 Hz, OtCin), 7.34 (1H, d, J = 7.2 Hz, OtCin), 7.38 (1H, d, J = 16.0 Hz, OtCin), 7.43 (2H, t, J = 7.6 Hz, OBz), 7.59 (1H, t, J = 7.4 Hz, OBz), 8.07 (2H, d, J = 7.8 Hz, OBz), OHexBr [1.65* (2H), 1.90 (2H, m), 2.25 (2H, m), 2.37 (2H, m), 3.44 (2H, t, J = 6.7 Hz)].</p> <p style="text-align: right;">* señal solapada.</p> <p>RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 19.7 (c, C-15), 20.7 (c, OAc-1), 21.4 (c, OAc-6), 21.5 (c, C-14), 22.7 (t, C-2), 26.5 (c, C-13), 29.9 (c, C-12), 31.9 (t, C-3), 51.0 (s, C-10), 53.7 (d, C-7), 69.2 (d, C-8), 71.9 (d, C-1), 72.9 (d, C-9), 77.6 (d, C-6), 81.8 (d, C-4), 84.6 (s, C-11), 90.6 (s, C-5), 117.1 (d, OtCin), 128.1 (2 × d, OtCin), 128.4 (2 × d, OtCin), 128.7 (2 × d, OBz), 129.3 (s, OBz), 130.3 (2 × d, OBz), 130.4 (d, OtCin), 133.3 (d, OBz), 134.0 (s, OtCin), 145.6 (d, OtCin), 164.9 (s, OtCin), 165.5 (s, OBz), 169.6 (s, OAc-6), 169.8 (s, OAc-1), OHexBr [24.1 (t), 27.7 (t), 32.4 (t), 33.6 (t), 35.5 (t), 172.0 (s)].</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IES) m/z (%): 821 [M + 2 + Na]⁺ (100), 819 [M + Na]⁺ (66).</p> <p>EMAR (IES) m/z: Calculado para C₄₁H₄₉⁸¹BrO₁₁Na [M + 2 + Na]⁺: 821.2335, observado 821.2365 y para C₄₁H₄₉⁷⁹BrO₁₁Na [M + Na]⁺: calculado 819.2356, observado 819.2339.</p>

Preparación del derivado 47a

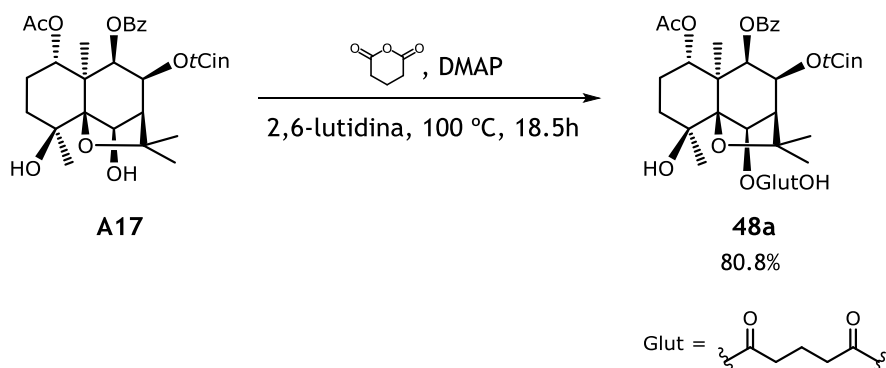


A una disolución de **A17** (41.0 mg, 0.071 mmol) en 1.5 mL de 2,6-lutidina, se le añadió, a temperatura ambiente, anhídrido succínico (107.0 mg, 1.070 mmol) y DMAP (35.8 mg, 0.293 mmol). La mezcla de reacción se calentó a 110 °C con agitación durante 4 h, periodo tras el cual se eliminó el disolvente en el rotavapor. El crudo se disolvió en 10 mL de CH₂Cl₂, se añadió 10 mL de agua. La fase orgánica se secó sobre MgSO₄ anhidro, se filtró y se llevó a sequedad en el rotavapor. El crudo se fraccionó por cromatografía circular (Chromatotron, placa de 1 mm) con usando como fase móvil una mezcla de hexanos-AcOEt-HOAc (40:60:1), rindiendo 30.0 mg de producto **47a** como un sólido amorfo (62.3% de rendimiento).

Derivado 47a

Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo incoloro (30.0 mg).</p> <p>$[\alpha]_D^{28}$: -73.2° (c 0.41, CHCl₃).</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ: 1.34 (3H, s, Me-14), 1.46 (3H, s, Me-15), 1.47* (1H, H-2α), 1.55 (3H, s, Me-12), 1.67 (3H, s, OAc), 1.69* (1H, H-3α), 1.71 (3H, s, Me-13), 1.92 (2H, m, H-2β, H-3β), 2.55 (1H, d_A, J = 3.0 Hz, H-7), 5.35 (1H, dd, J = 3.9, 12.1 Hz, H-1), 5.44 (1H, d, J = 6.3 Hz, H-9), 5.60 (1H, s, H-6), 5.71 (1H, dd, J = 3.0, 6.3 Hz, H-8), 6.21 (1H, d, J = 16.1 Hz, OtCin), 7.24 (2H, dd, J = 1.7, 7.8 Hz, OtCin), 7.30 (2H, t, J = 7.6 Hz, OtCin), 7.32 (1H, t, J = 7.0 Hz, OtCin), 7.38 (1H, d, J = 16.1 Hz, OtCin), 7.44 (2H, t, J = 7.7 Hz, OBz), 7.59 (1H, tt, J = 1.2, 7.4 Hz, OBz), 8.05 (2H, dd, J = 1.3, 8.6 Hz, OBz), OSucOH [2.71 (4H, m)]. * señal solapada.</p> <p>RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ: 19.6 (c, C-15), 20.7 (c, OAc), 23.2 (t, C-2), 23.8 (c, C-14), 26.5 (c, C-13), 30.3 (c, C-12), 38.4 (t, C-3), 49.9 (s, C-10), 53.7 (d, C-7), 69.0 (d, C-8), 70.7 (s, C-4), 72.2 (2 × d, C-1, C-9), 77.8 (d, C-6), 84.7 (s, C-11), 91.3 (s, C-5), 117.1 (d, OtCin), 128.1 (2 × d, OtCin), 128.4 (2 × d, OtCin), 128.7 (2 × d, OBz), 129.3 (s, OBz), 130.2 (2 × d, OBz), 130.4 (d, OtCin), 133.4 (d, OBz), 134.0 (s, OtCin), 145.7 (d, OtCin), 164.9 (s, OtCin), 165.5 (s, OBz), 169.9 (s, OAc), OSucOH [29.7 (2 × t), 171.3 (s), 171.4 (s)].</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IE) m/z (%): 663 [M - CH₃]⁺ (2), 565 (7), 545 (19), 441 (8), 248 (4), 202 (14), 131 (100), 119 (5), 109 (5), 105 (90), 83 (9), 57 (5).</p> <p>EMAR (IE) m/z: Calculado para C₃₆H₃₉O₁₂ [M - CH₃]⁺: 663.2442, observado 663.2456.</p>

Preparación del derivado **48a**

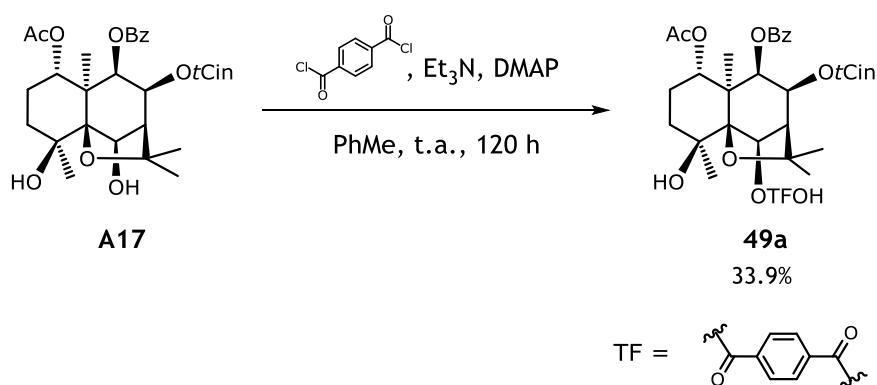


A una disolución de **A17** (51.1 mg, 0.088 mmol) y DMAP (10.2 mg, 0.084 mmol) en 1.5 mL de 2,6-lutidina, se le añadió, a temperatura ambiente, una disolución de anhídrido glutárico (115.3 mg, 1.011 mmol) en 1 mL de 2,6-lutidina. La mezcla de reacción se calentó a 100 °C y agitación durante 18 h 30 min, periodo tras el cuál se enfrió a temperatura ambiente y se añadió 1 mL de agua para finalizar la reacción. La mezcla se concentró a presión reducida en el rotavapor. El crudo se fraccionó mediante CC de exclusión molecular de Sephadex LH-20, usando como fase móvil una mezcla de CHCl_3 -MeOH (1:1), y, posteriormente, por cromatografía circular (Chromatotron, placa de 1 mm). El producto impuro se purificó mediante CCFP usando como fase móvil hexanos-AcOEt-HOAc (50:50:1), rindiendo el derivado **48a** como un sólido amorfo (49.4 mg, 80.8% de rendimiento).

Derivado 48a

Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo incoloro (49.4 mg).</p> <p>$[\alpha]_D^{28}$: -80.6° (c 1.06, CHCl₃).</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 1.34 (3H, s, Me-14), 1.47 (3H, s, Me-15), 1.48* (1H, H-2α), 1.56 (3H, s, Me-12), 1.67 (3H, s, OAc), 1.69* (1H, H-3α), 1.71 (3H, s, Me-13), 1.92 (2H, m, H-2β, H-3β), 2.54 (1H, d_A, J = 3.0 Hz, H-7), 5.36 (1H, dd, J = 3.5, 12.2 Hz, H-1), 5.45 (1H, d, J = 6.3 Hz, H-9), 5.62 (1H, s, H-6), 5.71 (1H, dd, J = 3.0, 6.3 Hz, H-8), 6.20 (1H, d, J = 16.0 Hz, OtCin), 7.24 (2H, dd, J = 1.8, 8.4 Hz, OtCin), 7.30 (2H, t, J = 7.7 Hz, OtCin), 7.32 (1H, t, J = 6.8 Hz, OtCin), 7.38 (1H, d, J = 16.0 Hz, OtCin), 7.44 (2H, t, J = 8.0 Hz, OBz), 7.59 (1H, tt, J = 1.6, 7.4 Hz, OBz), 8.05 (2H, dd, J = 1.4, 8.6 Hz, OBz), OGlutOH [2.01 (2H, t, J = 7.2 Hz), 2.47 (4H, m)]. * señal solapada.</p> <p>RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 19.6 (c, C-15), 20.7 (c, OAc), 23.3 (t, C-2), 23.9 (c, C-14), 26.5 (c, C-13), 30.3 (c, C-12), 38.4 (t, C-3), 50.0 (s, C-10), 53.9 (d, C-7), 69.1 (d, C-8), 70.7 (s, C-4), 72.2 (2 × d, C-1, C-9), 77.5 (d, C-6), 84.7 (s, C-11), 91.4 (s, C-5), 117.1 (d, OtCin), 128.1 (2 × d, OtCin), 128.4 (2 × d, OtCin), 128.7 (2 × d, OBz), 129.4 (s, OBz), 130.2 (2 × d, OBz), 130.4 (d, OtCin), 133.3 (d, OBz), 134.0 (s, OtCin), 145.7 (d, OtCin), 164.9 (s, OtCin), 165.5 (s, OBz), 169.9 (s, OAc), OGlutOH [19.6 (t), 32.9 (t), 33.8 (t), 171.9 (s), 176.8 (s)].</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IE) m/z (%): 677 [M - CH₃]⁺ (3), 560 (7), 555 (14), 545 (5), 500 (5), 430 (6), 248 (6), 202 (18), 132 (10), 131 (100), 105 (93), 103 (13), 87 (4), 83 (7), 77 (12).</p> <p>EMAR (IE) m/z: Calculado para C₃₇H₄₁O₁₂ [M - CH₃]⁺: 677.2598, observado 677.2571.</p>

Preparación del derivado 49a

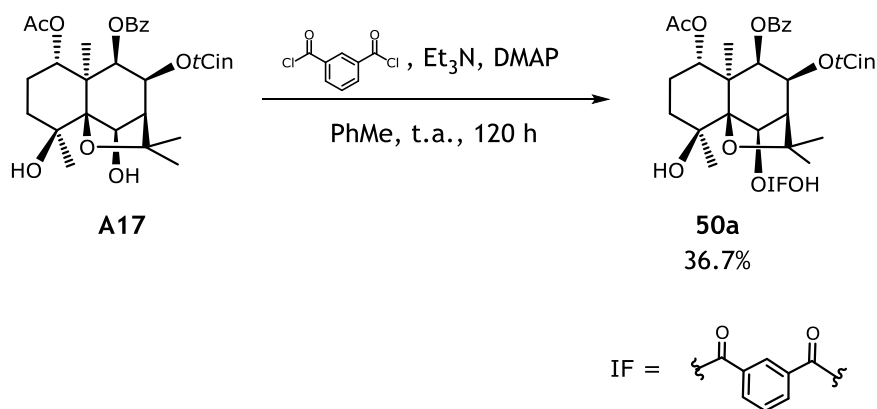


A una disolución de **A17** (18.3 mg, 0.032 mmol) en 0.1 mL de tolueno seco, a temperatura ambiente y bajo atmósfera de argón, se le añadió DMAP (8.0 mg, 0.066 mmol), cloruro de tereftaloilo (28.6 mg, 0.141 mmol) y Et_3N (25 μL , 0.179 mmol). La mezcla de reacción se dejó con agitación durante 120 h, periodo tras el cual se diluyó con CH_2Cl_2 y se lavó con HCl 1 M (10 mL), disolución saturada de NaHCO_3 (10 mL) y disolución saturada de NaCl (10 mL). La fase orgánica se secó sobre MgSO_4 anhidro, se filtró y se llevó a sequedad en el rotavapor. Tras purificación mediante CCFP con hexanos–AcOEt–HOAc (40:60:1), se obtuvieron 7.5 mg del producto **49a** como un sólido amorfo (33.9% de rendimiento).

Derivado 49a

Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo incoloro (7.5 mg).</p> <p>$[\alpha]_D^{20}$: -38.2° (c 0.64, CHCl₃).</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) δ: 1.39 (3H, s, Me-14), 1.52* (1H, H-2α), 1.53 (3H, s, Me-15), 1.60 (3H, s, Me-12), 1.70 (3H, s, OAc), 1.76 (3H, s, Me-13), 1.77 (1H, td, J = 3.1, 13.5 Hz, H-3α), 1.95 (1H, m, H-2β), 2.00 (1H, dt, J = 3.7, 13.9 Hz, H-3β), 2.75 (1H, d, J = 3.0 Hz, H-7), 5.42 (1H, dd, J = 4.1, 12.1 Hz, H-1), 5.52 (1H, d, J = 6.4 Hz, H-9), 5.76 (1H, s, H-6), 5.85 (1H, dd, J = 3.0, 6.4 Hz, H-8), 6.22 (1H, d, J = 16.0 Hz, OtCin), 7.26* (2H, OtCin), 7.30 (2H, t, J = 7.4 Hz, OtCin), 7.33 (1H, t, J = 7.1 Hz, OtCin), 7.41 (1H, d, J = 16.0 Hz, OtCin), 7.46 (2H, t, J = 7.8 Hz, OBz), 7.60 (1H, t, J = 7.3 Hz, OBz), 8.08 (2H, d, J = 7.9 Hz, OBz), OTFAOH [8.19 (2H, d, J = 8.2 Hz), 8.31 (2H, d, J = 8.2 Hz)].</p> <p style="text-align: right;">* señal solapada.</p> <p>RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ: 19.7 (c, C-15), 20.8 (c, OAc), 23.3 (t, C-2), 23.8 (c, C-14), 26.5 (c, C-13), 30.4 (c, C-12), 38.8 (t, C-3), 50.0 (s, C-10), 53.8 (d, C-7), 69.1 (d, C-8), 71.0 (s, C-4), 72.2 (2 × d, C-1, C-9), 78.6 (d, C-6), 84.8 (s, C-11), 91.4 (s, C-5), 117.1 (d, OtCin), 128.1 (2 × d, OtCin), 128.4 (2 × d, OtCin), 128.8 (2 × d, OBz), 129.4 (s, OBz), 130.4 (3 × d, Bz, OtCin), 133.4 (d, OBz), 134.0 (s, OtCin), 145.7 (d, OtCin), 164.9 (s, OtCin), 165.5 (s, OBz), 169.9 (s, OAc), OTFAOH [130.3 (4 × d), 130.5 (s), 133.9 (s), 163.5 (s), 169.3 (s)].</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IES) m/z (%): 749 [M + Na]⁺ (100).</p> <p>EMAR (IES) m/z: Calculado para C₄₁H₄₂O₁₂Na [M + Na]⁺: 749.2574, observado 749.2593.</p>

Preparación del derivado 50a

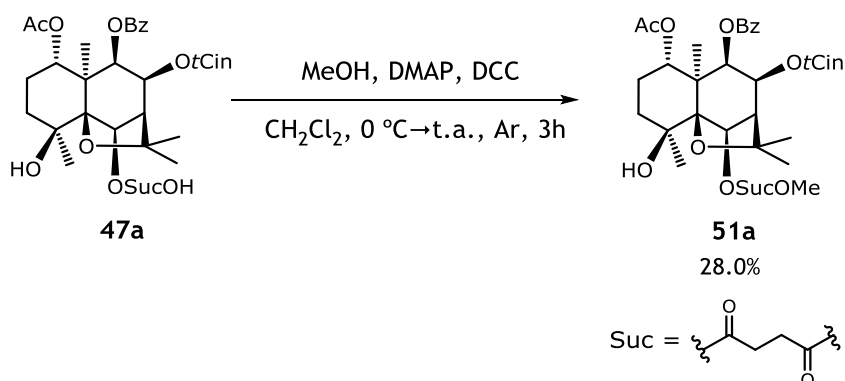


A una disolución de **A17** (20.2 mg, x mmol) en 0.1 mL de tolueno seco, a temperatura ambiente y bajo atmósfera de argón, se le añadió DMAP (8.0 mg, 0.066 mmol), cloruro de isoftaloilo (26.3 mg, 0.130 mmol) y Et₃N (25 μL, 0.179 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 120 h y se siguió mediante CCF. Trascurrido ese tiempo, la reacción se diluyó con CH₂Cl₂, se lavó con HCl 1 M (10 mL), disolución saturada de NaHCO₃ (10 mL) y disolución saturada de NaCl (10 mL). La fase orgánica se secó sobre MgSO₄ anhidro, se filtró y se llevó a sequedad en el rotavapor. Tras purificación del crudo mediante CCFP con hexanos–AcOEt–HOAc (40:60:1), se obtuvieron 9.3 mg de producto **50a** como un sólido amorfo (36.7% de rendimiento).

Derivado 50a

Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo incoloro (9.3 mg).</p> <p>$[\alpha]_D^{20}$: -57.3° (c 0.95, CHCl₃).</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) δ: 1.40 (3H, s, Me-14), 1.51 (1H, m, H-2α), 1.54 (3H, s, Me-15), 1.61 (3H, s, Me-12), 1.70 (3H, s, OAc), 1.76 (3H, s, Me-13), 1.80 (1H, td, <i>J</i> = 3.2, 13.3 Hz, H-3α), 1.95 (1H, m, H-2β), 2.01 (1H, m, H-3β), 2.76 (1H, d, <i>J</i> = 3.2 Hz, H-7), 5.43 (1H, dd, <i>J</i> = 4.2, 11.8 Hz, H-1), 5.52 (1H, d, <i>J</i> = 6.3 Hz, H-9), 5.77 (1H, s, H-6), 5.86 (1H, dd, <i>J</i> = 3.2, 6.3 Hz, H-8), 6.23 (1H, d, <i>J</i> = 16.1 Hz, <i>OtCin</i>), 7.26 (2H, dd, <i>J</i> = 1.7, 7.0 Hz, <i>OtCin</i>), 7.30 (1H, t, <i>J</i> = 7.5 Hz, <i>OtCin</i>), 7.31 (1H, d, <i>J</i> = 6.6 Hz, <i>OtCin</i>), 7.34 (1H, d, <i>J</i> = 6.7 Hz, <i>OtCin</i>), 7.41 (1H, d, <i>J</i> = 16.1 Hz, <i>OtCin</i>), 7.46 (2H, t, <i>J</i> = 7.8 Hz, OBz), 7.60 (2H, m, OBz), 8.08 (2H, dd, <i>J</i> = 1.2, 8.4 Hz, OBz), OIFA OH [8.31 (1H, td, <i>J</i> = 1.2, 7.7 Hz), 8.48 (1H, td, <i>J</i> = 1.5, 7.8 Hz), 8.92 (1H, s)].</p> <p>RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ: 19.7 (c, C-15), 20.8 (c, OAc), 23.3 (t, C-2), 23.8 (c, C-14), 26.6 (c, C-13), 30.4 (c, C-12), 38.7 (t, C-3), 50.0 (s, C-10), 53.8 (d, C-7), 69.1 (d, C-8), 70.9 (s, C-4), 72.3 (2 × d, C-1, C-9), 78.6 (d, C-6), 84.8 (s, C-11), 91.4 (s, C-5), 117.1 (d, <i>OtCin</i>), 128.1 (2 × d, <i>OtCin</i>), 128.4 (2 × d, <i>OtCin</i>), 128.7 (2 × d, OBz), 129.4 (s, OBz), 130.3 (2 × d, OBz), 130.4 (d, <i>OtCin</i>), 133.4 (d, OBz), 134.0 (s, <i>OtCin</i>), 145.7 (d, <i>OtCin</i>), 164.9 (s, <i>OtCin</i>), 165.5 (s, OBz), 169.9 (s, OAc), OIFA OH [129.1 (d), 129.9 (s), 130.2 (s), 131.9 (d), 134.8 (d), 135.0 (d), 163.6 (s), 169.5 (s)].</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IES) <i>m/z</i> (%): 749 [M + Na]⁺ (100).</p> <p>EMAR (IES) <i>m/z</i>: Calculado para C₄₁H₄₂O₁₂Na [M + Na]⁺: 749.2574, observado 749.2564.</p>

Preparación del derivado 51a

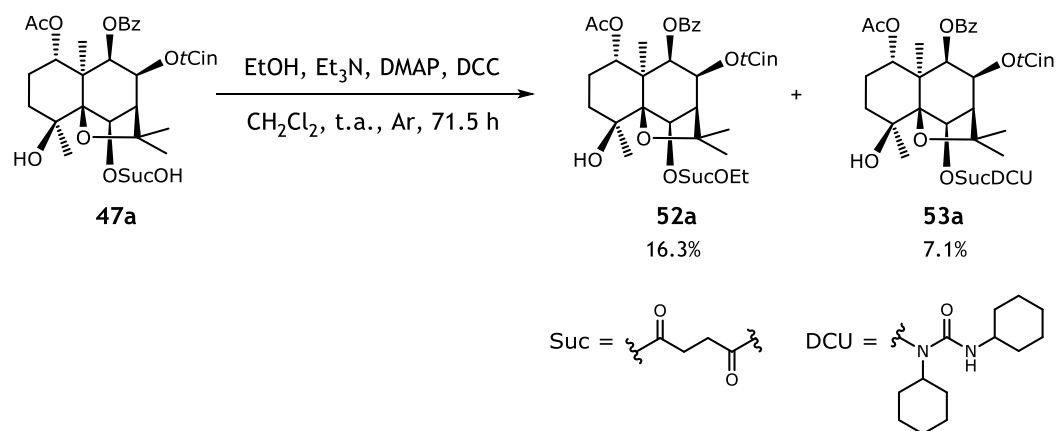


A una disolución de **47a** (4.2 mg, 0.062 mmol) en 0.1 mL de CH₂Cl₂ seco, bajo atmósfera de argón y a 0 °C, se le adicionó DMAP (10.2 mg, 0.084 mmol), MeOH (10 µL, 0.246 mmol) y DCC (30.3 mg, 0.160 mmol). La mezcla se dejó agitar durante 3 h a temperatura ambiente, tras lo cual se diluyó con CH₂Cl₂. La fase orgánica se lavó con HCl (1 M, 10 mL) y disolución saturada de NaHCO₃ (10 mL), se secó sobre MgSO₄ anhidro, se filtró y se llevó a sequedad en el rotavapor. El crudo se purificó mediante varias CCFP usando como fases móviles hexanos–AcOEt (3:2), hexanos–CH₂Cl₂ (1:4) y hexanos–1,4-dioxano (7:3). Así se obtuvo el producto **51a** como un sólido amorfo (1.2 mg, 28.0 % de rendimiento).

Derivado 51a

Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo incoloro (1.2 mg).</p> <p>$[\alpha]_D^{20}$: -51.2° (c 0.09, CHCl₃).</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 1.33 (3H, s, Me-14), 1.45* (1H, H-2α), 1.46 (3H, s, Me-15), 1.57* (3H, Me-12), 1.67 (3H, s, OAc), 1.70* (1H, H-3α), 1.71 (3H, s, Me-13), 1.91 (2H, m, H-2β, H-3β), 2.55 (1H, d, J = 2.8 Hz, H-7), 2.83 (1H, s, OH-4), 5.36 (1H, dd, J = 3.9, 11.8 Hz, H-1), 5.44 (1H, d, J = 6.5 Hz, H-9), 5.59 (1H, s, H-6), 5.71 (1H, dd, J = 2.8, 6.5 Hz, H-8), 6.20 (1H, d, J = 16.0 Hz, OtCin), 7.25* (2H, OtCin), 7.30 (2H, t, J = 7.2 Hz, OtCin), 7.34 (1H, t, J = 7.2 Hz, OtCin), 7.39 (1H, d, J = 16.0 Hz, OtCin), 7.44 (2H, t, J = 7.7 Hz, OBz), 7.59 (1H, t, J = 6.9 Hz, OBz), 8.05 (2H, d, J = 7.7 Hz, OBz), OSucOMe [2.70 (4H, m), 3.70 (3H, s)].</p> <p style="text-align: right;">* señal solapada.</p> <p>RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 19.6 (c, C-15), 20.8 (c, OAc), 23.3 (t, C-2), 23.9 (c, C-14), 26.5 (c, C-13), 30.3 (c, C-12), 38.5 (t, C-3), 49.9 (s, C-10), 53.8 (d, C-7), 69.0 (d, C-8), 70.5 (s, C-4), 72.2 (d, C-1), 72.3 (d, C-9), 77.8 (d, C-6), 84.7 (s, C-11), 91.4 (s, C-5), 117.1 (d, OtCin), 128.1 (2 × d, OtCin), 128.4 (2 × d, OtCin), 128.7 (2 × d, OBz), 129.4 (s, OBz), 130.2 (2 × d, OBz), 130.4 (d, OtCin), 133.3 (d, OBz), 134.0 (s, OtCin), 145.6 (d, OtCin), 164.9 (s, OtCin), 165.5 (s, OBz), 169.9 (s, OAc), OSucOMe [28.6 (t), 29.7 (t), 51.9 (c), 171.3 (s), 172.5 (s)].</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IES) m/z (%): 715 [M + Na]⁺ (100).</p> <p>EMAR (IES) m/z: Calculado para C₃₈H₄₄O₁₂Na [M + Na]⁺: 715.2730, observado 715.2738.</p>

Preparación de los derivados 52a y 53a



A una disolución de **47a** (5.3 mg, 0.008 mmol) en 0.1 mL de CH₂Cl₂ seco, bajo atmósfera de argón y a temperatura ambiente, se le añadió Et₃N (10 µL, 0.072 mmol), DMAP (10.0 mg, 0.082 mmol), DCC (1.8 mg, 0.009 mmol) y EtOH (4 µL, 0.069 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 71 h 30 min. Tras observar la desaparición del producto de partida mediante CCF, se diluyó con CH₂Cl₂ y se añadió 0.1 mL de EtOH dejando bajo agitación durante 30 min. La mezcla se lavó con HCl 1 M (10 mL), disolución saturada de NaHCO₃ (10 mL) y disolución saturada de NaCl (10 mL). La fase orgánica se secó sobre MgSO₄ anhidro, se filtró y se llevó a sequedad a presión reducida. El residuo fue purificado mediante CCFP usando como fase móvil hexanos–AcOEt (3:2 y 2:3). Se obtuvieron 0.9 mg del producto **52a** (16.3% de rendimiento) y 0.5 mg de **53a** (7.1% de rendimiento) como sólidos amorfos.

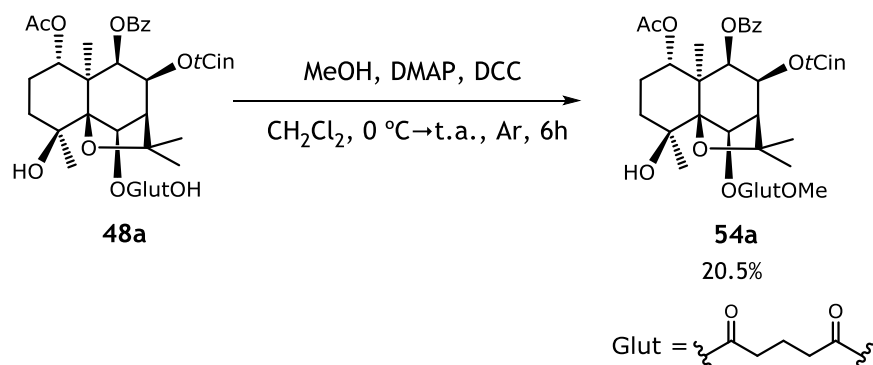
Derivado 52a

Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo incoloro (0.9 mg).</p> <p>$[\alpha]_D^{20}$: -112.5° (c 0.05, CHCl₃).</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 1.33 (3H, s, Me-14), 1.46 (3H, s, Me-15), 1.47* (1H, H-2α), 1.56* (3H, Me-12), 1.67 (3H, s, OAc), 1.70* (1H, H-3α), 1.71 (3H, s, Me-13), 1.90 (1H, m, H-2β), 1.92 (1H, m, H-3β), 2.55 (1H, d, J = 3.3 Hz, H-7), 2.84 (1H, s, OH-4), 5.36 (1H, dd, J = 3.9, 11.7 Hz, H-1), 5.44 (1H, d, J = 6.3 Hz, H-9), 5.59 (1H, s, H-6), 5.71 (1H, dd, J = 3.3, 6.8 Hz, H-8), 6.20 (1H, d, J = 16.1 Hz, OtCin), 7.25 (2H, d, J = 8.2 Hz, OtCin), 7.30 (2H, t, J = 7.7 Hz, OtCin), 7.34 (1H, tt, J = 1.5, 7.5 Hz, OtCin), 7.38 (1H, d, J = 16.1 Hz, OtCin), 7.44 (2H, t, J = 7.8 Hz, OBz), 7.59 (1H, tt, J = 1.6, 7.1 Hz, OBz), 8.05 (2H, dd, J = 1.3, 8.4 Hz, OBz), OSucOEt [1.26 (3H, t, J = 7.1 Hz), 2.69 (4H, m), 4.14 (2H, c, J = 7.1 Hz)]. * señal solapada.</p> <p>RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 19.6 (c, C-15), 20.8 (c, OAc), 23.3 (t, C-2), 23.9 (c, C-14), 26.5 (c, C-13), 29.7 (c, C-12), 38.5 (t, C-3), 49.9 (s, C-10), 53.8 (d, C-7), 69.0 (d, C-8), 70.4 (s, C-4), 72.2 (d, C-1), 72.3 (d, C-9), 77.7 (d, C-6), 84.6 (s, C-11), 91.4 (s, C-5), 117.1 (d, OtCin), 128.1 (2 × d, OtCin), 128.4 (2 × d, OtCin), 128.7 (2 × d, OBz), 129.4 (s, OBz), 130.2 (2 × d, OBz), 130.4 (d, OtCin), 133.3 (d, OBz), 134.0 (s, OtCin), 145.6 (d, OtCin), 164.9 (s, OtCin), 165.5 (s, OBz), 169.9 (s, OAc), OSucOEt [14.2 (c), 28.8 (t), 30.3 (t), 60.8 (t), 171.4 (s), 172.1 (s)].</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IES) m/z (%): 729 [M + Na]⁺ (100).</p> <p>EMAR (IES) m/z: Calculado para C₃₉H₄₆O₁₂Na [M + Na]⁺: 729.2887, observado 729.2866.</p>

Derivado 53a

Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo incoloro (0.5 mg).</p> <p>$[\alpha]_D^{20}$: -641.3° (c 0.04, CHCl₃).</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 1.31 (3H, s, Me-14), 1.45 (3H, s, Me-15), 1.48* (1H, H-2α), 1.53 (3H, s, Me-12), 1.67 (3H, s, OAc), 1.69* (1H, H-3α), 1.72 (3H, s, Me-13), 1.91* (1H, H-2β), 1.92* (1H, H-3β), 2.55 (1H, d, J = 2.9 Hz, H-7), 2.96 (1H, s, OH-4), 5.36 (1H, dd, J = 3.5, 11.8 Hz, H-1), 5.45 (1H, d, J = 6.3 Hz, H-9), 5.53 (1H, s, H-6), 5.73 (1H, dd, J = 2.9, 6.3 Hz, H-8), 6.19 (1H, d, J = 16.1 Hz, OtCin), 7.25* (2H, OtCin), 7.30 (2H, t, J = 6.9 Hz, OtCin), 7.34 (1H, tt, J = 1.3, 6.7 Hz, OtCin), 7.39 (1H, d, J = 16.1 Hz, OtCin), 7.43 (2H, t, J = 7.9 Hz, OBz), 7.58 (1H, t, J = 7.4 Hz, OBz), 8.04 (2H, d, J = 7.8 Hz, OBz), OSucDCU [1.11-1.49 (8H), 1.57-2.10 (12H), 2.64 (2H, m), 2.80 (1H, m), 2.95 (1H, m), 3.68 (1H, m), 3.99 (1H, t_A, J = 10.8 Hz)].</p> <p style="text-align: right;">* señal solapada.</p> <p>RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 19.6 (c, C-15), 20.7 (c, OAc), 23.2 (t, C-2), 23.6 (c, C-14), 26.5 (c, C-13), 30.3 (c, C-12), 38.6 (t, C-3), 49.9 (s, C-10), 53.7 (d, C-7), 68.9 (d, C-8), 70.9 (s, C-4), 72.1 (d, C-1), 72.2 (d, C-9), 77.9 (d, C-6), 84.7 (s, C-11), 91.3 (s, C-5), 117.0 (d, OtCin), 128.1 (2 × d, OtCin), 128.4 (2 × d, OtCin), 128.7 (2 × d, OBz), 129.3 (s, OBz), 130.2 (2 × d, OBz), 130.4 (d, OtCin), 133.4 (d, OBz), 134.0 (s, OtCin), 145.7 (d, OtCin), 164.8 (s, OtCin), 165.5 (s, OBz), 169.9 (s, OAc), OSucDCU [24.7 (t), 24.8 (t), 25.3 (2 × t), 25.5 (2 × t), 26.0 (t), 26.2 (t), 29.9 (t), 30.2 (t), 32.5 (t), 32.7 (t), 50.0 (d), 55.2 (d), 153.8 (s), 170.6 (s), 171.5 (s)].</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IES) <i>m/z</i> (%): 907 [M + Na]⁺ (100).</p> <p>EMAR (IES) <i>m/z</i>: Calculado para C₅₀H₆₄N₂O₁₂Na [M + Na]⁺: 907.4357, observado 907.4339.</p>

Preparación del derivado **54a**

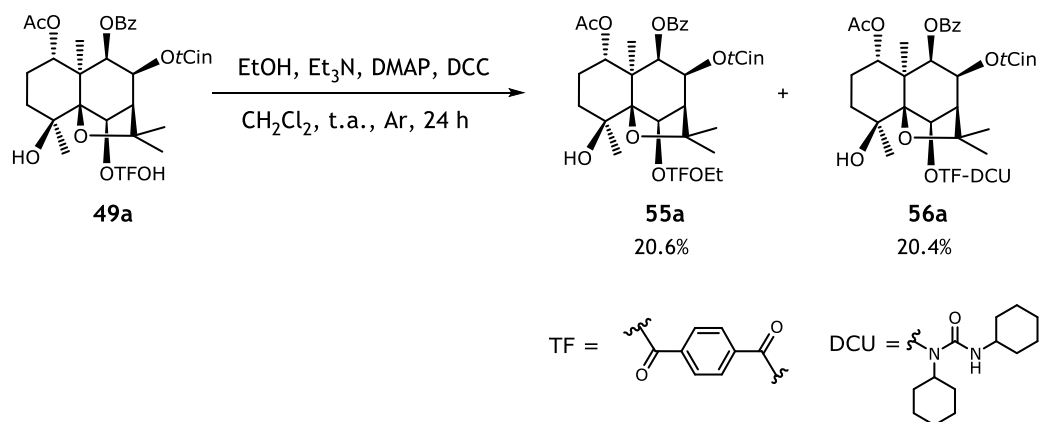


A una disolución de **48a** (6.2 mg, 0.009 mmol) en 0.1 mL de CH_2Cl_2 seco, bajo atmósfera de argón y a $0\text{ }^\circ\text{C}$, se le adicionó DMAP (10.0 mg, 0.082 mmol), MeOH (10 μL , 0.246 mmol) y DCC (16.8 mg, 0.081 mmol). La mezcla se dejó agitar durante 6 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se diluyó con CH_2Cl_2 , se lavó con HCl (1 M, 10 mL) y disolución saturada de NaHCO_3 (10 mL), se secó sobre MgSO_4 anhidro, se filtró y se llevó a sequedad a vacío. El crudo se purificó mediante CCFP usando como eluyentes hexanos- CH_2Cl_2 (1:4) y hexanos-AcOEt (3:2), para dar el derivado **54a** como un sólido amorfo (1.3 mg, 20.5 % de rendimiento).

Derivado 54a

Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo incoloro (1.3 mg).</p> <p>$[\alpha]_D^{28}$: -113.8° (c 0.12, CHCl₃).</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 1.32 (3H, s, Me-14), 1.47 (3H, s, Me-15), 1.48 (1H, m, H-2α), 1.56 (3H, s, Me-12), 1.67 (3H, s, OAc), 1.68* (1H, H-3α), 1.71 (3H, s, Me-13), 1.91 (2H, m, H-2β, H-3β), 2.53 (1H, d, J = 3.2 Hz, H-7), 2.84 (1H, s_A, OH-4), 5.36 (1H, dd, J = 4.0, 12.3 Hz, H-1), 5.44 (1H, d, J = 6.3 Hz, H-9), 5.61 (1H, s, H-6), 5.71 (1H, dd, J = 3.2, 6.3 Hz, H-8), 6.21 (1H, d, J = 16.0 Hz, OtCin), 7.24 (2H, d, J = 8.0 Hz, OtCin), 7.30 (2H, t, J = 7.7 Hz, OtCin), 7.34 (1H, d, J = 7.2 Hz, OtCin), 7.38 (1H, d, J = 16.0 Hz, OtCin), 7.44 (2H, t, J = 7.4 Hz, OBz), 7.59 (1H, tt, J = 1.1, 7.4 Hz, OBz), 8.05 (2H, dd, J = 1.2, 8.1 Hz, OBz), OGlutOMe [2.00 (2H, q, J = 7.3 Hz), 2.41 (2H, t, J = 7.3 Hz), 2.46 (2H, m), 3.68 (3H, s)].</p> <p style="text-align: right;">* señal solapada.</p> <p>RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 19.6 (c, C-15), 20.8 (c, OAc), 23.3 (t, C-2), 24.0 (c, C-14), 26.5 (c, C-13), 30.3 (c, C-12), 38.5 (t, C-3), 50.0 (s, C-10), 53.9 (d, C-7), 69.1 (d, C-8), 70.4 (s, C-4), 72.2 (d, C-1), 72.3 (d, C-9), 77.4 (d, C-6), 84.6 (s, C-11), 91.5 (s, C-5), 117.1 (d, OtCin), 128.1 (2 × d, OtCin), 128.4 (2 × d, OtCin), 128.7 (2 × d, OBz), 129.4 (s, OBz), 130.2 (2 × d, OBz), 130.4 (d, OtCin), 133.4 (d, OBz), 134.0 (s, OtCin), 145.7 (d, OtCin), 164.9 (s, OtCin), 165.5 (s, OBz), 169.9 (s, OAc), OGlutOMe [19.7 (t), 33.0 (t), 33.8 (t), 51.7 (c), 171.9 (s), 173.2 (s)].</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IE) m/z (%): 691 [M - CH₃]⁺ (4), 569 (14), 518 (3), 430 (4), 248 (5), 202 (15), 166 (5), 131 (73), 129 (48), 105 (100), 103 (12), 101 (14), 77 (13), 59 (8).</p> <p>EMAR (IE) m/z: Calculado para C₃₈H₄₃O₁₂ [M - CH₃]⁺: 691.2755, observado 691.2772.</p>

Preparación de los derivados 55a y 56a



A una disolución de **49a** (4.2 mg, 0.006 mmol) en 0.1 mL de CH_2Cl_2 seco, a temperatura ambiente y bajo atmósfera de argón, se adicionó Et_3N (10 μL , 0.072 mmol), DMAP (5.0 mg, 0.041 mmol), EtOH (10 μL , 0.171 mmol) y DCC (1.4 mg, 0.068 mmol). Se agitó durante 24 h, tras lo cual se añadió 0.1 mL de tolueno seco. La reacción se siguió mediante CCF y se paró a las 118 h. Se diluyó con CH_2Cl_2 , se lavó con 6 mL de HCl 1 M, disolución saturada de NaHCO_3 (10 mL) y disolución saturada de NaCl (10 mL). La fase orgánica se secó sobre MgSO_4 anhidro, se filtró y se llevó a sequedad en el rotavapor. El residuo se purificó mediante CCFP usando como eluyente hexanos- AcOEt (3:2), rindiendo los derivados **55a** (0.9mg, 20.6% de rendimiento) y **56a** (1.1 mg, 20.4% de rendimiento) como sólidos amorfos.

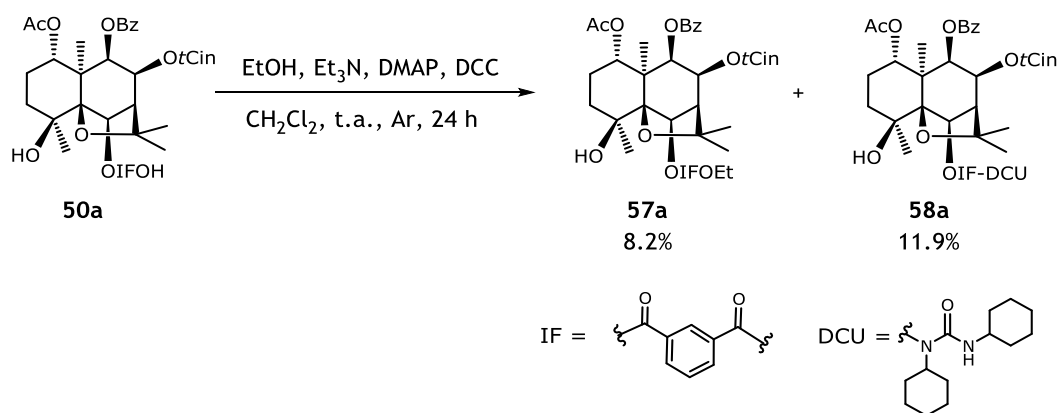
Derivado 55a

Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo incoloro (0.9 mg).</p> <p>$[\alpha]_D^{20}$: -21.7° (c 0.09, CHCl₃).</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 1.37 (3H, s, Me-14), 1.51* (1H, H-2α), 1.52 (3H, s, Me-15), 1.56* (3H, Me-12), 1.69 (3H, s, OAc), 1.74 (3H, s, Me-13), 1.76 (1H, td, <i>J</i> = 3.9, 13.8 Hz, H-3α), 1.93 (1H, m, H-2β), 1.98 (1H, dt, <i>J</i> = 4.2, 14.0 Hz, H-3β), 2.74 (1H, d, <i>J</i> = 3.2 Hz, H-7), 3.03 (1H, s, OH-4), 5.41 (1H, dd, <i>J</i> = 4.2, 12.2 Hz, H-1), 5.51 (1H, d, <i>J</i> = 6.3 Hz, H-9), 5.72 (1H, s, H-6), 5.84 (1H, dd, <i>J</i> = 3.2, 6.3 Hz, H-8), 6.22 (1H, d, <i>J</i> = 16.1 Hz, OtCin), 7.26* (2H, OtCin), 7.30 (2H, t, <i>J</i> = 7.4 Hz, OtCin), 7.33 (1H, dt, <i>J</i> = 2.5, 7.1 Hz, OtCin), 7.41 (1H, d, <i>J</i> = 16.1 Hz, OtCin), 7.46 (2H, t, <i>J</i> = 7.9 Hz, OBz), 7.60 (1H, tt, <i>J</i> = 1.4, 7.4 Hz, OBz), 8.07 (2H, dd, <i>J</i> = 1.5, 8.1 Hz, OBz), OTFOEt [1.40 (3H, t, <i>J</i> = 7.1 Hz), 4.40 (2H, c, <i>J</i> = 7.1 Hz), 8.14 (2H, d, <i>J</i> = 8.6 Hz), 8.28 (2H, d, <i>J</i> = 8.6 Hz)]. * señal solapada.</p> <p>RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 19.7 (c, C-15), 20.8 (c, OAc), 23.3 (t, C-2), 23.8 (c, C-14), 26.5 (c, C-13), 30.3 (c, C-12), 38.8 (t, C-3), 49.9 (s, C-10), 53.7 (d, C-7), 69.1 (d, C-8), 70.7 (s, C-4), 72.1 (d, C-1), 72.2 (d, C-9), 78.6 (d, C-6), 84.7 (s, C-11), 91.3 (s, C-5), 117.1 (d, OtCin), 128.1 (2 × d, OtCin), 128.4 (2 × d, OtCin), 128.8 (2 × d, OBz), 129.3 (s, OBz), 130.2 (2 × d, OBz), 130.4 (d, OtCin), 133.4 (d, OBz), 134.0 (s, OtCin), 145.7 (d, OtCin), 164.9 (s, OtCin), 165.5 (s, OBz), 169.9 (s, OAc), OTFOEt [14.3 (c), 61.4 (t), 129.8 (2 × d), 130.1 (2 × d), 133.2 (s), 134.7 (s), 165.0 (s), 165.8 (s)].</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IES) <i>m/z</i> (%): 777 [M + Na]⁺ (100).</p> <p>EMAR (IES) <i>m/z</i>: Calculado para C₄₃H₄₆O₁₂Na [M + Na]⁺: 777.2887, observado 777.2897.</p>

Derivado 56a

Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo incoloro (1.1 mg).</p> <p>$[\alpha]_D^{20}$: -65.6° (c 0.07, CHCl₃).</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 1.35 (3H, s, Me-14), 1.45–1.87 (2H, H-2α, H-3α), 1.51 (3H, s, Me-15), 1.56* (3H, Me-12), 1.69 (3H, s, OAc), 1.74 (3H, s, Me-13), 1.99 (2H, m, H-2β, H-3β), 2.74 (1H, d_A, J = 1.9 Hz, H-7), 3.01 (1H, s, OH-4), 5.41 (1H, dd, J = 3.5, 11.9 Hz, H-1), 5.50 (1H, d, J = 6.2 Hz, H-9), 5.71 (1H, s, H-6), 5.83 (1H, dd, J = 1.9, 6.2 Hz, H-8), 6.22 (1H, d, J = 16.1 Hz, OtCin), 7.26* (2H, OtCin), 7.30 (2H, t, J = 7.7 Hz, OtCin), 7.34 (1H, d, J = 7.7 Hz, OtCin), 7.41 (1H, d, J = 16.1 Hz, OtCin), 7.45 (2H, t, J = 7.5 Hz, OBz), 7.60* (1H, OBz), 8.07 (2H, d, J = 7.8 Hz, OBz), OTFDCU [1.00–1.39 (8H, m), 1.45–1.87 (12H), 3.48 (1H, m), 4.03 (1H, t_A, J = 11.5 Hz), 6.11 (1H, s_A), 7.61 (2H, d, J = 8.3 Hz), 8.26 (2H, d, J = 8.3 Hz)].</p> <p style="text-align: right;">* señal solapada.</p> <p>RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 19.6 (c, C-15), 20.8 (c, OAc), 23.3 (t, C-2), 23.8 (c, C-14), 26.5 (c, C-13), 30.2 (c, C-12), 38.8 (t, C-3), 49.9 (s, C-10), 53.7 (d, C-7), 69.0 (d, C-8), 70.7 (s, C-4), 72.1 (d, C-1), 72.2 (d, C-9), 78.5 (d, C-6), 84.7 (s, C-11), 91.3 (s, C-5), 117.0 (d, OtCin), 128.1 (2 × d, OtCin), 128.4 (2 × d, OtCin), 128.7 (2 × d, OBz), 129.3 (s, OBz), 130.2 (2 × d, OBz), 130.4 (d, OtCin), 133.4 (d, OBz), 134.0 (s, OtCin), 145.7 (d, OtCin), 164.9 (s, OtCin), 165.5 (s, OBz), 169.9 (s, OAc), OTFDCU [24.4 (t), 25.1 (t), 25.3 (t), 25.6 (t), 26.1 (2 × t), 30.7 (2 × t), 32.2 (2 × t), 49.6 (d), 57.5 (d), 126.7 (2 × d), 130.5 (2 × d), 131.3 (s), 141.5 (s), 153.7 (s), 164.8 (s), 170.2 (s)].</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IES) m/z (%): 955 [M + Na]⁺ (100).</p> <p>EMAR (IES) m/z: Calculado para C₅₄H₆₄N₂O₁₂Na [M + Na]⁺: 955.4357, observado 955.4368.</p>

Preparación de los derivados **57a** y **58a**



Usando la misma metodología que en la preparación del compuesto **50a**, tratamos 5.9 mg de **52a** (0.008 mmol) en 0.1 mL de CH_2Cl_2 seco con Et_3N (10 μL , 0.072 mmol), DMAP (5.0 mg, 0.041 mmol), EtOH (10 μL , 0.171 mmol) y DCC (1.9 mg, 0.092 mmol). La reacción se paró a las 118 h diluyendo con CH_2Cl_2 , se lavó con 6 mL de HCl 1 M, disolución saturada de NaHCO_3 (10 mL) y disolución saturada de NaCl (10 mL). La fase orgánica se secó sobre MgSO_4 anhidro, se filtró y se llevó a sequedad a vacío. El residuo fue purificado mediante cromatografía en CCFP usando hexanos-AcOEt (3:2), rindiendo los derivados **57a** (0.5 mg, 8.2% de rendimiento) y **58a** (0.9 mg, 11.9% de rendimiento) como sólidos amorfos.

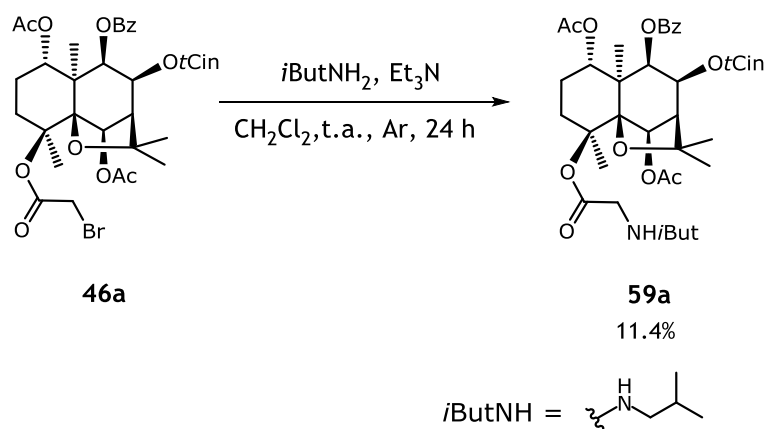
Derivado 57a

Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo incoloro (0.5 mg).</p> <p>$[\alpha]_D^{20}$: -34.1° (c 0.06, CHCl₃).</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 1.37 (3H, s, Me-14), 1.51* (1H, H-2α), 1.52 (3H, s, Me-15), 1.59 (3H, s, Me-12), 1.69 (3H, s, OAc), 1.75 (3H, s, Me-13), 1.77 (1H, m, H-3α), 1.94 (1H, m, H-2β), 1.98 (1H, m, H-3β), 2.74 (1H, d, J = 3.2 Hz, H-7), 3.00 (1H, s_A, OH-4), 5.41 (1H, dd, J = 4.2, 12.2 Hz, H-1), 5.51 (1H, d, J = 6.4 Hz, H-9), 5.74 (1H, s, H-6), 5.84 (1H, dd, J = 3.2, 6.4 Hz, H-8), 6.22 (1H, d, J = 16.0 Hz, OtCin), 7.26* (2H, OtCin), 7.31 (2H, t, J = 7.7 Hz, OtCin), 7.34 (1H, tt, J = 2.7, 7.2 Hz, OtCin), 7.41 (1H, d, J = 16.0 Hz, OtCin), 7.46 (2H, t, J = 7.7 Hz, OBz), 7.60 (1H, t, J = 7.4 Hz, OBz), 8.08 (2H, dd, J = 1.4, 8.4 Hz, OBz), OIFOEt [1.41 (3H, t, J = 7.1 Hz), 4.41 (2H, c, J = 7.1 Hz), 7.57 (1H, t, J = 7.7 Hz), 8.26 (1H, td, J = 1.6, 7.8 Hz), 8.42 (1H, td, J = 1.7, 7.8 Hz), 8.86 (1H, t, J = 1.7 Hz)]. * señal solapada.</p> <p>RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 19.7 (c, C-15), 20.8 (c, OAc), 23.3 (t, C-2), 23.9 (c, C-14), 26.5 (c, C-13), 30.3 (c, C-12), 38.8 (t, C-3), 49.9 (s, C-10), 53.7 (d, C-7), 69.1 (d, C-8), 70.7 (s, C-4), 72.2 (d, C-1), 72.3 (d, C-9), 78.6 (d, C-6), 84.7 (s, C-11), 91.3 (s, C-5), 117.1 (d, OtCin), 128.1 (2 × d, OtCin), 128.4 (2 × d, OtCin), 128.8 (2 × d, OBz), 129.3 (s, OBz), 130.2 (2 × d, OBz), 130.4 (d, OtCin), 133.4 (d, OBz), 134.0 (s, OtCin), 145.7 (d, OtCin), 164.9 (s, OtCin), 165.5 (s, OBz), 169.9 (s, OAc), OIFOEt [14.3 (c), 61.4 (t), 128.9 (d), 130.0 (s), 131.2 (s), 131.5 (d), 134.2 (2 × d), 165.0 (s), 165.7 (s)].</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IES) m/z (%): 777 [M + Na]⁺ (100).</p> <p>EMAR (IES) m/z: Calculado para C₄₃H₄₆O₁₂Na [M + Na]⁺: 777.2887, observado 777.2880.</p>

Derivado 58a

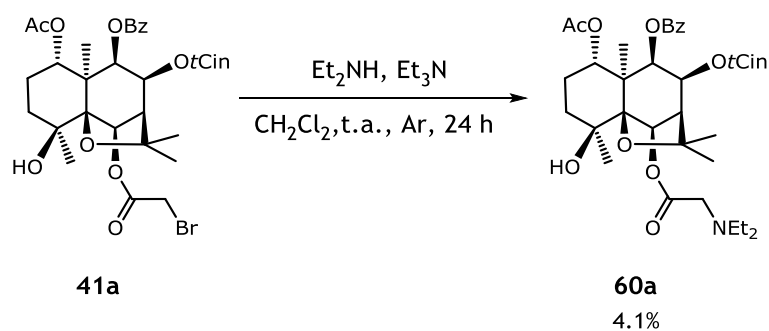
Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo incoloro (0.9 mg).</p> <p>$[\alpha]_D^{20}$: -7.4° (c 0.10, CHCl₃)</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 1.35 (3H, s, Me-14), 1.44–1.89 (2H, H-2α, H-3α), 1.51 (3H, s, Me-15), 1.58* (3H, Me-12), 1.69 (3H, s, OAc), 1.74 (3H, s, Me-13), 1.93* (1H, H-2β), 2.00* (1H, H-3β), 2.72 (1H, d_A, J = 1.9 Hz, H-7), 3.07 (1H, s_A, OH-4), 5.40 (1H, dd, J = 3.4, 12.1 Hz, H-1), 5.50 (1H, d, J = 6.1 Hz, H-9), 5.73 (1H, s, H-6), 5.83 (1H, dd, J = 1.9, 6.1 Hz, H-8), 6.22 (1H, d, J = 16.1 Hz, OtCin), 7.26* (2H, OtCin), 7.31 (2H, t, J = 7.5 Hz, OtCin), 7.34 (1H, d, J = 7.6 Hz, OtCin), 7.41 (1H, d, J = 16.1 Hz, OtCin), 7.45 (2H, t, J = 7.7 Hz, OBz), 7.60 (1H, t, J = 7.4 Hz, OBz), 8.07 (2H, d, J = 7.8 Hz, OBz), OIFDCU [1.00–1.41 (8H, m), 1.44–1.89 (12H), 3.47 (1H, m), 4.06 (1H, t_A, J = 11.4 Hz), 6.41 (1H, s_A), 7.52 (1H, t, J = 8.2 Hz), 7.72 (1H, d, J = 7.7 Hz), 8.30 (1H, t, J = 7.7 Hz), 8.34 (1H, s)].</p> <p style="text-align: right;">* señal solapada.</p> <p>RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 19.7 (c, C-15), 20.8 (c, OAc), 23.3 (t, C-2), 23.8 (c, C-14), 26.5 (c, C-13), 30.4 (c, C-12), 38.8 (t, C-3), 49.9 (s, C-10), 53.7 (d, C-7), 69.0 (d, C-8), 70.8 (s, C-4), 72.1 (d, C-1), 72.2 (d, C-9), 78.5 (d, C-6), 84.8 (s, C-11), 91.3 (s, C-5), 117.1 (d, OtCin), 128.2 (2 × d, OtCin), 128.4 (2 × d, OtCin), 128.8 (2 × d, OBz), 129.3 (s, OBz), 130.2 (2 × d, OBz), 130.5 (d, OtCin), 133.4 (d, OBz), 134.0 (s, OtCin), 145.7 (d, OtCin), 164.9 (s, OtCin), 165.5 (s, OBz), 169.9 (s, OAc), OIFDCU [24.5 (t), 24.9 (t), 25.2 (t), 25.3 (t), 26.1 (t), 26.2 (t), 30.5 (t), 30.8 (t), 32.2 (t), 32.3 (t), 49.2 (d), 57.4 (d), 129.0 (d, Ar), 129.9 (s, Ar), 130.1 (d, Ar), 131.1 (s), 132.1 (d), 137.8 (d), 153.9 (s), 156.7 (s), 164.8 (s)].</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IES) <i>m/z</i> (%): 955 [M + Na]⁺ (100).</p> <p>EMAR (IES) <i>m/z</i>: Calculado para C₅₄H₆₄N₂O₁₂Na [M + Na]⁺: 955.4357, observado 955.4321.</p>

Preparación del derivado 59a



A una disolución de **43a** (6.2 mg, 0.008 mmol) en 0.2 mL de CH_2Cl_2 seco, a temperatura ambiente y bajo atmósfera de argón, se le añadió Et_3N (10 μL , 0.072 mmol) e isobutilamina (30 μL , 0.300 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 24 h, tras lo cual diluyó con CH_2Cl_2 , se lavó con 10 mL de HCl 1 M, disolución saturada de NaHCO_3 (10 mL) y disolución saturada de NaCl (10 mL). La fase orgánica se secó sobre MgSO_4 anhidro, se filtró y se llevó a sequedad en el rotavapor. El residuo fue purificado mediante CCFP con una fase móvil de CH_2Cl_2 - MeOH (49:1), rindiendo el derivado **59a** como un sólido amorfo (0.7 mg, 11.4% de rendimiento).

Preparación del derivado 60a

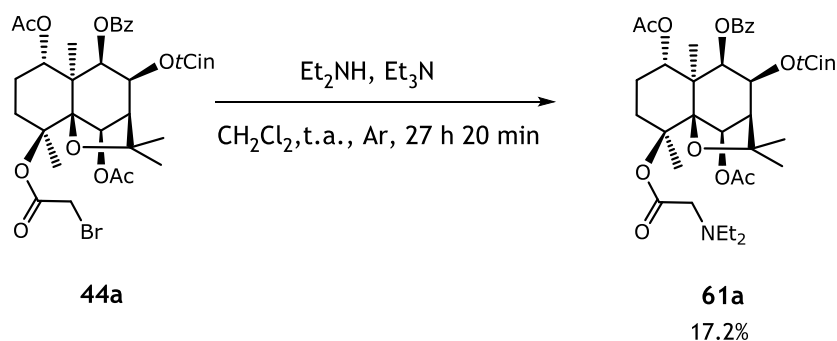


A una disolución de **40a** (4.1 mg, 0.006 mmol) en 1.5 mL de CH₂Cl₂ seco, bajo atmósfera de argón y a temperatura ambiente, se le añadió Et₃N (20 μL, 0.143 mmol) y Et₂NH (15 μL, 0.144 mmol). La mezcla se agitó durante 24 h, tras lo cual se eliminó el disolvente a vacío. El residuo fue purificado mediante CCFP usando como fases móviles mezclas de hexanos–AcOEt (4:1, 1:1, 3:7), CH₂Cl₂–MeOH (77:3) y hexanos–1,4-dioxano (13:9). Se obtuvo el producto **60a** como un sólido amorfo (0.2 mg, 4.1% de rendimiento).

Derivado 60a

Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo incoloro (0.2 mg).</p> <p>$[\alpha]_D^{20}$: -32.1° (c 0.04, CHCl₃).</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 1.34 (3H, s, Me-14), 1.47 (3H, s, Me-15), 1.50* (1H, H-2α), 1.56 (3H, s, Me-12), 1.66* (1H, H-3α), 1.67 (3H, s, OAc), 1.72 (3H, s, Me-13), 1.94 (2H, m, H-2β, H-3β), 2.53 (1H, d_A, J = 3.1 Hz, H-7), 3.07 (1H, s_A, J = 3.1 Hz, OH-4), 5.38 (1H, dd, J = 3.8, 11.9 Hz, H-1), 5.45 (1H, d, J = 6.5 Hz, H-9), 5.62 (1H, s, H-6), 5.71 (1H, dd, J = 3.1, 6.5 Hz, H-8), 6.21 (1H, d, J = 16.1 Hz, OtCin), 7.24 (2H, d, J = 7.6 Hz, OtCin), 7.30 (2H, t, J = 7.2 Hz, OtCin), 7.34 (1H, t, J = 7.1 Hz, OtCin), 7.38 (1H, d, J = 16.1 Hz, OtCin), 7.44 (2H, t, J = 7.6 Hz, OBz), 7.59 (1H, t, J = 7.3 Hz, OBz), 8.06 (2H, d, J = 7.6 Hz, OBz), Et₂NCH₂COO [1.06 (6H, t, J = 7.0 Hz), 2.66 (4H, c, J = 7.0 Hz), 3.32, 3.41 (2H, d_{AB}, J = 17.1 Hz)]. * señal solapada.</p> <p>RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 19.6 (c, C-15), 20.8 (c, OAc), 23.3 (t, C-2), 24.5 (c, C-14), 26.6 (c, C-13), 30.4 (c, C-12), 37.9 (t, C-3), 50.0 (s, C-10), 53.9 (d, C-7), 69.1 (d, C-8), 70.6 (s, C-4), 72.3 (d, C-1), 72.4 (d, C-9), 77.5 (d, C-6), 84.5 (s, C-11), 91.3 (s, C-5), 117.2 (d, OtCin), 128.2 (2 × d, OtCin), 128.4 (2 × d, OtCin), 128.8 (2 × d, OBz), 129.4 (s, OBz), 130.3 (2 × d, OBz), 130.5 (d, OtCin), 133.4 (d, OBz), 134.0 (s, OtCin), 145.7 (d, OtCin), 164.9 (s, OtCin), 165.6 (s, OBz), 169.9 (s, OAc), Et₂NCH₂COO [12.1 (2 × c), 47.6 (2 × t), 54.8 (t), 170.7 (s)].</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IES) m/z (%): 692 [M + H]⁺ (100).</p> <p>EMAR (IES) m/z: Calculado para C₃₉H₅₀NO₁₀ [M + H]⁺: 692.3435, observado 692.3431.</p>

Preparación del derivado 61a

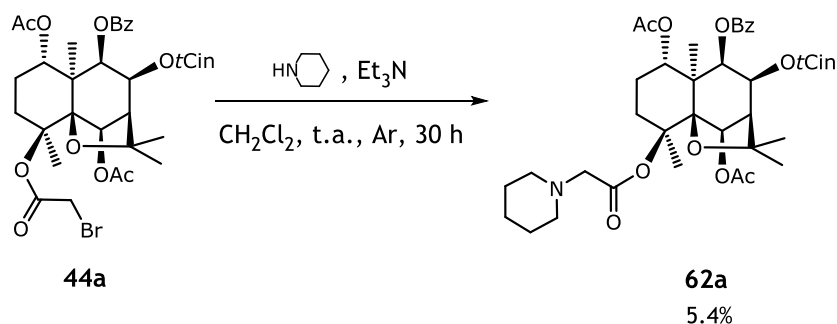


A una disolución de **43a** (5.3 mg, 0.007 mmol) en 0.1 mL de CH₂Cl₂ seco, a temperatura ambiente y bajo atmósfera de argón, se le añadió Et₃N (10 µL, 0.072 mmol) y Et₂NH (15 µL, 0.144 mmol). La mezcla de reacción se dejó con agitación durante 27 h 20 min y se siguió mediante CCF. Trascurrido ese tiempo, se diluyó con CH₂Cl₂, se lavó con HCl 1 M (10 mL), disolución saturada de NaHCO₃ (10 mL) y disolución saturada de NaCl (10 mL). La fase orgánica se secó sobre MgSO₄ anhidro, se filtró y se llevó a sequedad en el rotavapor. El residuo se filtró sobre una pipeta Pasteur, molida a mortero, y carbón activo. Finalmente, se purificó mediante CCFP usando como fase móvil diferentes mezclas de CH₂Cl₂-MeOH (99:1, 49:1) hasta obtener el producto **61a** como un sólido amorfo (0.9 mg, 17.2% de rendimiento).

Derivado 61a

Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo incoloro (0.9 mg).</p> <p>$[\alpha]_D^{20}$: -101.2° (c 0.10, CHCl₃).</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 1.48* (1H, H-2α), 1.50 (3H, s, Me-15), 1.56 (3H, s, Me-12), 1.66 (3H, s, OAc-1), 1.68 (3H, s, Me-14), 1.70 (3H, s, Me-13), 2.00 (1H, m, H-2β), 2.09* (1H, H-3β), 2.10 (3H, s, OAc-6), 2.54 (1H, d, J = 3.3 Hz, H-7), 2.89 (1H, td, J = 3.5, 13.6 Hz, H-3α), 5.45 (1H, d, J = 6.4 Hz, H-9), 5.47 (1H, dd, J = 4.4, 12.2 Hz, H-1), 5.58 (1H, s, H-6), 5.69 (1H, dd, J = 3.3, 6.4 Hz, H-8), 6.20 (1H, d, J = 16.1 Hz, OtCin), 7.23 (2H, d, J = 7.3 Hz, OtCin), 7.30 (2H, t, J = 7.2 Hz, OtCin), 7.34 (1H, t, J = 7.1 Hz, OtCin), 7.37 (1H, d, J = 16.1 Hz, OtCin), 7.43 (2H, t, J = 7.8 Hz, OBz), 7.58 (1H, t, J = 7.4 Hz, OBz), 8.07 (2H, d, J = 7.7 Hz, OBz), Et₂NCH₂COO [1.08 (6H, t, J = 7.1 Hz), 2.68 (4H, m), 3.24, 3.35 (2H, d_{AB}, J = 17.2 Hz)]. * señal solapada.</p> <p>RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 19.7 (c, C-15), 20.7 (c, OAc-1), 21.3 (c, OAc-6), 21.4 (c, C-14), 22.7 (t, C-2), 26.5 (c, C-13), 30.0 (c, C-12), 32.0 (t, C-3), 51.0 (s, C-10), 53.6 (d, C-7), 69.2 (d, C-8), 71.9 (s, C-4), 72.9 (2 × d, C-1, C-9), 77.7 (d, C-6), 84.6 (s, C-11), 90.5 (s, C-5), 117.1 (d, OtCin), 128.1 (2 × d, OtCin), 128.4 (2 × d, OtCin), 128.7 (2 × d, OBz), 129.9 (s, OBz), 130.3 (2 × d, OBz), 130.4 (d, OtCin), 133.3 (d, OBz), 134.0 (s, OtCin), 145.6 (d, OtCin), 164.9 (s, OtCin), 165.5 (s, OBz), 169.8 (s, OAc), Et₂NCH₂COO [12.4 (2 × c), 47.6 (2 × t), 55.0 (t), 169.5 (s)].</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IES) m/z (%): 734 [M + H]⁺ (100).</p> <p>EMAR (IES) m/z: Calculado para C₄₁H₅₂NO₁₁ [M + H]⁺: 734.3540, observado 734.3547.</p>

Preparación del derivado 62a

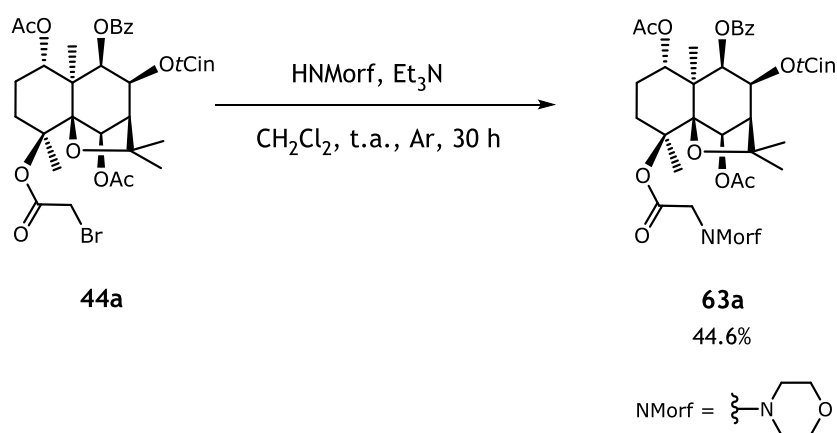


A una disolución de **46a** (5.5 mg, 0.007 mmol) en 0.2 mL de CH₂Cl₂ seco, bajo atmósfera de argón y a temperatura ambiente, se le añadió Et₃N (15 μL, 0.108 mmol) y piperidina (20 μL, 0.202 mmol). Tras 30 h con agitación, se diluyó con CH₂Cl₂, se lavó con HCl 1 M (3.5 mL), disolución saturada de NaHCO₃ (5 mL) y disolución saturada de NaCl (5 mL). La fase orgánica se secó sobre MgSO₄ anhidro, se filtró y se llevó a sequedad a presión reducida. El residuo fue purificado mediante CCFP usando como eluyente mezclas de CH₂Cl₂-MeOH (24:1, 49:1 y 99:1) para obtener el producto **62a** como un sólido amorfo (0.3 mg, 5.4% de rendimiento).

Derivado 62a

Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo incoloro (0.3 mg).</p> <p>$[\alpha]_D^{20}$: -58.1° (c 0.15, CHCl₃).</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 1.49 (3H, s, Me-15), 1.50* (1H, H-2α), 1.56 (3H, s, Me-12), 1.66 (3H, s, OAc-1), 1.68 (3H, s, Me-14), 1.70 (3H, s, Me-13), 2.00 (1H, m, H-2β), 2.09 (3H, s, OAc-6), 2.10* (1H, H-3β), 2.54 (1H, d, J = 2.9 Hz, H-7), 2.89 (1H, td, J = 3.2, 13.3 Hz, H-3α), 5.44 (1H, d, J = 6.5 Hz, H-9), 5.47 (1H, dd, J = 4.1, 12.0 Hz, H-1), 5.58 (1H, s, H-6), 5.68 (1H, dd, J = 2.9, 6.5 Hz, H-8), 6.20 (1H, d, J = 16.1 Hz, OtCin), 7.23 (2H, d, J = 7.4 Hz, OtCin), 7.30 (2H, t, J = 7.3 Hz, OtCin), 7.33 (1H, t, J = 7.2 Hz, OtCin), 7.37 (1H, d, J = 16.1 Hz, OtCin), 7.43 (2H, t, J = 7.7 Hz, OBz), 7.58 (1H, t, J = 7.3 Hz, OBz), 8.06 (2H, d, J = 7.7 Hz, OBz), C₅H₁₀NCH₂COO [1.64 (6H, s_A), 2.52 (4H, s_A), 3.08, 3.20 (2H, d_{AB}, J = 16.7 Hz)]. * señal solapada.</p> <p>RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 19.7 (c, C-15), 20.7 (c, OAc-6), 21.4 (c, OAc-1), 21.5 (c, C-14), 22.7 (t, C-2), 26.5 (c, C-13), 30.0 (c, C-12), 32.0 (t, C-3), 51.0 (s, C-10), 53.6 (d, C-7), 69.2 (d, C-8), 71.8 (d, C-1), 72.9 (d, C-9), 77.6 (d, C-6), 82.3 (s, C-4), 84.7 (s, C-11), 90.6 (s, C-5), 117.1 (d, OtCin), 128.1 (2 × d, OtCin), 128.4 (2 × d, OtCin), 128.7 (2 × d, OBz), 129.3 (s, OBz), 130.3 (2 × d, OBz), 130.4 (d, OtCin), 133.4 (d, OBz), 134.0 (s, OtCin), 145.6 (d, OtCin), 164.9 (s, OtCin), 165.5 (s, OBz), 169.5 (s, OAc-6), 169.8 (s, OAc-1), C₅H₁₀NCH₂COO [23.9 (t), 25.7 (2 × t), 54.4 (2 × t), 60.9 (t_A), 168.9 (s)].</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IES) m/z (%): 746 [M + H]⁺ (100).</p> <p>EMAR (IES) m/z: Calculado para C₄₂H₅₂NO₁₁ [M + H]⁺: 746.3540, observado 746.3546.</p>

Preparación del derivado 63a

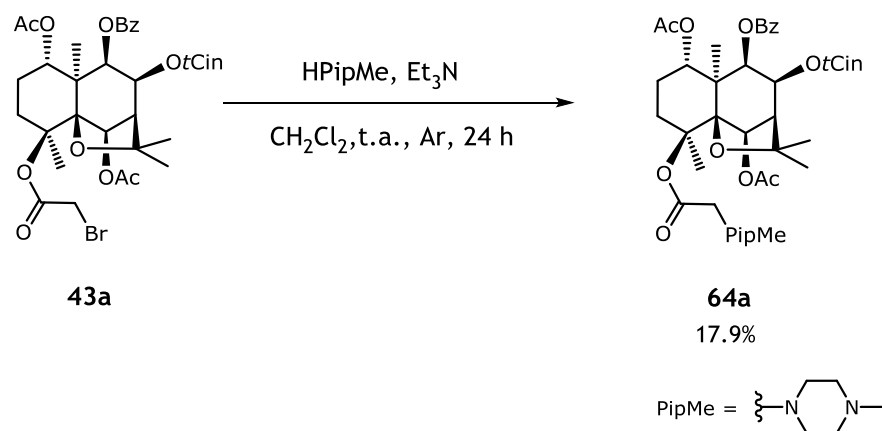


A una disolución de **43a** (4.0 mg, 0.005 mmol) en 0.2 mL de CH₂Cl₂, seco, a temperatura ambiente y bajo atmósfera de argón, se le añadió Et₃N (10 μL, 0.072 mmol) y morfolina (25 μL, 0.287 mmol). La reacción se siguió mediante CCF. La mezcla se agitó durante 30 horas, tras lo cual se diluyó con CH₂Cl₂ y se lavó con 5 mL de HCl 1 M, disolución saturada de NaHCO₃ (5 mL) y disolución saturada de NaCl (5 mL). La fase orgánica se secó sobre MgSO₄ anhidro, se filtró y se llevó a sequedad en el rotavapor. El residuo se purificó mediante CCFP, usando como eluyente CH₂Cl₂-MeOH (24:1 y 99:1) rindiendo el derivado **63a** como un sólido amorfo (1.8 mg, 44.6% de rendimiento).

Derivado 63a

Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo incoloro (1.8 mg).</p> <p>$[\alpha]_D^{20}$: -64.3° (c 0.18, CHCl₃).</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 1.49* (1H, H-2α), 1.50 (3H, s, Me-15), 1.56 (3H, s, Me-12), 1.66 (3H, s, OAc-1), 1.69 (3H, s, Me-14), 1.71 (3H, s, Me-13), 2.00 (1H, m, H-2β), 2.10 (3H, s, OAc-6), 2.11* (1H, H-3β), 2.55 (1H, d, J = 3.1 Hz, H-7), 2.88 (1H, td, J = 3.3, 13.5 Hz, H-3α), 5.45 (1H, d, J = 6.6 Hz, H-9), 5.47 (1H, dd, J = 4.2, 12.1 Hz, H-1), 5.59 (1H, s, H-6), 5.68 (1H, dd, J = 3.1, 6.6 Hz, H-8), 6.20 (1H, d, J = 16.1 Hz, OtCin), 7.23 (2H, d, J = 7.5 Hz, OtCin), 7.30 (2H, t, J = 7.7 Hz, OtCin), 7.34 (1H, t, J = 7.2 Hz, OtCin), 7.38 (1H, d, J = 16.1 Hz, OtCin), 7.43 (2H, t, J = 7.9 Hz, OBz), 7.59 (1H, t, J = 7.5 Hz, OBz), 8.06 (2H, d, J = 7.7 Hz, OBz), OCH₂NMorf [2.59 (4H, m), 3.08, 3.22 (2H, d_{AB}, J = 16.9 Hz), 3.78 (4H, m)]. * señal solapada.</p> <p>RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 19.7 (c, C-15), 20.7 (c, OAc-1), 21.4 (2 × c, C-14, OAc-6), 22.7 (t, C-2), 26.5 (c, C-13), 30.0 (c, C-12), 32.0 (t, C-3), 51.0 (s, C-10), 53.6 (d, C-7), 69.2 (d, C-8), 71.8 (d, C-1), 72.8 (d, C-9), 77.6 (d, C-6), 82.6 (s, C-4), 84.7 (s, C-11), 90.5 (s, C-5), 117.1 (d, OtCin), 128.1 (2 × d, OtCin), 128.4 (2 × d, OtCin), 128.7 (2 × d, OBz), 129.3 (s, OBz), 130.3 (2 × d, OBz), 130.4 (d, OtCin), 133.4 (d, OBz), 134.0 (s, OtCin), 145.7 (d, OtCin), 164.9 (s, OtCin), 165.5 (s, OBz), 169.4 (s, OAc-6), 169.8 (s, OAc-1), OCH₂NMorf [53.5 (2 × t), 60.4 (t), 66.8 (2 × t), 168.4 (s)].</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IES) m/z (%): 748 [M + H]⁺ (100).</p> <p>EMAR (IES) m/z: Calculado para C₄₁H₅₀NO₁₂ [M + H]⁺: 748.3333, observado 748.3349.</p>

Preparación del derivado 64a

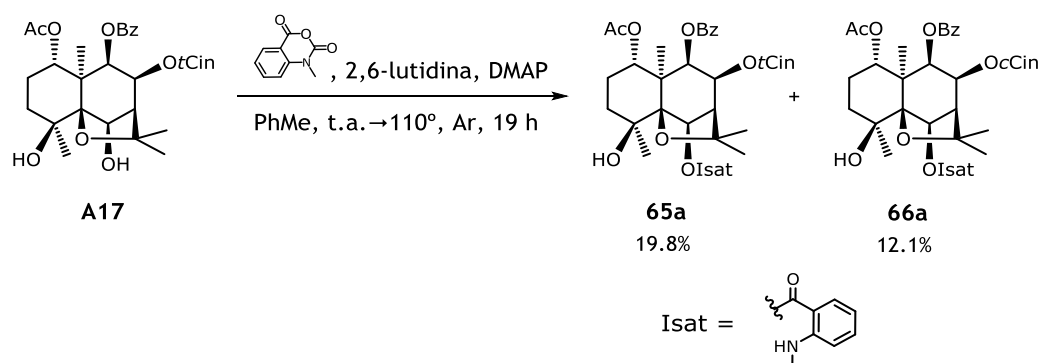


A una disolución de **43a** (6.0 mg, 0.008 mmol) en 0.1 mL de CH₂Cl₂ seco, a temperatura ambiente y bajo atmósfera de argón, se le añadió de Et₃N (10 μL, 0.072 mmol) y de *N*-metilpiperazina (15 μL, 0.135 mmol). La mezcla se agitó durante 24 h y se siguió mediante CCF. Transcurrido ese tiempo, se diluyó con CH₂Cl₂, se lavó con HCl 1 M (10 mL), disolución saturada de NaHCO₃ (10 mL) y disolución saturada de NaCl (10 mL). La fase orgánica se secó sobre MgSO₄ anhidro, se filtró y se llevó a sequedad en el rotavapor. El residuo se purificó mediante CC de Sephadex LH-20 [MeOH-CHCl₃ (1:1)] para dar el derivado **64a** como un sólido amorfo (1.1 mg, 17.9% de rendimiento).

Derivado 64a

Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo incoloro (1.1 mg).</p> <p>$[\alpha]_D^{20}$: -56.6° (c 0.27, CHCl₃).</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 1.48 (1H, m, H-2α), 1.50 (3H, s, Me-15), 1.55 (3H, s, Me-12), 1.66 (3H, s, OAc-1), 1.68 (3H, s, Me-14), 1.70 (3H, s, Me-13), 2.00 (1H, m, H-2β), 2.08* (1H, H-3β), 2.09 (3H, s, OAc-6), 2.55 (1H, d, J = 3.1 Hz, H-7), 2.87 (1H, td, J = 3.0, 13.4 Hz, H-3α), 5.44 (1H, d, J = 6.6 Hz, H-9), 5.46 (1H, dd, J = 4.3, 12.1 Hz, H-1), 5.58 (1H, s, H-6), 5.68 (1H, dd, J = 3.3, 6.6 Hz, H-8), 6.20 (1H, d, J = 16.1 Hz, OtCin), 7.23 (2H, d, J = 7.3 Hz, OtCin), 7.30 (2H, t, J = 7.7 Hz, OtCin), 7.33 (1H, d, J = 7.1 Hz, OtCin), 7.37 (1H, d, J = 16.1 Hz, OtCin), 7.43 (2H, t, J = 7.7 Hz, OBz), 7.58 (1H, t, J = 7.3 Hz, OBz), 8.06 (2H, d, J = 7.7 Hz, OBz), MeN(CH₂)₄NCH₂COO [2.37 (3H, s_A), 2.64 (6H, s_A), 3.10, 3.23 (2H, d_{AB}, J = 17.0 Hz), 5.30 (2H, s)]. * señal solapada.</p> <p>RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 19.7 (c, C-15), 20.7 (c, OAc-1), 21.4 (2 × c, C-14, OAc-6), 22.7 (t, C-2), 26.5 (c, C-13), 30.0 (c, C-12), 32.0 (t, C-3), 51.0 (s, C-10), 53.6 (d, C-7), 69.2 (d, C-8), 71.8 (d, C-1), 72.8 (d, C-9), 77.6 (d, C-6), 82.6 (s, C-4), 84.7 (s, C-11), 90.5 (s, C-5), 117.1 (d, OtCin), 128.1 (2 × d, OtCin), 128.4 (2 × d, OtCin), 128.7 (2 × d, OBz), 129.3 (s, OBz), 130.3 (2 × d, OBz), 130.4 (d, OtCin), 133.4 (d, OBz), 134.0 (s, OtCin), 145.7 (d, OtCin), 164.9 (s, OtCin), 165.5 (s, OBz), 169.4 (s, OAc-6), 169.8 (s, OAc-1), MeN(CH₂)₄NCH₂COO [45.7 (c_A), 52.7 (t_A), 53.4 (t), 54.6 (2 × t), 59.9 (t), 168.5 (s)].</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IES) m/z (%): 761 [M + H]⁺ (100).</p> <p>EMAR (IES) m/z: Calculado para C₄₂H₅₃N₂O₁₁ [M + H]⁺: 761.3649, observado 761.3646.</p>

Preparación de los derivados 65a y 66a



A una disolución de **A17** (7.4 mg, 0.013 mmol) en 0.2 mL de tolueno seco, bajo atmósfera de argón y a temperatura ambiente, se le añadió 2,6-lutidina (0.2 mL, 1.727 mmol), DMAP (6.0 mg, 0.049 mmol) y anhídrido isatoico (19.5 mg, 0.110 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 19 h a 110 °C. Posteriormente, se añadió 0.2 mL de agua, tras observar por CCF la completa conversión del producto de partida. El crudo se lavó con HCl 1 M (10 mL), disolución saturada de NaHCO₃ (10 mL) y disolución saturada de NaCl (10 mL). La fase orgánica se secó sobre MgSO₄ anhidro, se filtró y se llevó a sequedad a vacío. El residuo fue purificado mediante CCFP eluyendo con hexanos–AcOEt (3:2, 4:1) y hexanos–acetona (3:2), lo que rindió los derivados **65a** (1.8 mg, 19.8% de rendimiento) y **66a** (1.1 mg, 12.1% de rendimiento) como sólidos amorfos.

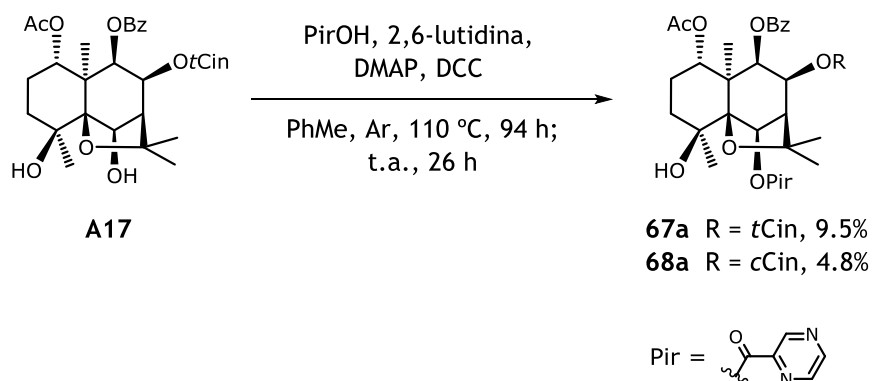
Derivado 65a

Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo incoloro (1.8 mg).</p> <p>$[\alpha]_D^{20}$: -72.2° (c 0.21, CHCl₃).</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 1.40 (3H, s, Me-14), 1.49* (1H, H-2α), 1.51 (3H, s, Me-15), 1.55 (3H, s, Me-12), 1.69 (3H, s, OAc), 1.72 (3H, s, Me-13), 1.76 (1H, td, <i>J</i> = 3.6, 13.3 Hz, H-3α), 1.95 (1H, m, H-2β), 1.97 (1H, dt, <i>J</i> = 3.7, 13.8 Hz, H-3β), 2.73 (1H, d, <i>J</i> = 3.3 Hz, H-7), 3.07 (1H, s, OH-4), 5.40 (1H, dd, <i>J</i> = 4.0, 12.2 Hz, H-1), 5.50 (1H, d, <i>J</i> = 6.3 Hz, H-9), 5.61 (1H, s, H-6), 5.84 (1H, dd, <i>J</i> = 3.3, 6.3 Hz, H-8), 6.22 (1H, d, <i>J</i> = 16.1 Hz, OtCin), 7.25* (2H, OtCin), 7.30 (2H, t, <i>J</i> = 7.7 Hz, OtCin), 7.34 (1H, t, <i>J</i> = 7.2 Hz, OtCin), 7.41 (1H, d, <i>J</i> = 16.1 Hz, OtCin), 7.45 (2H, t, <i>J</i> = 7.3 Hz, OBz), 7.60 (1H, t, <i>J</i> = 7.3 Hz, OBz), 8.07 (2H, d, <i>J</i> = 7.8 Hz, OBz), Olsat [2.91 (3H, d, <i>J</i> = 4.9 Hz), 6.63 (1H, t, <i>J</i> = 7.8 Hz), 6.67 (1H, d, <i>J</i> = 8.5 Hz), 7.40 (1H, dt, <i>J</i> = 1.2, 7.8 Hz), 7.70 (1H, m), 8.19 (1H, dd, <i>J</i> = 1.5, 8.2 Hz)].</p> <p style="text-align: right;">* señal solapada.</p> <p>RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 19.7 (c, C-15), 20.8 (c, OAc), 23.3 (t, C-2), 23.8 (c, C-14), 26.5 (c, C-13), 30.2 (c, C-12), 38.7 (t, C-3), 49.9 (s, C-10), 53.7 (d, C-7), 69.1 (d, C-8), 70.7 (s, C-4), 72.2 (d, C-1), 72.3 (d, C-9), 77.9 (d, C-6), 84.6 (s, C-11), 91.2 (s, C-5), 117.2 (d, OtCin), 128.1 (2 × d, OtCin), 128.4 (2 × d, OtCin), 128.7 (2 × d, OBz), 129.4 (s, OBz), 130.2 (2 × d, OBz), 130.4 (d, OtCin), 133.4 (d, OBz), 134.0 (s, OtCin), 145.6 (d, OtCin), 164.9 (s, OtCin), 165.5 (s, OBz), 169.9 (s, OAc), Olsat [29.5 (c), 109.3 (s), 110.7 (d), 114.9 (d), 132.8 (d), 135.1 (d), 152.0 (s), 167.6 (s)].</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IES) <i>m/z</i> (%): 734 [M + Na]⁺ (100).</p> <p>EMAR (IES) <i>m/z</i>: Calculado para C₄₁H₄₅NO₁₀Na [M + Na]⁺: 734.2941, observado 734.2939.</p>

Derivado 66a

Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo incoloro (1.1 mg).</p> <p>$[\alpha]_D^{20}$: -39.5° (c 0.08, CHCl₃).</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 1.37 (3H, s, Me-14), 1.42 (1H, m, H-2α), 1.46 (3H, s, Me-13), 1.47 (3H, s, Me-15), 1.51 (3H, s, Me-12), 1.67 (3H, s, OAc), 1.74 (1H, m, H-3α), 1.94 (2H, m, H-2β, H-3β), 2.56 (1H, d, J = 2.8 Hz, H-7), 5.35 (1H, dd, J = 4.1, 12.2 Hz, H-1), 5.45 (1H, d, J = 6.3 Hz, H-9), 5.56 (1H, s, H-6), 5.69 (1H, d, J = 12.6 Hz, OcCin), 5.76 (1H, dd, J = 2.8, 6.3 Hz, H-8), 6.89 (1H, d, J = 12.6 Hz, OcCin), 7.33 (3H, m, OcCin), 7.47 (2H, t, J = 7.7 Hz, OcCin), 7.60 (3H, t, J = 7.4 Hz, OBz), 8.07 (2H, d, J = 8.1 Hz, OBz), Olsat [2.91 (3H, d, J = 4.9 Hz), 6.63 (1H, t, J = 7.6 Hz), 6.66 (1H, d, J = 8.7 Hz), 7.69 (1H, m), 8.18 (1H, d, J = 8.5 Hz)].</p> <p>RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 19.7 (c, C-15), 20.8 (c, OAc), 23.0 (t, C-2), 23.6 (c, C-14), 26.2 (c, C-13), 30.2 (c, C-12), 38.7 (t, C-3), 49.9 (s, C-10), 53.5 (d, C-7), 68.7 (d, C-8), 70.7 (s, C-5), 72.2 (d, C-1), 72.4 (d, C-9), 78.0 (d, C-6), 84.7 (s, C-11), 91.1 (s, C-5), 118.6 (d, OcCin), 128.0 (2 × d, OcCin), 128.3 (2 × d, OBz), 129.2 (d, OcCin), 129.4 (s, OBz), 129.9 (2 × d, OBz), 130.2 (2 × d, OcCin), 133.3 (d, OBz), 134.6 (s, OcCin), 145.0 (d, OcCin), 164.1 (s, OcCin), 165.6 (s, OBz), 170.0 (s, OAc), Olsat [29.5 (c), 109.3 (s), 110.8 (d), 114.9 (d), 132.8 (d), 135.1 (d), 152.1 (s), 167.6 (s)].</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IE) m/z (%): 711 [M⁺] (100), 574 (2), 560 (1), 413 (3), 238 (3), 151 (12), 134 (56), 131 (54), 105 (65), 77 (11), 57 (5).</p> <p>EMAR (IE) m/z: Calculado para C₄₁H₄₅NO₁₀ [M⁺]: 711.3043, observado 711.3032.</p>

Preparación de los derivados 67a y 68a



A una disolución de **A17** (7.1 mg, 0.012 mmol) en 0.2 mL de tolueno seco bajo atmósfera de argón y a temperatura ambiente, se le añadió 2,6-lutidina (0.2 mL, 1.717 mmol), DMAP (5.0 mg, 0.041 mmol), DCC (19.4 mg, 0.094 mmol) y ácido pirazincarboxílico (10.9 mg, 0.088 mmol). La mezcla se calentó a 110 °C con agitación durante 94 h. Trascurrido ese tiempo y tras observar mediante CCF que la reacción no había evolucionado suficientemente, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se añadió 0.3 mL de CH₂Cl₂ seco, DCC (10.2 mg, 0.049 mmol), ácido pirazincarboxílico (22.3 mg, 0.180 mmol) y DMAP (5.1 mg, 0.042 mmol) y se agitó durante 26 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se filtró y se lavó con de HCl (0.5 M, 10 mL) y disolución saturada de NaHCO₃ (10 mL). La fase orgánica se secó sobre MgSO₄ anhidro, se filtró y se llevó a sequedad en el rotavapor. El residuo fue purificado mediante CCFP utilizando como fase móvil hexanos–AcOEt (3:2). Se obtuvieron 0.8 mg de producto **67a** (9.5% de rendimiento) y 0.4 mg de producto minoritario **68a** (4.8% de rendimiento) como sólidos amorfos.

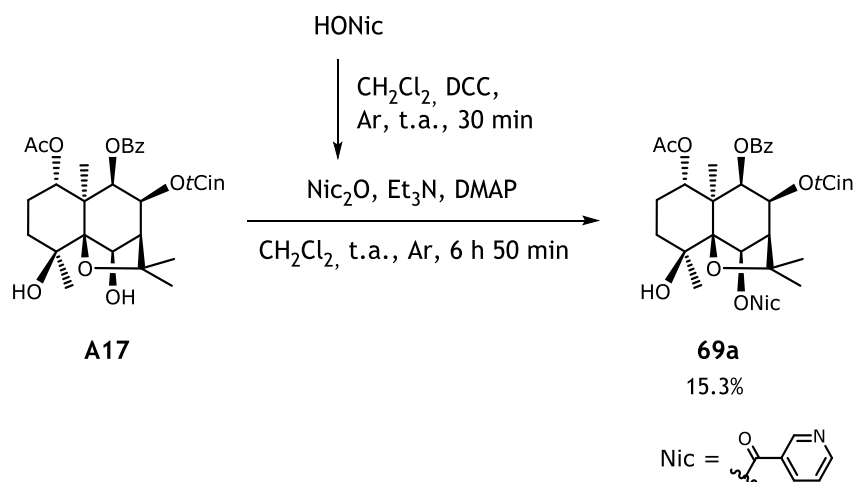
Derivado 67a

Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo incoloro (0.8 mg).</p> <p>$[\alpha]_D^{20}$: -18.1° (c 0.08, CHCl₃).</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 1.39 (3H, s, Me-14), 1.45 (1H, m, H-2α), 1.52 (3H, s, Me-15), 1.58 (3H, s, Me-12), 1.69 (3H, s, OAc), 1.72 (1H, td, J = 3.3, 13.6 Hz, H-3α), 1.76 (3H, s, Me-13), 2.00 (2H, m, H-2β, H-3β), 2.77 (1H, d, J = 3.3 Hz, H-7), 3.39 (1H, s_A, OH-4), 5.45 (1H, dd, J = 4.3, 12.4 Hz, H-1), 5.51 (1H, d, J = 6.3 Hz, H-9), 5.80 (1H, s, H-6), 5.83 (1H, dd, J = 3.3, 6.3 Hz, H-8), 6.23 (1H, d, J = 16.0 Hz, OtCin), 7.24 (2H, d, J = 7.4 Hz, OtCin), 7.31 (2H, t, J = 7.8 Hz, OtCin), 7.35 (1H, t, J = 7.0 Hz, OtCin), 7.42 (1H, d, J = 16.0 Hz, OtCin), 7.45 (2H, t, J = 7.9 Hz, OBz), 7.60 (1H, t, J = 6.7 Hz, OBz), 8.08 (2H, d, J = 7.3 Hz, OBz), OPir [8.77 (1H, s), 8.82 (1H, s), 9.53 (1H, s)].</p> <p>RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 19.6 (c, C-15), 20.8 (c, OAc), 23.7 (t, C-2), 24.9 (c, C-14), 26.6 (c, C-13), 30.4 (c, C-12), 37.6 (t, C-3), 50.0 (s, C-10), 53.7 (d, C-7), 69.0 (d, C-8), 70.9 (s, C-4), 72.2 (d, C-1), 72.3 (d, C-9), 79.5 (d, C-6), 84.6 (s, C-11), 91.2 (s, C-5), 117.0 (d, OtCin), 128.2 (2 × d, OtCin), 128.4 (2 × d, OtCin), 128.7 (2 × d, OBz), 129.3 (s, OBz), 130.3 (2 × d, OBz), 130.5 (d, OtCin), 133.4 (d, OBz), 134.0 (s, OtCin), 145.8 (d, OtCin), 164.9 (s, OtCin), 165.5 (s, OBz), 169.9 (s, OAc), OPir [142.7 (d), 144.8 (d), 146.9 (s), 148.2 (d), 162.5 (s)].</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IES) <i>m/z</i> (%): 707 [M + Na]⁺ (100).</p> <p>EMAR (IES) <i>m/z</i>: Calculado para C₃₈H₄₀N₂O₁₀Na [M + Na]⁺: 707.2581, observado 707.2571.</p>

Derivado 68a

Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo incoloro (0.4 mg).</p> <p>$[\alpha]_D^{20}$: -12.5° (c 0.02, CHCl₃).</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 1.37 (3H, s, Me-14), 1.47* (1H, H-2α), 1.48 (3H, s, Me-13), 1.50 (3H, s, Me-15), 1.54 (3H, s, Me-12), 1.67 (3H, s, OAc), 1.70* (1H, H-3α), 1.97 (1H, m, H-2β), 2.00 (1H, m, H-3β), 2.61 (1H, d, J = 3.0 Hz, H-7), 5.39 (1H, dd, J = 4.2, 12.1 Hz, H-1), 5.46 (1H, d, J = 6.0 Hz, H-9), 5.70 (1H, d, J = 12.5 Hz, OcCin), 5.73 (1H, s, H-6), 5.75 (1H, dd, J = 3.0, 6.0 Hz, H-8), 6.91 (1H, d, J = 12.5 Hz, OcCin), 7.34 (3H, m, OcCin), 7.46 (2H, m, OcCin), 7.59 (3H, m, OBz), 8.08 (2H, d, J = 7.6 Hz, OBz), OPir [8.76 (1H, s), 8.82 (1H, s), 9.53 (1H, s)]. * señal solapada.</p> <p>RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 19.6 (c, C-15), 20.8 (c, OAc), 22.7 (t, C-2), 24.9 (c, C-14), 26.3 (c, C-13), 30.3 (c, C-12), 37.6 (t, C-3), 49.9 (s, C-10), 53.6 (d, C-7), 68.7 (d, C-8), 70.9 (s, C-4), 72.2 (d, C-1), 72.3 (d, C-9), 79.6 (d, C-6), 84.7 (s, C-11), 91.2 (s, C-5), 118.4 (d, OcCin), 128.1 (2 × d, OcCin), 128.4 (2 × d, OBz), 128.8 (d, OcCin), 129.2 (s, OBz), 129.9 (2 × d, OBz), 130.2 (2 × d, OcCin), 133.5 (d, OBz), 134.6 (s, OcCin), 145.2 (d, OcCin), 164.1 (s, OcCin), 165.5 (s, OBz), 169.8 (s, OAc), OPir [142.7 (d), 144.8 (d), 146.9 (s), 148.2 (d), 162.5 (s)].</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IES) m/z (%): 707 [M + Na]⁺ (100).</p> <p>EMAR (IES) m/z: Calculado para C₃₈H₄₀N₂O₁₀Na [M + Na]⁺: 707.2581, observado 707.2580.</p>

Preparación del derivado 69a

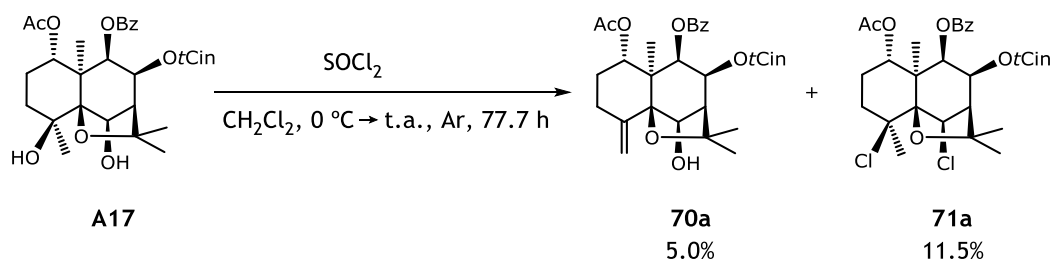


A una disolución de ácido nicotínico (15.3 mg, 0.123 mmol) en 0.1 mL de CH₂Cl₂ seco, se le añadió DCC (15.2 mg, 0.074 mmol) y se agitó durante 30 min a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón. Trascurrido este tiempo, la mezcla se adicionó a una disolución previamente preparada de **A17** (7.2 mg, 0.012 mmol) y DMAP (5.0 mg, 0.041 mmol) en Et₃N (0.1 mL, 0.717 mmol), bajo atmósfera de argón a temperatura ambiente. Se dejó agitar durante 6 h 50 min, tras lo cual se paró la reacción diluyendo con CH₂Cl₂, se filtró y se llevó a sequedad a presión reducida. Se fraccionó mediante CC de exclusión molecular de Sephadex LH-20, usando como fase móvil una mezcla de CHCl₃-MeOH (1:1). El producto se purificó mediante CCF preparativa, eluyendo hexanos-AcOEt (9:11). Así, se obtuvo el producto **69a** como un sólido amorfo (1.3 mg, 15.3% de rendimiento).

Derivado 69a

Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo incoloro (1.3 mg).</p> <p>$[\alpha]_D^{20}$: -53.5° (c 0.25, CHCl₃).</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 1.36 (3H, s, Me-14), 1.50* (1H, H-2α), 1.51 (3H, s, Me-15), 1.57 (3H, s, Me-12), 1.69 (3H, s, OAc), 1.75 (3H, s, Me-13), 1.76 (1H, m, H-3α), 1.96 (2H, m, H-2β, H-3β), 2.74 (1H, d, J = 3.2 Hz, H-7), 3.00 (1H, s_A, OH-4), 5.41 (1H, dd, J = 4.2, 11.9 Hz, H-1), 5.50 (1H, d, J = 6.1 Hz, H-9), 5.74 (1H, s, H-6), 5.83 (1H, dd, J = 3.2, 6.1 Hz, H-8), 6.22 (1H, d, J = 16.1 Hz, OtCin), 7.26* (2H, OtCin), 7.31 (2H, t, J = 7.9 Hz, OtCin), 7.35 (1H, t, J = 7.6 Hz, OtCin), 7.41 (1H, d, J = 16.1 Hz, OtCin), 7.46 (2H, t, J = 7.8 Hz, OBz), 7.60 (1H, t, J = 7.6 Hz, OBz), 8.07 (2H, d, J = 7.8 Hz, OBz), ONic [7.43 (1H, dd, J = 5.2, 8.1 Hz), 8.49 (1H, td, J = 1.8, 8.0 Hz), 8.81 (1H, dd, J = 1.6, 4.6 Hz), 9.38 (1H, d, J = 1.7)]. * señal solapada.</p> <p>RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 19.6 (c, C-15), 20.8 (c, OAc), 23.3 (t, C-2), 23.9 (c, C-14), 26.5 (c, C-13), 30.4 (c, C-12), 38.7 (t, C-3), 49.9 (s, C-10), 53.7 (d, C-7), 69.0 (d, C-8), 70.7 (s, C-4), 72.1 (d, C-1), 72.2 (d, C-9), 78.5 (d, C-6), 84.7 (s, C-11), 91.3 (s, C-5), 117.0 (d, OtCin), 128.1 (2 × d, OtCin), 128.4 (2 × d, OtCin), 128.7 (2 × d, OBz), 129.3 (s, OBz), 130.2 (2 × d, OBz), 130.5 (d, OtCin), 133.4 (d, OBz), 134.0 (s, OtCin), 145.8 (d, OtCin), 164.9 (s, OtCin), 165.5 (s, OBz), 169.9 (s, OAc), ONic [123.6 (d), 125.6 (s), 137.6 (d), 151.6 (d), 153.9 (d), 164.5 (s)].</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IES) m/z (%): 706 [M + Na]⁺ (100).</p> <p>EMAR (IES) m/z: Calculado para C₃₉H₄₁NO₁₀Na [M + Na]⁺: 706.2628, observado 706.2632.</p>

Preparación de los derivados 70a y 71a



A una disolución de **A17** (16.4 mg, 0.028 mmol) en 10 mL de CH₂Cl₂ seco, a 0 °C y bajo atmósfera de argón, se le añadió cloruro de tionilo (40 µL, 0.21 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 77 h 30 min, se añadieron 10 mL de CH₂Cl₂ y la mezcla se vertió sobre agua-hielo. La fase orgánica se lavó, sucesivamente, con 10 mL de HCl al 5% y 20 mL de disolución saturada de NaHCO₃. Posteriormente, se secó sobre MgSO₄ anhidro, se filtró y se concentró a vacío. El residuo se purificó mediante CCFP usando como fase móvil diferentes mezclas de hexanos-AcOEt (4:1, 7:3 y 3:2), CH₂Cl₂-acetona (19:1), hexanos-CH₂Cl₂ (3:7). Así, se obtuvieron 0.8 mg del compuesto **70a** (5.0% de rendimiento) y 2.0 mg del compuesto **71a** (11.5% de rendimiento) como sólidos amorfos.

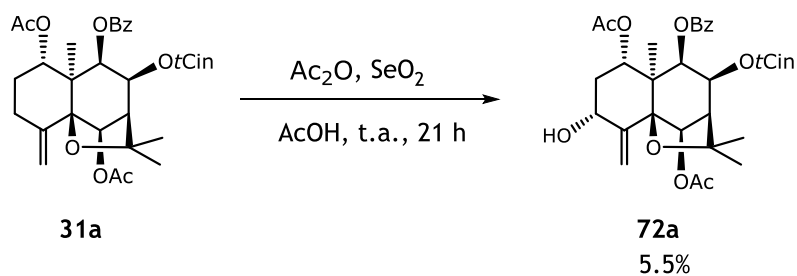
Derivado 70a

Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo incoloro (0.8 mg).</p> <p>$[\alpha]_D^{20}$: -30.0° (c 0.09, CHCl₃).</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 1.25* (3H, Me-15), 1.38 (1H, m, H-2α), 1.55 (3H, s, Me-12), 1.61 (3H, s, OAc), 1.74 (3H, s, Me-13), 2.17 (2H, m, H-2β, H-3α), 2.55 (1H, d, J = 2.9 Hz, H-7), 2.72 (1H, dt, J = 4.0, 12.5 Hz, H-3β), 4.52 (1H, d, J = 4.0 Hz, H-6), 5.17 (1H, s, H-14), 5.31 (1H, s, H-14), 5.53 (1H, d, J = 7.0 Hz, H-9), 5.60 (1H, dd, J = 2.9, 7.0 Hz, H-8), 5.64 (1H, dd, J = 4.2, 11.4 Hz, H-1), 6.20 (1H, d, J = 16.1 Hz, OtCin), 7.16 (2H, d, J = 7.5 Hz, OtCin), 7.28 (2H, t, J = 7.5 Hz, OtCin), 7.30 (1H, d, J = 16.1 Hz, OtCin), 7.33 (1H, t, J = 6.1 Hz, OtCin), 7.45 (2H, t, J = 7.6 Hz, OBz), 7.60 (1H, t, J = 7.3 Hz, OBz), 8.09 (2H, d, J = 7.7 Hz, OBz). * señal solapada</p> <p>RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 19.5 (c, C-15), 20.8 (c, OAc), 22.7 (t, C-2), 27.3 (c, C-13), 31.8 (t, C-3), 32.4 (c, C-12), 50.0 (s, C-10), 54.9 (d, C-7), 69.5 (d, C-8), 70.9 (d, C-1), 72.8 (d, C-9), 76.5 (d, C-6), 83.0 (s, C-11), 90.5 (s, C-5), 113.0 (t, C-14), 117.3 (d, OtCin), 128.1 (2 × d, OtCin), 128.4 (2 × d, OtCin), 128.7 (2 × d, OBz), 129.3 (s, OBz), 130.3 (2 × d, OBz), 130.4 (d, OtCin), 133.4 (d, OBz), 134.0 (s, OtCin), 144.2 (s, C-4), 145.5 (d, OtCin), 165.1 (s, OtCin), 165.6 (s, OBz), 170.0 (s, OAc).</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IE) m/z (%): 545 [M - CH₃]⁺ (19), 500 (1), 412 (1), 248 (2), 207 (4), 131 (61), 105 (100), 83 (13), 77 (16), 71 (14), 69 (12), 57 (29).</p> <p>EMAR (IE) m/z: Calculado para C₃₂H₃₃O₈ [M - CH₃]⁺: 545.2175, observado 545.2162.</p>

Derivado 71a

Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo incoloro (2.0 mg).</p> <p>$[\alpha]_D^{20}$: +2.7° (c 0.11, CHCl₃).</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 1.48 (3H, s, Me-15), 1.55* (1H, H-2α), 1.56* (3H, Me-12), 1.62 (3H, s, OAc), 1.74 (1H, d_A, J = 12.9 Hz, H-3α), 1.81 (3H, s, Me-13), 2.04 (3H, s, Me-14), 2.20 (1H, m, H-2β), 2.36 (1H, dt, J = 4.2, 13.6 Hz, H-3β), 2.82 (1H, d_A, J = 2.6 Hz, H-7), 5.11 (1H, s, H-6), 5.47 (1H, d, J = 6.9 Hz, H-9), 5.52 (1H, dd, J = 2.6, 6.9 Hz, H-8), 5.65 (1H, dd, J = 4.9, 11.9 Hz, H-1), 6.21 (1H, d, J = 16.1 Hz, OtCin), 7.22 (2H, d, J = 7.7 Hz, OtCin), 7.30 (2H, t, J = 7.5 Hz, OtCin), 7.35 (1H, t, J = 7.2 Hz, OtCin), 7.38 (1H, d, J = 16.1 Hz, OtCin), 7.47 (2H, t, J = 7.6 Hz, OBz), 7.62 (1H, t, J = 7.4 Hz, OBz), 8.07 (2H, d, J = 7.7 Hz, OBz). * señal solapada</p> <p>RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 20.5 (c, C-15), 20.6 (c, OAc), 22.9 (t, C-2), 27.5 (c, C-14), 28.2 (c, C-13), 30.4 (c, C-12), 32.4 (t, C-3), 49.0 (s, C-10), 54.2 (d, C-7), 68.7 (d, C-8), 71.5 (d, C-1), 73.1 (d, C-9), 80.9 (s, C-4), 81.2 (d, C-6), 83.8 (s, C-5), 83.9 (s, C-11), 116.8 (d, OtCin), 128.2 (2 × d, OtCin), 128.5 (2 × d, OtCin), 128.8 (2 × d, OBz), 128.9 (s, OBz), 130.3 (2 × d, OBz), 130.6 (d, OtCin), 133.6 (d, OBz), 133.8 (s, OtCin), 146.0 (d, OtCin), 164.9 (s, OtCin), 165.3 (s, OBz), 169.8 (s, OAc).</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IE) m/z (%): 603 [M + 4 - CH₃]⁺ (6), 601 [M + 2 - CH₃]⁺ (34), 599 [M - CH₃]⁺ (8), 500 (11), 412 (2), 369 (6), 247 (7), 202 (4), 131 (99), 105 (100), 83 (10), 77 (17), 57 (3).</p> <p>EMAR (IE) m/z: Calculado para C₃₂H₃₃³⁵Cl₂O₇ [M - CH₃]⁺: 599.1603, observado 599.1598, para C₃₂H₃₃³⁵Cl³⁷ClO₇ [M + 2 - CH₃]⁺: calculado 601.1574, observado 601.1568 y para C₃₂H₃₃³⁷Cl₂O₇ [M + 4 - CH₃]⁺: calculado 603.1544, observado 603.1536.</p>

Preparación del derivado 72a

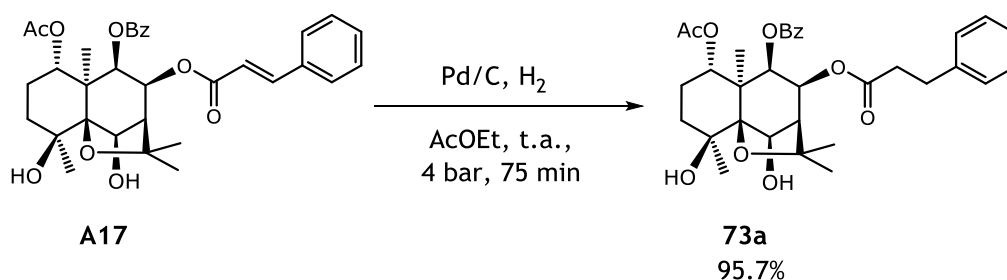


A una disolución de **31a** (5.3 mg, 0.009 mmol) en 1 mL de ácido acético glacial a temperatura ambiente, se le añadió SeO_2 (1.0 mg, 0.009 mmol) y anhídrido acético (0.3 mL, 3.031 mmol). La mezcla se agitó durante 21 h y se siguió mediante CCF. Al cabo de ese tiempo, se diluyó con AcOEt y vertió en agua-hielo. Se filtró y se lavó con AcOEt (6 mL). Las fases orgánicas reunidas se lavaron con agua, se secaron sobre MgSO_4 anhidro y, posteriormente, se eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo fue purificado mediante CCF preparativa con una hexanos-AcOEt (3:2, 7:3), obteniéndose 0.3 mg de producto **72a** como un sólido amorfo (5.5% de rendimiento).

Derivado 72a

Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo incoloro (0.3 mg).</p> <p>$[\alpha]_D^{20}$: -45.0° (c 0.08, CHCl₃).</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ: 1.27 (3H, s, Me-15), 1.52 (3H, s, Me-12), 1.55* (1H, H-2α), 1.64 (3H, s, OAc-1), 1.78 (3H, s, Me-13), 2.14 (3H, s, OAc-6), 2.46 (1H, ddd, J = 2.9, 5.0, 13.2 Hz, H-2β), 2.57 (1H, d, J = 3.3 Hz, H-7), 4.32 (1H, td, J = 2.9, 9.4 Hz, H-3β), 4.53 (1H, d, J = 9.4 Hz, OH-3), 5.04 (1H, s, H-14), 5.35 (1H, s, H-14), 5.52 (1H, s, H-6), 5.61 (1H, d, J = 6.8 Hz, H-9), 5.76 (1H, dd, J = 3.3, 6.8 Hz, H-8), 5.91 (1H, dd, J = 5.0, 12.3 Hz, H-1), 6.19 (1H, d, J = 16.1 Hz, OtCin), 7.19 (2H, d, J = 7.8 Hz, OtCin), 7.29 (2H, t, J = 7.7 Hz, OtCin), 7.33 (1H, d, J = 16.1 Hz, OtCin), 7.34 (1H, t, J = 7.4 Hz, OtCin), 7.44 (2H, t, J = 7.9 Hz, OBz), 7.60 (1H, t, J = 7.2 Hz, OBz), 8.04 (2H, d, J = 8.0 Hz, OBz). * señal solapada.</p> <p>RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 18.9 (c, C-15), 20.7 (c, OAc-1), 21.3 (c, OAc-6), 26.9 (c, C-13), 31.7 (c, C-12), 35.5 (t, C-2), 50.4 (s, C-10), 52.2 (d, C-7), 68.7 (d, C-8), 68.8 (d, C-1), 70.3 (d, C-9), 74.9 (d, C-3), 77.1* (d, C-6), 85.5 (s, C-11), 90.3 (s, C-5), 116.5 (t, C-14), 117.0 (d, OtCin), 128.1 (2 × d, OtCin), 128.5 (2 × d, OtCin), 128.7 (2 × d, OBz), 129.1 (s, OBz), 130.3 (2 × d, OBz), 130.5 (d, OtCin), 133.5 (d, OBz), 133.9 (s, OtCin), 140.3 (s, C-4), 145.8 (d, OtCin), 164.7 (s, OtCin), 165.5 (s, OBz), 169.4 (s, OAc-1), 169.5 (s, OAc-6). * señal solapada.</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IES) m/z (%): 641 [M + Na]⁺ (100).</p> <p>EMAR (IES) m/z: Calculado para C₃₅H₃₈O₁₀Na [M + Na]⁺: 641.2363, observado 641.2349.</p>

Preparación del derivado 73a

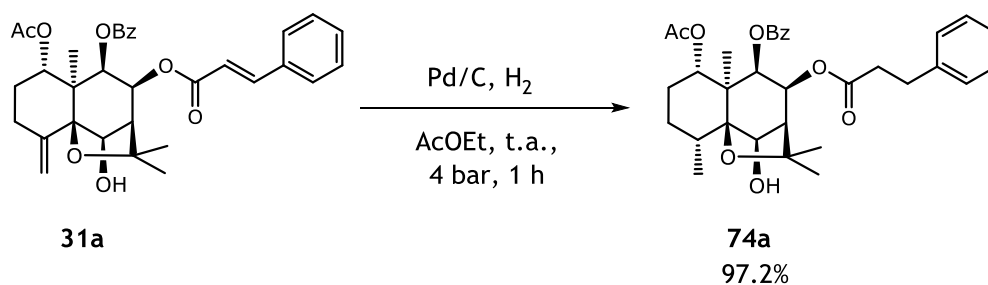


A una disolución de **A17** (5.1 mg, 0.009 mmol) en 0.4 mL de AcOEt a temperatura ambiente, se le añadió una cantidad catalítica de paladio sobre carbón activo (10%). Se colocó en el *Hydrogenation Apparatus* y se agitó en atmósfera de H₂ (4 bar) durante 75 min. La suspensión se filtró sobre celita y se llevó a sequedad a presión reducida. El residuo se purificó mediante CCFP eluyendo con una mezcla de hexanos–AcOEt (3:2), rindiendo el producto **73a** como un sólido amorfo (4.9 mg, 95.7% de rendimiento).

Derivado 73a

Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo incoloro (4.9 mg).</p> <p>$[\alpha]_D^{20}$: -39.7° (c 0.33, CHCl₃).</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 1.39 (3H, s, Me-14), 1.47 (1H, m, H-2α), 1.54 (3H, s, Me-15), 1.58 (3H, s, Me-12), 1.60 (3H, s, Me-13), 1.63 (3H, s, OAc), 1.69 (1H, td, <i>J</i> = 3.3, 13.2 Hz, H-3α), 1.90 (1H, dt, <i>J</i> = 3.8, 14.0 Hz, H-3β), 1.97 (1H, m, H-2β), 2.40 (1H, d, <i>J</i> = 3.0 Hz, H-7), 3.19 (1H, s, OH-4), 4.46 (1H, d, <i>J</i> = 5.5 Hz, H-6), 5.09 (1H, d, <i>J</i> = 5.5 Hz, OH-6), 5.31 (1H, d, <i>J</i> = 6.5 Hz, H-9), 5.34 (1H, dd, <i>J</i> = 4.2, 12.0 Hz, H-1), 5.45 (1H, dd, <i>J</i> = 3.0, 6.5 Hz, H-8), 7.46 (2H, t, <i>J</i> = 7.7 Hz, OBz), 7.59 (1H, t, <i>J</i> = 7.4 Hz, OBz), 8.06 (2H, d, <i>J</i> = 7.6 Hz, OBz), Ph(CH₂)₂COO [2.45 (2H, m), 2.83 (2H, m), 7.07 (2H, d, <i>J</i> = 7.4 Hz), 7.17 (1H, t, <i>J</i> = 7.3 Hz), 7.24 (2H, t, <i>J</i> = 7.7 Hz)].</p> <p>RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 19.7 (c, C-15), 20.7 (c, OAc), 23.1 (t, C-2), 23.7 (c, C-14), 27.1 (c, C-13), 30.7 (c, C-12), 37.1 (t, C-3), 48.8 (s, C-10), 55.0 (d, C-7), 69.3 (d, C-8), 72.1 (s, C-4), 72.3 (d, C-1), 73.0 (d, C-9), 78.3 (d, C-6), 84.7 (s, C-11), 91.1 (s, C-5), 128.5 (2 × d, OBz), 129.1 (s, OBz), 130.2 (2 × d, OBz), 133.5 (d, OBz), 165.7 (s, OBz), 169.9 (s, OAc), Ph(CH₂)₂COO [30.6 (t), 35.8 (t), 126.3 (d), 128.2 (2 × d), 128.4 (2 × d), 140.3 (s), 171.3 (s)].</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IES) <i>m/z</i> (%): 603 [M + Na]⁺ (100).</p> <p>EMAR (IES) <i>m/z</i>: Calculado para C₃₃H₄₀O₉Na [M + Na]⁺: 603.2570, observado 603.2572.</p>

Preparación del derivado 74a

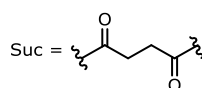
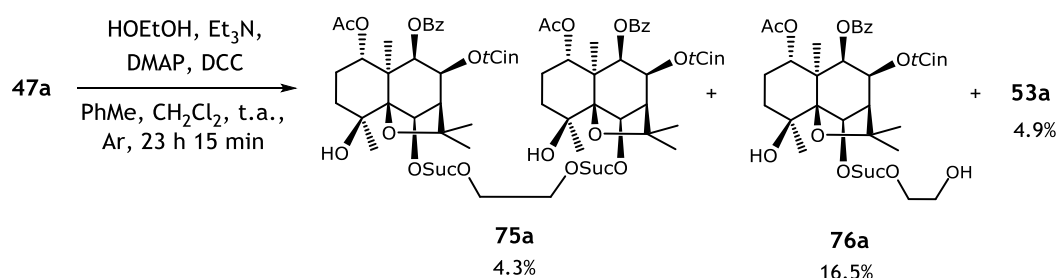


A una disolución de **31a** (4.2 mg, 0.007 mmol) en 0.5 mL de AcOEt a temperatura ambiente, se le añadió una cantidad catalítica de paladio sobre carbón (10%) y se colocó en el *Hydrogenation apparatus*. Se agitó bajo atmósfera de hidrógeno (4 bar) durante 1 h, tras lo cual se filtró sobre celita y, posteriormente, se eliminó el disolvente a vacío. El residuo se purificó mediante CCFP de gel de sílice usando como eluyente hexanos–AcOEt (3:2), obteniéndose el producto **74a** como un sólido amorfo (4.1 mg, 97.2% de rendimiento).

Derivado 74a

Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo incoloro (4.1 mg).</p> <p>$[\alpha]_D^{20}$: -48.7° (c 0.25, CHCl₃).</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 0.99 (3H, d, <i>J</i> = 7.5 Hz, Me-14), 1.37 (3H, s, Me-15), 1.38 (3H, s, Me-12), 1.44 (1H, d_A, <i>J</i> = 14.8 Hz, H-2α), 1.49 (3H, s, Me-13), 1.63* (1H, H-3α), 1.65 (3H, s, OAc-1), 1.87 (1H, m, H-2β), 2.12 (3H, s, OAc-6), 2.19 (1H, m, H-3β), 2.26 (1H, m, H-4β (ROE1D)), 2.41 (1H, d, <i>J</i> = 3.0 Hz, H-7), 5.31 (1H, d, <i>J</i> = 6.3 Hz, H-9), 5.33 (1H, s, H-6), 5.44 (1H, dd, <i>J</i> = 4.3, 12.0 Hz, H-1), 5.59 (1H, dd, <i>J</i> = 3.0, 6.3 Hz, H-8), 7.45 (2H, t, <i>J</i> = 7.7 Hz, OBz), 7.57 (1H, t, <i>J</i> = 7.5 Hz, OBz), 8.08 (2H, d, <i>J</i> = 7.3 Hz, OBz), Ph(CH₂)₂COO [2.44 (2H, dt, <i>J</i> = 1.4, 8.0 Hz), 2.82 (2H, t, <i>J</i> = 8.0 Hz), 7.06 (2H, d, <i>J</i> = 7.3 Hz), 7.16 (1H, t, <i>J</i> = 7.3 Hz), 7.23 (2H, t, <i>J</i> = 7.5 Hz)].</p> <p style="text-align: right;">* señal solapada.</p> <p>RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 17.3 (c, C-14), 18.7 (c, C-15), 20.8 (c, OAc-1), 21.2 (c, OAc-6), 21.4 (t, C-2), 26.6 (c, C-13), 26.7 (d, C-4), 31.2 (c, C-12), 33.9 (t, C-3), 48.9 (s, C-10), 53.6 (d, C-7), 69.3 (d, C-8), 72.6 (d, C-9), 73.3 (d, C-1), 77.3 (d, C-6), 82.8 (s, C-11), 89.7 (s, C-5), 128.4 (2 × d, OBz), 129.3 (s, OBz), 130.2 (2 × d, OBz), 133.4 (d, OBz), 165.8 (s, OBz), 169.7 (s, OAc-6), 169.9 (s, OAc-1), Ph(CH₂)₂COO [30.6 (t), 35.7 (t), 126.2 (d), 128.2 (2 × d), 128.3 (2 × d), 140.3 (s), 171.1 (s)].</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IES) <i>m/z</i> (%): 629 [M + Na]⁺ (100).</p> <p>EMAR (IES) <i>m/z</i>: Calculado para C₃₅H₄₂O₉Na [M + Na]⁺: 629.2727, observado 629.2736.</p>

Preparación de los derivados **75a** y **76a**



A una disolución de **47a** (7.8 mg, 0.011 mmol), Et₃N (10 μL, 0.072 mmol), DMAP (5.7 mg, 0.047 mmol) y DCC (5.3 mg, 0.026 mmol) en 0.2 mL de tolueno seco, bajo atmósfera de argón y a temperatura ambiente, se le añadió 40 μL de una disolución de 7 μL de etilenglicol en 1 mL de CH₂Cl₂ seco (0.005 mmol), se agitó durante 23 h 15 min. Transcurrido ese tiempo, la mezcla se diluyó con CH₂Cl₂ y se lavó con disolución saturada de NaHCO₃ (10 mL) y disolución saturada de NaCl (10 mL). La fase orgánica se secó sobre MgSO₄ anhidro, se filtró y se llevó a sequedad en el rotavapor. El crudo se purificó mediante CCF preparativa de gel de sílice eluyendo con hexanos–AcOEt (4:1 y 2:3), obteniéndose el dímero **75a** (0.7 mg 4.3% de rendimiento), el monómero **76a** (1.4 mg, 16.5% de rendimiento), y el análogo **53a** (0.5 mg, 4.9% de rendimiento) como sólidos amorfos.

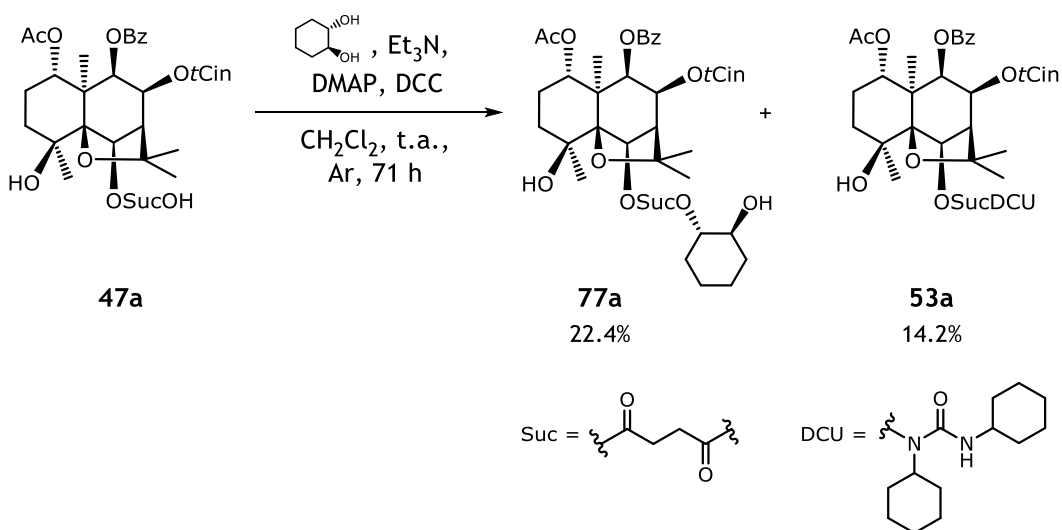
Derivado 75a

Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo incoloro (0.7 mg).</p> <p>$[\alpha]_D^{20}$: -26.9° (c 0.04, CHCl₃).</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: Sesquiterpeno × 2 [1.33 (3H, s, 2 × Me-14), 1.46 (3H, s, 2 × Me-15), 1.47* (1H, 2 × H-2α), 1.56 (3H, s, 2 × Me-12), 1.67 (3H, s, 2 × Ac), 1.70* (1H, 2 × H-3α), 1.71 (3H, s, 2 × Me-13), 1.91 (2H, m, 2 × H-2β, 2 × H-3β), 2.55 (1H, d, J = 2.9 Hz, 2 × H-7), 2.84 (1H, s, 2 × OH-4), 5.36 (1H, dd, J = 4.0, 12.4 Hz, 2 × H-1), 5.44 (1H, d, J = 6.4 Hz, 2 × H-9), 5.59 (1H, s, 2 × H-6), 5.71 (1H, dd, J = 2.9, 6.4 Hz, 2 × H-8), 6.20 (1H, d, J = 16.0 Hz, 2 × tCin), 7.24 (2H, d, J = 7.4 Hz, 2 × tCin), 7.30 (2H, t, J = 7.8 Hz, 2 × tCin), 7.34 (1H, t, J = 7.2 Hz, 2 × tCin), 7.38 (1H, d, J = 16.0 Hz, 2 × tCin), 7.44 (2H, t, J = 7.8 Hz, 2 × Bz), 7.59 (1H, t, J = 7.3 Hz, 2 × Bz), 8.05 (2H, d, J = 7.7 Hz, 2 × Bz), OSucCO₂CH₂- × 2 [2.71 (4H, m), 4.29, 4.31 (2H, d_{AB}, J = 13.9 Hz]. * señal solapada.</p> <p>RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 19.6 (c, C-15), 20.8 (c, OAc), 23.3 (t, C-2), 23.9 (c, C-14), 26.5 (c, C-13), 30.3 (c, C-12), 38.5 (t, C-3), 49.9 (s, C-10), 53.8 (d, C-7), 69.0 (d, C-8), 70.5 (s, C-4), 72.2 (d, C-1), 72.3 (d, C-9), 77.8 (d, C-6), 84.6 (s, C-11), 91.4 (s, C-5), 117.1 (d, OtCin), 128.1 (2 × d, OtCin), 128.4 (2 × d, OtCin), 128.7 (2 × d, OBz), 129.4 (s, OBz), 130.2 (2 × d, OBz), 130.4 (d, OtCin), 133.3 (d, OBz), 134.0 (s, OtCin), 145.6 (d, OtCin), 164.9 (s, OtCin), 165.5 (s, OBz), 169.9 (s, OAc), OSucCO₂CH₂- × 2 [28.6 (t), 29.5 (t), 62.4 (t), 171.3 (s), 171.9 (s)].</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IES) m/z (%): 1405 [M + Na]⁺ (100).</p> <p>EMAR (IES) m/z: Calculado para C₇₆H₈₆O₂₄Na [M + Na]⁺: 1405.5407, observado 1405.5393.</p>

Derivado 76a

Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo incoloro (1.4 mg).</p> <p>$[\alpha]_D^{20}$: -52.8° (c 0.14, CHCl₃).</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 1.32 (3H, s, Me-14), 1.46 (3H, s, Me-15), 1.48* (1H, H-2α), 1.56 (3H, s, Me-12), 1.67 (3H, s, OAc), 1.69* (1H, H-3α), 1.71 (3H, s, Me-13), 1.91 (2H, m, 2β, H-3β), 2.35 (1H, d, J = 3.0 Hz, H-7), 2.88 (1H, s, OH-4), 5.36 (1H, dd, J = 3.3, 12.4 Hz, H-1), 5.44 (1H, d, J = 6.4 Hz, H-9), 5.61 (1H, s, H-6), 5.70 (1H, dd, J = 3.0, 6.4 Hz, H-8), 6.20 (1H, d, J = 16.0 Hz, OtCin), 7.24 (2H, d, J = 7.7 Hz, OtCin), 7.30 (2H, t, J = 7.4 Hz, OtCin), 7.34 (1H, t, J = 7.4 Hz, OtCin), 7.38 (1H, d, J = 16.0 Hz, OtCin), 7.45 (2H, t, J = 7.6 Hz, OBz), 7.59 (1H, t, J = 7.3 Hz, OBz), 8.05 (2H, d, J = 7.7 Hz, OBz), OSucCO₂(CH₂)₂OH [2.73 (4H, m), 3.84 (2H, m), 4.20 (1H, td, J = 4.3, 11.9 Hz), 4.29 (1H, td, J = 4.3, 11.9 Hz). * señal solapada.</p> <p>RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 19.6 (c, C-15), 20.8 (c, OAc), 23.3 (t, C-2), 23.8 (c, C-14), 26.5 (c, C-13), 30.3 (c, C-12), 38.4 (t, C-3), 49.9 (s, C-10), 53.8 (d, C-7), 69.1 (d, C-8), 70.6 (s, C-4), 72.1 (d, C-1), 72.2 (d, C-9), 77.8 (d, C-6), 84.7 (s, C-11), 91.4 (s, C-5), 117.1 (d, OtCin), 128.1 (2 × d, OtCin), 128.4 (2 × d, OtCin), 128.7 (2 × d, OBz), 129.3 (s, OBz), 130.2 (2 × d, OBz), 130.4 (d, OtCin), 133.4 (d, OBz), 134.0 (s, OtCin), 145.7 (d, OtCin), 164.9 (s, OtCin), 165.5 (s, OBz), 169.9 (s, OAc), OSucCO₂(CH₂)₂OH [28.7 (t), 29.7 (t), 61.0 (t), 66.5 (t), 171.2 (s), 172.3 (s)].</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IES) m/z (%): 745 [M + Na]⁺ (100).</p> <p>EMAR (IES) m/z: Calculado para C₃₉H₄₆O₁₃Na [M + Na]⁺: 745.2836, observado 745.2815.</p>

Preparación del derivado 77a

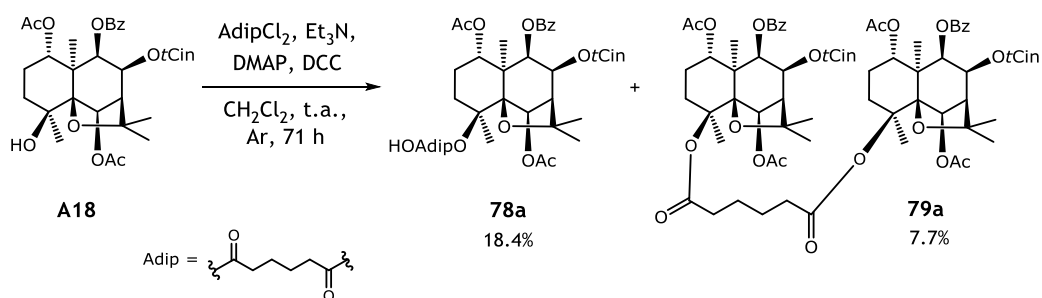


A una disolución de **47a** (7.0 mg, 0.010 mmol) en 0.1 mL de CH_2Cl_2 seco, bajo atmósfera de argón a temperatura ambiente, se le añadió Et_3N (10 μL , 0.072 mmol), DMAP (10.0 mg, 0.082 mmol), DCC (2.2 mg, 0.011 mmol) y 1*S*,2*S*-*trans*-ciclohexandiol (0.7 mg, 0.006 mmol). La reacción se agitó durante 71 h y se siguió mediante CCF. Transcurrido ese tiempo, la reacción se paró añadiendo 0.1 mL de EtOH y dejando agitar durante 30 min. Posteriormente, se lavó con HCl 1 M (10 mL), disolución saturada de NaHCO_3 (10 mL) y disolución saturada de NaCl (10 mL). La fase orgánica se secó sobre MgSO_4 anhidro, se filtró y se llevó a sequedad a vacío. El crudo fue purificado mediante CCFP utilizando como eluyente diferentes mezclas de hexanos-AcOEt (3:2 y 2:3). Así, se obtuvieron los productos **77a** (1.8 mg, 22.4% de rendimiento) y **53a** (1.3 mg, 14.2% de rendimiento) como sólidos amorfos.

Derivado 77a

Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo incoloro (1.8 mg).</p> <p>$[\alpha]_D^{20}$: -40.1° (c 0.15, CHCl₃).</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 1.30 (3H, s, Me-14), 1.46 (3H, s, Me-15), 1.47* (1H, H-2α), 1.56 (3H, s, Me-12), 1.67 (3H, s, OAc), 1.70* (1H, H-3α), 1.71 (3H, s, Me-13), 1.90 (1H, m, H-3β), 1.91 (1H, m, H-2β), 2.53 (1H, d, J = 3.1 Hz, H-7), 3.15 (1H, s_A, OH-4), 5.35 (1H, dd, J = 4.0, 12.2 Hz, H-1), 5.44 (1H, d, J = 6.4 Hz, H-9), 5.62 (1H, s, H-6), 5.69 (1H, dd, J = 3.1, 6.4 Hz, H-8), 6.20 (1H, d, J = 16.1 Hz, OtCin), 7.24 (2H, d, J = 7.7 Hz, OtCin), 7.30 (2H, t, J = 7.3 Hz, OtCin), 7.34 (1H, t, J = 7.0 Hz, OtCin), 7.38 (1H, d, J = 16.1 Hz, OtCin), 7.44 (2H, t, J = 7.6 Hz, OBz), 7.59 (1H, t, J = 7.7 Hz, OBz), 8.05 (2H, d, J = 7.8 Hz, OBz), OSucOC₆H₁₀OH [1.14 (1H, m), 1.28 (1H, m), 1.29 (1H, m), 1.33 (1H, m), 1.60 (1H, m), 1.70 (1H, m), 2.00 (1H, m), 2.05 (1H, m), 2.61 (1H, m), 2.67 (1H, m), 2.82 (1H, m), 2.87 (1H, m), 3.57 (1H, m), 4.02 (1H, d_A, J = 5.8 Hz), 4.64 (1H, m)].</p> <p style="text-align: right;">* señal solapada.</p> <p>RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 19.7 (c, C-15), 20.8 (c, OAc), 23.3 (t, C-2), 23.6 (c, C-14), 26.6 (c, C-13), 30.4 (c, C-12), 38.2 (t, C-3), 49.9 (s, C-10), 53.8 (d, C-7), 69.0 (d, C-8), 70.8 (s, C-4), 72.1 (d, C-1), 72.2 (d, C-9), 77.6 (d, C-6), 84.6 (s, C-11), 91.4 (s, C-5), 117.1 (d, OtCin), 128.1 (2 × d, OtCin), 128.4 (2 × d, OtCin), 128.7 (2 × d, OBz), 129.3 (s, OBz), 130.2 (2 × d, OBz), 130.4 (d, OtCin), 133.4 (d, OBz), 134.0 (s, OtCin), 145.7 (d, OtCin), 164.9 (s, OtCin), 165.5 (s, OBz), 169.9 (s, OAc), OSucOC₆H₁₀OH [23.8 (t), 25.6 (t), 29.0 (t), 29.7 (t), 30.1 (t), 32.8 (t), 72.4 (d), 78.8 (d), 170.9 (s), 172.0 (s)].</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IES) m/z (%): 799 [M + Na]⁺ (100).</p> <p>EMAR (IES) m/z: Calculado para C₄₃H₅₂O₁₃Na [M + Na]⁺: 799.3306, observado 799.3304.</p>

Preparación de los derivados 78a y 79a



A 10.4 mg de ZnO (0.128 mmol) y 2 μ L de cloruro de adipoilo (0.014 mmol), tras 3 min de ultrasonido, se le añadió, a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón, una disolución previamente preparada de **A18** (6.6 mg, 0.011 mmol) en 0.2 mL de CH₂Cl₂. Tras una sonicada de 5 min, se diluyó con CH₂Cl₂, se le añadió 0.1 mL de EtOH y, posteriormente, se eliminó el disolvente a vacío. El crudo se purificó mediante CCFP usando como eluyente hexanos–AcOEt (2:3), obteniéndose los derivados **78a** (1.5 mg, 18.4% de rendimiento) y **79a** (1.1 mg, 7.7% de rendimiento) como sólidos amorfos.

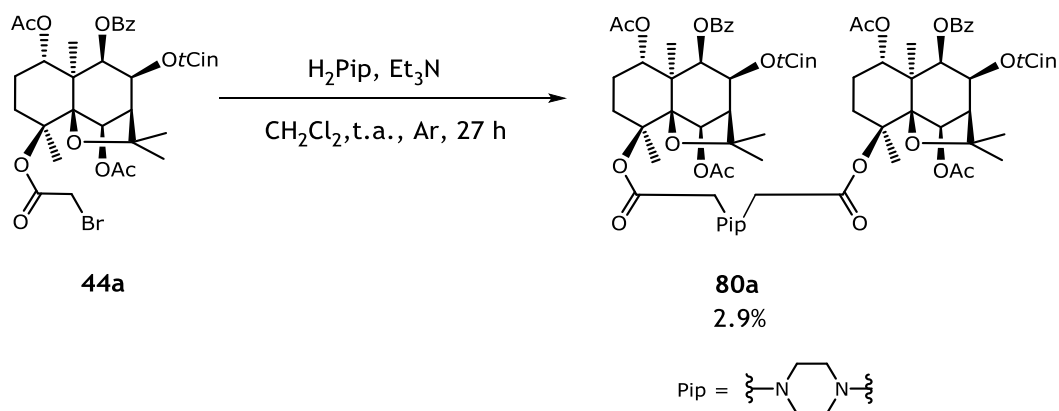
Derivado 78a

Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo incoloro (1.5 mg).</p> <p>$[\alpha]_D^{20}$: -47.3° (c 0.13, CHCl₃)</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 1.49* (1H, H-2α), 1.50 (3H, s, Me-15), 1.57 (3H, s, Me-12), 1.67 (6H, s, OAc-1, Me-14), 1.70 (3H, s, Me-13), 2.00 (1H, m, H-2β), 2.09 (1H, m, H-3β), 2.10 (3H, s, OAc-6), 2.54 (1H, d, J = 3.2 Hz, H-7), 2.86 (1H, td, J = 3.3, 13.5 Hz, H-3α), 5.45 (1H, d, J = 6.4 Hz, H-9), 5.47 (1H, dd, J = 4.2, 12.0 Hz, H-1), 5.59 (1H, s, H-6), 5.69 (1H, dd, J = 3.2, 6.4 Hz, H-8), 6.21 (1H, d, J = 16.0 Hz, OtCin), 7.23 (2H, d, J = 7.4 Hz, OtCin), 7.30 (2H, t, J = 7.5 Hz, OtCin), 7.34 (1H, d, J = 7.2 Hz, OtCin), 7.38 (1H, d, J = 16.0 Hz, OtCin), 7.43 (2H, t, J = 7.9 Hz, OBz), 7.58 (1H, t, J = 7.0 Hz, OBz), 8.07 (2H, d, J = 7.6 Hz, OtCin), OAdip [1.53-1.73* (4H), 2.27 (1H, m), 2.39 (3H, m)]. * señal solapada.</p> <p>RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 19.7 (c, C-15), 20.7 (c, OAc-1), 21.4 (c, OAc-6), 22.7 (t, C-2), 24.3 (c, C-14), 26.5 (c, C-13), 29.9 (c, C-12), 31.9 (t, C-3), 51.0 (s, C-10), 53.7 (d, C-7), 69.2 (d, C-8), 71.9 (d, C-1), 72.9 (d, C-9), 77.6 (d, C-6), 81.9 (s, C-4), 84.6 (s, C-11), 90.6 (s, C-5), 117.1 (d, OtCin), 128.1 (2 × d, OtCin), 128.4 (2 × d, OtCin), 128.7 (2 × d, OBz), 129.3 (s, OBz), 130.3 (2 × d, OBz), 130.4 (d, OtCin), 133.3 (d, OBz), 134.0 (s, OtCin), 145.6 (d, OtCin), 164.9 (s, OtCin), 165.5 (s, OBz), 169.6 (s, OAc-6), 169.8 (s, OAc-1), OAdip [21.4 (t), 24.2 (t), 33.2 (t), 35.3 (t), 171.9 (s), 176.2 (s)].</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IES) m/z (%): 771 [M + Na]⁺ (100).</p> <p>EMAR (IES) m/z: Calculado para C₄₁H₄₈O₁₃Na [M + Na]⁺: 771.2993, observado 771.2971.</p>

Derivado 79a

Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo incoloro (1.1 mg).</p> <p>$[\alpha]_D^{20}$: -58.6° (c 0.11, CHCl₃)</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: Sesquiterpeno × 2 [1.49* (1H, H-2α), 1.51 (3H, s, Me-15), 1.59 (3H, s, Me-12), 1.66 (3H, s, OAc-1), 1.67 (3H, s, Me-14), 1.71 (3H, s, Me-13), 2.00 (1H, m, H-2β), 2.08 (1H, m, H-3β), 2.12 (3H, s, OAc-6), 2.55 (1H, d, J = 3.1 Hz, H-7), 2.87 (1H, d_A, J = 13.4 Hz, H-3α), 5.45 (1H, d, J = 6.5 Hz, H-9), 5.48 (1H, dd, J = 4.2, 12.0 Hz, H-1), 5.59 (1H, s, H-6), 5.69 (1H, dd, J = 3.1, 6.5 Hz, H-8), 6.20 (1H, d, J = 16.0 Hz, OtCin), 7.23 (2H, d, J = 7.5 Hz, OtCin), 7.29 (2H, t, J = 7.3 Hz, OtCin), 7.33 (1H, d, J = 7.0 Hz, OtCin), 7.38 (1H, d, J = 16.0 Hz, OtCin), 7.43 (2H, t, J = 7.6 Hz, OBz), 7.58 (1H, t, J = 7.8 Hz, OBz), 8.07 (2H, d, J = 7.6 Hz, OBz)], OAdip [1.63-1.71* (4H), 2.28 (2H, m), 2.39 (2H, m)]. * señal solapada.</p> <p>RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: Sesquiterpeno [19.7 (c, C-15), 20.7 (c, OAc-1), 21.4 (c, OAc-6), 21.5 (c, C-14), 22.8 (t, C-2), 26.5 (c, C-13), 30.0 (c, C-12), 32.0 (t, C-3), 51.0 (s, C-10), 53.7 (d, C-7), 69.2 (d, C-8), 71.9 (d, C-1), 72.9 (d, C-9), 77.6 (d, C-6), 81.9 (s, C-4), 84.6 (s, C-11), 90.6 (s, C-5), 117.1 (d, OtCin), 128.1 (2 × d, OtCin), 128.4 (2 × d, OtCin), 128.7 (2 × d, OBz), 129.3 (s, OBz), 130.3 (2 × d, OBz), 130.4 (d, OtCin), 133.4 (d, OBz), 134.0 (s, OtCin), 145.6 (d, OtCin), 164.9 (s, OtCin), 165.6 (s, OBz), 169.6 (s, OAc-6), 169.8 (s, OAc-1), OAdip × ½ [24.5 (t), 35.4 (t), 171.9 (s)].</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IES) m/z (%): 1373 [M + Na]⁺ (100).</p> <p>EMAR (IES) m/z: Calculado para C₇₆H₈₆O₂₂Na [M + Na]⁺: 1373.5508, observado 1373.5474.</p>

Preparación del derivado 80a

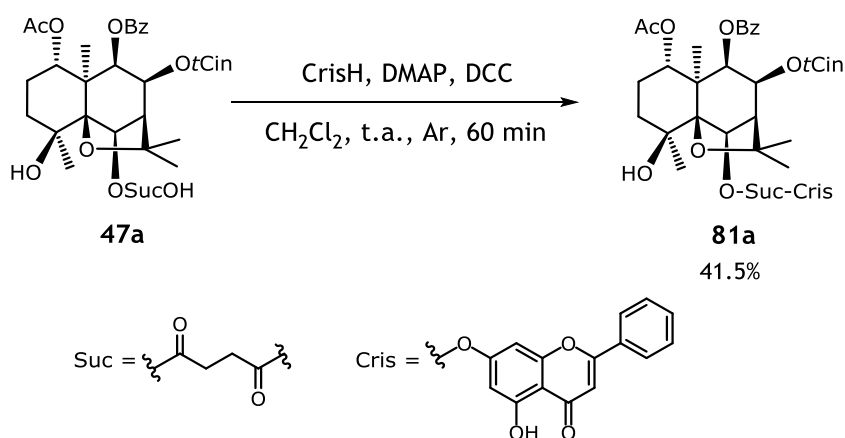


A una disolución de **44a** (5.4 mg, 0.007 mmol) en 0.1 mL de CH_2Cl_2 seco, se le añadió, a temperatura ambiente y bajo atmósfera de argón, Et_3N (10 μL , 0.072 mmol) y piperazina (0.4 mg, 0.003 mmol). La mezcla se agitó durante 27 h y se siguió el desarrollo de la reacción mediante CCF. Pasado ese tiempo, se diluyó con CH_2Cl_2 , se lavó con HCl (1 M, 10 mL), disolución saturada de NaHCO_3 (10 mL) y disolución saturada de NaCl (10 mL). La fase orgánica se secó sobre MgSO_4 anhidro, se filtró y se llevó a sequedad a presión reducida. El residuo fue purificado mediante CCFP, utilizando como fase móvil CH_2Cl_2 - MeOH (99:1). Así, se obtuvieron 0.3 mg de producto **80a** como un sólido amorfo (2.9% de rendimiento).

Derivado 80a

Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo incoloro (0.3 mg).</p> <p>$[\alpha]_D^{20}$: -25.5° (c 0.09, CHCl₃).</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: Sesquiterpeno × 2 [1.47* (1H, H-2α), 1.50 (3H, s, Me-15), 1.56* (3H, Me-12), 1.66 (3H, s, OAc-1), 1.69 (3H, s, Me-14), 1.71 (3H, s, Me-13), 2.00 (1H, m, H-2β), 2.09 (3H, s, OAc-6), 2.11 (1H, m, H-3β), 2.54 (1H, d, J = 3.2 Hz, H-7), 2.88 (1H, td, J = 3.3, 13.2 Hz, H-3α), 5.45 (1H, d, J = 6.4 Hz, H-9), 5.47 (1H, dd, J = 4.3, 11.9 Hz, H-1), 5.59 (1H, s, H-6), 5.68 (1H, dd, J = 3.2, 6.4 Hz, H-8), 6.21 (1H, d, J = 16.0 Hz, OtCin), 7.24 (2H, d, J = 7.2 Hz, OtCin), 7.30 (2H, t, J = 7.1 Hz, OtCin), 7.34 (1H, t, J = 7.2 Hz, OtCin), 7.38 (1H, d, J = 16.0 Hz, OtCin), 7.43 (2H, t, J = 7.5 Hz, OBz), 7.59 (1H, t, J = 7.5 Hz, OBz), 8.06 (2H, d, J = 7.6 Hz, OBz), -(CH₂)₂NCH₂COO × 2 [2.67 (4H, s_A), 3.09, 3.25 (2H, d_{AB}, J = 16.7 Hz)].</p> <p style="text-align: right;">* señal solapada.</p> <p>RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 19.7 (c, C-15), 20.7 (c, OAc-1), 21.4 (2 × c, OAc-6, C-14), 22.8 (t, C-2), 26.5 (c, C-13), 30.1 (c, C-12), 32.0 (t, C-3), 51.0 (s, C-10), 53.6 (d, C-7), 69.2 (d, C-8), 71.8 (d, C-1), 72.9 (d, C-9), 77.6 (d, C-6), 82.5 (s, C-4), 84.7 (s, C-11), 90.6 (s, C-5), 117.1 (d, OtCin), 128.1 (2 × d, OtCin), 128.4 (2 × d, OtCin), 128.7 (2 × d, OBz), 129.3 (s, OBz), 130.3 (2 × d, OBz), 130.5 (d, OtCin), 133.4 (d, OBz), 134.0 (s, OtCin), 145.7 (d, OtCin), 164.9 (s, OtCin), 165.6 (s, OBz), 169.4 (s, OAc-6), 169.8 (s, OAc-1), -(CH₂)₂NCH₂COO × 2 [53.0 (2 × t), 60.2 (t), 168.5 (s)].</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IES) m/z (%): 1429 [M + Na]⁺ (100).</p> <p>EMAR (IES) m/z: Calculado para C₇₈H₉₀N₂O₂₂Na [M + Na]⁺: 1429.5883, observado 1429.5846.</p>

Preparación del derivado **81a**

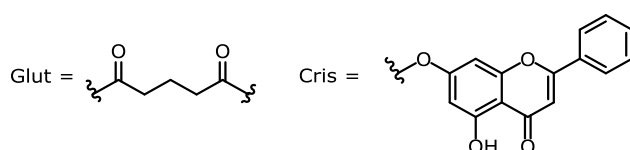
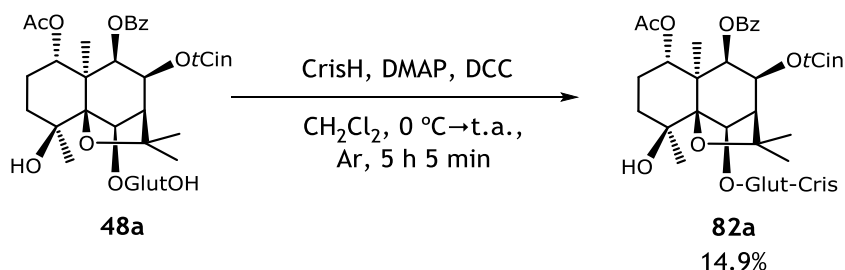


A una disolución de **47a** (6.8 mg, 0.010 mmol) en 1 mL de CH_2Cl_2 seco, se le añadió, a temperatura ambiente y bajo atmósfera de argón, DMAP (9.8 mg, 0.080 mmol), crisina (18.8 mg, 0.074 mmol) y DCC (15.5 mg, 0.075 mmol). La mezcla se agitó durante 60 min. Pasado dicho tiempo, se añadió 0.5 mL de acetona. La mezcla se agitó durante 110 min, tras lo cual se evaporó el disolvente a presión reducida. El residuo fue fraccionado mediante CC de gel de sílice usando como eluyente con un gradiente de CH_2Cl_2 -acetona de polaridad creciente y posterior purificación mediante CCFP con una fase móvil de hexanos-AcOEt-HOAc (55:45:1), lo que rindió el dímero **81a** como un sólido amorfo (3.8 mg, 41.5% de rendimiento).

Derivado 81a

Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo amarillento (3.8 mg).</p> <p>$[\alpha]_D^{20}$: -43.0° (c 0.08, CHCl₃).</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ: 1.35 (3H, s, Me-14), 1.48 (3H, s, Me-15), 1.50* (1H, H-2α), 1.58* (3H, Me-12), 1.68 (3H, s, OAc), 1.72 (3H, s, Me-13), 1.73* (1H, H-3α), 1.93 (2H, m, H-2β, H-3β), 2.57 (1H, d, J = 3.0 Hz, H-7), 2.86 (1H, s, OH-4), 5.37 (1H, dd, J = 4.3, 12.1 Hz, H-1), 5.46 (1H, d, J = 6.4 Hz, H-9), 5.64 (1H, s, H-6), 5.73 (1H, dd, J = 3.0, 6.4 Hz, H-8), 6.19 (1H, d, J = 16.0 Hz, OtCin), 7.22 (2H, d, J = 7.6 Hz, OtCin), 7.32 (3H, m, OtCin), 7.37 (1H, d, J = 16.0 Hz, OtCin), 7.44 (2H, t, J = 7.8 Hz, OBz), 7.56 (1H, m, OBz), 8.05 (2H, d, J = 7.8 Hz, OBz), OSuc [2.83 (2H, m), 2.98 (2H, m)], OCris [6.60 (1H, d, J = 2.0 Hz), 6.73 (1H, s), 6.90 (1H, d, J = 2.0 Hz), 7.56 (3H, m), 7.90 (2H, dd, J = 1.3, 7.7 Hz), 12.73 (1H, s)]. * señal solapada.</p> <p>RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 19.6 (c, C-15), 20.7 (c, OAc), 23.3 (t, C-2), 23.9 (c, C-14), 26.5 (c, C-13), 30.3 (c, C-12), 38.5 (t, C-3), 49.9 (s, C-10), 53.8 (d, C-7), 69.0 (d, C-8), 70.5 (s, C-4), 72.1 (d, C-1), 72.2 (d, C-9), 78.0 (d, C-6), 84.7 (s, C-11), 91.4 (s, C-5), 117.1 (d, OtCin), 128.1 (2 × d, OtCin), 128.4 (2 × d, OtCin), 128.7 (2 × d, OBz), 129.3 (s, OBz), 130.2 (2 × d, OBz), 130.4 (d, OtCin), 133.4 (d, OBz), 133.9 (s, OtCin), 145.7 (d, OtCin), 164.9 (s, OtCin), 165.5 (s, OBz), 169.9 (s, OAc), OSuc [29.0 (t), 29.4 (t), 169.9 (s), 171.0 (s)], OCris [101.0 (d), 105.4 (d), 106.1 (d), 108.9 (s), 126.4 (2 × d), 129.2 (2 × d), 130.9 (s), 132.2 (d), 155.8 (s), 156.7 (s), 161.9 (s), 164.7 (s), 182.9 (s)].</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IES) <i>m/z</i> (%): 937 [M + Na]⁺ (100).</p> <p>EMAR (IES) <i>m/z</i>: Calculado para C₅₂H₅₀O₁₅Na [M + Na]⁺: 937.3047, observado 937.3021.</p>

Preparación del derivado **82a**



A una disolución de **48a** (5.5 mg, 0.008 mmol) en 0.7 mL de CH_2Cl_2 seco se le añadió, bajo atmósfera de argón, DMAP (10.9 mg, 0.09 mmol), DCC (2.7 mg, 0.01 mmol) y crisina (3.6 mg, 0.01 mmol). La mezcla se agitó durante 5 min a 0 °C y durante 3 h y a temperatura ambiente. Se diluyó con 1 mL de CH_2Cl_2 , se filtró sobre gel de sílice fina en una pipeta Pasteur y se lavó con CH_2Cl_2 (2 mL) y hexanos-AcOEt-HOAc (40:60:1, 5 mL). Se eliminó el disolvente a vacío y el crudo se purificó mediante HPLC, usando una fase móvil de hexanos-AcOEt (3:2) (columna semipreparativa, flujo de 1 mL/min, $\lambda_{\text{detector}}$ 254 nm, r_t 18.5 min, volumen inyectado 400 μL). Se obtuvo el producto **82a** (1.1 mg, 14.9% de rendimiento) como un sólido amorfo.

Derivado 82a

Datos físicos y espectroscópicos	<p>Se obtuvo como un sólido amorfo amarillento (1.1 mg).</p> <p>$[\alpha]_D^{20}$: -17.0° (c 0.15, CHCl₃).</p>
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ: 1.36 (3H, s, Me-14), 1.49 (3H, s, Me-15), 1.50* (1H, H-2α), 1.59 (3H, s, Me-12), 1.68 (3H, s, OAc), 1.72* (1H, H-3α), 1.73 (3H, s, Me-13), 1.94 (2H, m, H-2β, H-3β), 2.56 (1H, s_A, H-7), 2.85 (1H, s_A, OH-4), 5.38 (1H, dd, J = 3.6, 12.0 Hz, H-1), 5.46 (1H, d, J = 6.4 Hz, H-9), 5.66 (1H, s, H-6), 5.73 (1H, dd, J = 3.3, 6.4 Hz, H-8), 6.21 (1H, d, J = 16.0 Hz, OtCin), 7.24 (2H, d, J = 7.7 Hz, OtCin), 7.30 (2H, t, J = 7.4 Hz, OtCin), 7.33 (1H, t, J = 7.7 Hz, OtCin), 7.39 (1H, d, J = 16.0 Hz, OtCin), 7.45 (2H, t, J = 7.9 Hz, OBz), 7.56 (1H, m, OBz), 8.06 (2H, dd, J = 1.0, 8.3 Hz, OBz), OGlut [2.16 (2H, m), 2.58 (2H, t, J = 7.7 Hz), 2.72 (2H, t, J = 7.3 Hz)], OCris [6.58 (1H, d, J = 2.0 Hz), 6.73 (1H, s), 6.88 (1H, d, J = 2.0 Hz), 7.56 (3H, m), 7.90 (2H, dd, J = 1.3, 7.9 Hz), 12.72 (1H, s)].</p> <p style="text-align: right;">* señal solapada.</p> <p>RMN ¹³C (CDCl₃, 600 MHz) δ: 19.5 (c, C-15), 20.8 (c, OAc), 23.3 (t, C-2), 24.0 (c, C-14), 26.5 (c, C-13), 30.3 (c, C-12), 38.5 (t, C-3), 50.0 (s, C-10), 53.9 (d, C-7), 69.1 (d, C-8), 70.5 (s, C-4), 72.2 (2 × d, C-1, C-9), 77.5 (d, C-6), 84.7 (s, C-11), 91.5 (s, C-5), 117.1 (d, OtCin), 128.2 (2 × d, OtCin), 128.4 (2 × d, OtCin), 128.8 (2 × d, OBz), 129.3 (s, OBz), 130.2 (2 × d, OBz), 130.5 (d, OtCin), 133.4 (d, OBz), 134.0 (s, OtCin), 145.7 (d, OtCin), 164.9 (s, OtCin), 165.5 (s, OBz), 169.9 (s, OAc), OGlut [19.6 (t), 33.3 (t), 33.6 (t), 170.4 (s), 171.8 (s)], OCris [101.1 (d), 105.5 (d), 106.2 (d), 109.0 (s), 126.4 (2 × d), 129.2 (2 × d), 130.9 (s), 132.2 (d), 155.8 (s), 156.8 (s), 161.9 (s), 164.8 (s), 182.9 (d)].</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IE) m/z (%): 928 [M⁺] (13), 848 (39), 746 (22), 732 (30), 714 (100), 676 (45), 662 (41), 579 (49), 545 (94).</p> <p>EM (IES) m/z (%): 951 [M + Na]⁺ (100).</p> <p>EMAR (IES) m/z: Calculado para C₅₃H₅₂O₁₅Na [M + Na]⁺: 951.3204, observado 951.3187.</p>

3.4 | ACTIVIDAD REVERTIDORA

de la multirresistencia a fármacos en cáncer de los sesquiterpenos dihidro- β -agarofuránicos

3.4.1 | Introducción

Uno de los grandes retos a los que se enfrenta la medicina en la actualidad es la aparición de resistencia cruzada a múltiples fármacos. Este fenómeno se conoce con el término multirresistencia a fármacos (MDR) y se puede desarrollar durante el tratamiento de casi cualquier enfermedad infecciosa, incluyendo virales^{46,47}, bacterianas⁵², parasitarias^{48,49,50} o cáncer^{45,109}.

En el año 2012, el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI), el Comité Europeo de Evaluación de la Susceptibilidad Antimicrobiana (EUCAST) y la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA), propusieron una clasificación de la terminología de resistencias en bacterias, diferenciando multirresistencia (MDR), resistencia extendida (XDR) y panresistencia (PDR)⁵². En cáncer, se define como resistente cuando éste no presenta una respuesta completa o parcial a la administración de la dosis máxima tolerada de un fármaco. Así, la MDR se entiende como la resistencia intrínseca o adquirida a diferentes fármacos simultáneamente, que difieren en estructura química, mecanismo de acción y diana molecular. Este fenómeno es la causa del fallo en el tratamiento de alrededor del 90% de los pacientes con cáncer metastásico, y la solución de este problema se presenta como una buena estrategia para incrementar la eficacia del tratamiento del cáncer^{109,110}.

Los mecanismos de resistencia, muchas veces, son complejos y dependen de diversos factores, incluyendo la activación de **transportadores transmembranas**, citocromo P450 y transferasa de glutatión^{111,112}. Los mecanismos biológicos responsables de este fenómeno se pueden clasificar en dos categorías:

¹⁰⁹ LAGE, H. (2008). An overview of cancer multidrug resistance: a still unsolved problem. *Cell. Mol. Life Sci.*, 65, 3145–3167.

¹¹⁰ LONGLEY, D. B.; JOHNSTON, P. G. (2005). Molecular mechanisms of drug resistance. *J. Pathol.*, 205(2), 275–292.

¹¹¹ GORRE, M. E.; MOHAMMED, M.; ELLWOOD, K.; HSU, N.; PAQUETTE, R.; NAGESH RAO, P.; SAWYERS, C. L. (2001). Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science*, 293, 876–880.

¹¹² WINK, M.; ASHOUR, M. L.; EL-READI, M. Z. (2012). Secondary metabolites from plants inhibit ABC transporters and reversing resistance of cancer cells and microbes to cytotoxic and antimicrobial agents. *Front. Microbiol.*, 3(130), 1–15. doi: 10.3389/fmicb.2012.00130.

- **Mecanismos farmacológicos**, implicados en la resistencia a fármacos, incluyendo la administración inadecuada de un fármaco, una baja activación metabólica en el caso de profármacos, efectos farmacocinéticos en el plasma, el entorno tumoral y la disponibilidad en el órgano de destino, por ejemplo, por no atravesar la barrera hematoencefálica¹⁰⁹.
- **Mecanismos celulares**, que pueden funcionar simultáneamente, de forma secuencial o se pueden manifestar de manera inespecífica durante el desarrollo de la resistencia en el interior de la célula cancerígena con un fenotipo resistente¹⁰⁹. Los mecanismos celulares pueden ser de dos tipos:
 - **Resistencia adquirida**, cuando la célula cancerígena se ve expuesta a dosis subletales de un fármaco anticancerígeno, lo que muchas veces viene acompañado de una resistencia cruzada a otros fármacos dando lugar al fenotipo multirresistente.
 - **Resistencia intrínseca** se debe a la presencia de proteínas o mecanismos que confieren resistencia a la célula sin previo contacto con el fármaco¹⁰⁹.

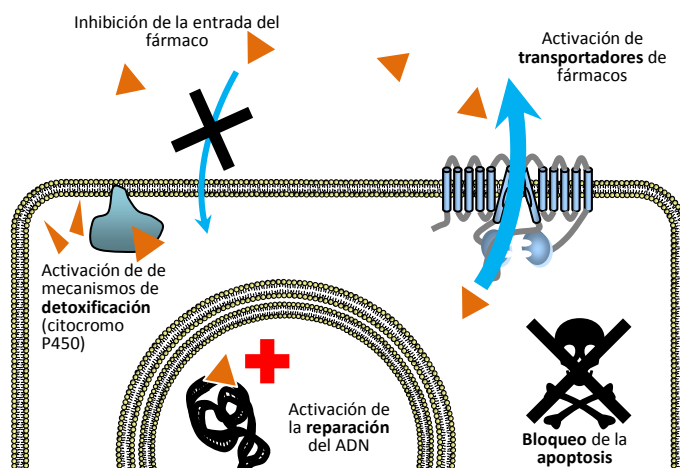


Fig. 3.99 | Mecanismos celulares de la multirresistencia a fármacos (MDR) en cáncer.

El fenotipo de la multirresistencia “clásica” es una resistencia cruzada frente a fármacos anticancerígenos, relacionados estructuralmente con los alcaloides de la “vinca”, epipodofilotoxinas, antraciclinas o taxanos y su reversión mediante el uso de derivados de verapamilo o ciclosporina A^{109,113}. Este fenómeno se debe a la sobreexpresión de los **transportadores de membrana dependientes de ATP (ABC)**

¹¹³ AMBUDKAR, S. V.; DEY, S.; HRYCYNA, C. A.; RAMACHANDRA, M., PASTAM, I, GOTTESMAN, M. M. (1999). Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu. Rev Pharmacol. Toxicol.*, 39, 361–398.

en la membrana celular, provocando una disminución de la concentración intracelular del fármaco^{112,114}. Estos transportadores se encuentran principalmente en células de tejidos de excreción o de transporte, como son el intestino, el hígado, los riñones, la placenta, el endotelio, así como la barrera hematoencefálica^{115,116}. Hoy en día, se conocen más de 100 transportadores en todos los organismos, implicados en múltiples procesos fisiológicos, como detoxificación, absorción de nutrientes, transporte de iones y péptidos, así como en la señalización celular¹¹⁷.

El primer transportador ABC descrito en eucariotas fue la glicoproteína-P¹¹⁸, también conocida como Pgp, MDR1 o ABCB1. Ésta, junto con la proteína asociada a la multirresistencia (MRP1) y la proteína de resistencia en cáncer de mama (BCRP) son los transportadores ABC más ampliamente estudiados¹¹². Así, la Pgp humana es un polipéptido dimérico de 1280 aminoácidos y 170kDa, con dos unidades transmembranas (TMD) responsables del transporte, y con dos unidades citoplasmáticas (NBD) que contienen el sitio de unión de ATP¹¹⁹ (Fig. 3.100).

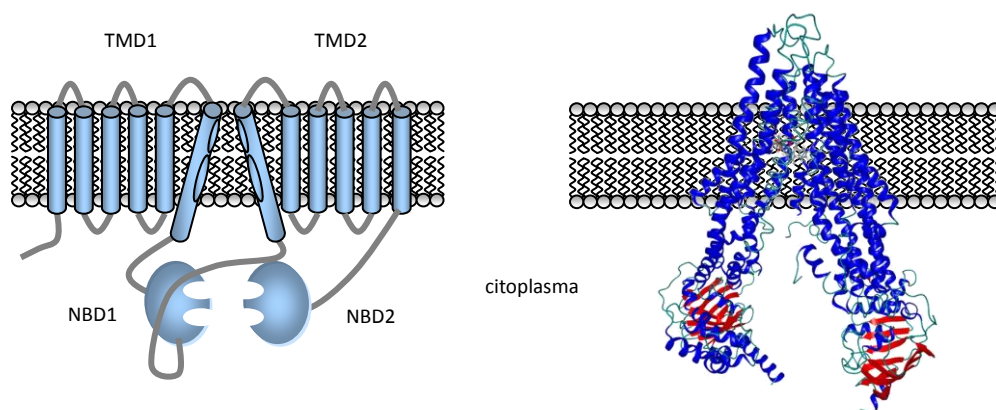


Fig. 3.100 | Esquema y estructura tridimensional de la Pgp de *Caenorhabditis elegans* (Protein database PDB, proteína 4F4c, visualización con BALLView 1.4.2).

- ¹¹⁴ GOTTESMAN, M. M.; FOJO, T. BATES, S. E. (2002). Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat. Rev. Cancer.*, 2, 48–58.
- ¹¹⁵ ROBEY, R. W.; MASSEY, P. R.; AMIRI-KORDESTANI, L.; BATES, S. (2010). ABC-Transporters: Unvalidated therapeutic targets in cancer and the CNS. *Anticancer Agents Med. Chem.*, 10, 625–633.
- ¹¹⁶ UEDA, K. (2011). ABC Proteins protect the human body and maintain optimal health. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 75(3), 401–409.
- ¹¹⁷ PALMEIRA, A.; SOUSA, E.; VASCONCELOS, M. H.; PINTO, M.; FERNANDES, M. X. (2012). Structure and ligand-based design of P-glycoprotein inhibitors: a historical perspective. *Curr. Pharm. Design.*, 18(27), 4197–4214.
- ¹¹⁸ JULIANO R. L.; LING, V. (1976). A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim. Biophys. Acta.*, 455(1), 152–162.
- ¹¹⁹ LING, V. (1997). Multidrug resistance: Molecular mechanisms and clinical relevance. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 40, 3–8.

La primera estructura tridimensional de la Pgp de ratón que coincide en un 87% con la Pgp humana, ha sido descrita por ALLER y *col.* en el 2009¹²⁰. Desde entonces, los avances en la tecnología han permitido profundizar en el mecanismo y bioquímica de esta proteína^{121,122,123}.

En cuanto al funcionamiento de la Pgp, los fármacos deben solubilizarse primero en la matriz lipídica de la membrana plasmática para, posteriormente, entrar al sitio de unión de la Pgp situado en la unidad transmembrana. Finalmente, la unión de ATP a la unidad citoplasmática y su hidrólisis produce un cambio conformacional del transportador permitiendo la salida unidireccional del sustrato hacia el intersticio (Fig. 3.101)¹²⁰. Sin embargo, los detalles del funcionamiento de este transportador están por determinar

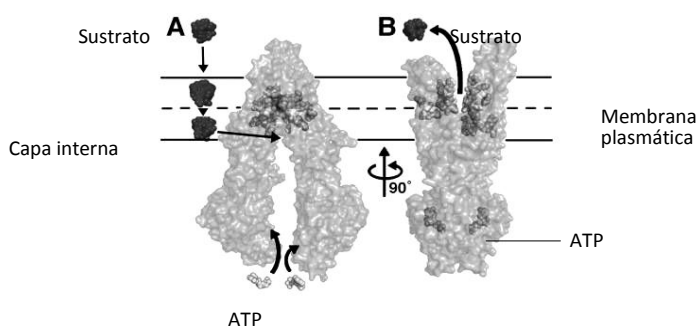


Fig. 3.101 | Mecanismo de transporte de la Pgp.

Los residuos implicados en la unión de un sustrato a la Pgp pueden variar según el sustrato, lo que explica la gran cantidad de compuestos que son transportados. Además del bolsillo hidrofóbico, donde se unen los sustratos para ser transportados, se conocen sitios de unión alostéricos de aquellos inhibidores que no son transportados^{123,124}.

La implicación de la glicoproteína-P en muchos casos de resistencia hace que ésta sea la principal diana terapéutica para el desarrollo de compuestos revertidores, implicando su coadministración con un agente anticancerígeno o bien la administración

¹²⁰ ALLER, S. G.; YU, J.; WARD, A.; WENG, Y.; CHITTABOINA, S.; ZHUO, R.; HARRELL, P. M.; TRINH, Y. T.; ZHANG, Q.; URBATSCH, I. L.; CHANG, G. (2009). Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding. *Science*, 323, 1718–1722.

¹²¹ JIN, M. S.; OLDHAM, M. L.; ZHANG, Q.; CHEN, J. (2012). Crystal structure of the multidrug transporter P-glycoprotein from *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 490(25), 566–570.

¹²² LI, J.; JAIMES, K. F.; ALLER, S. G. (2014). Refined structures of mouse P-glycoprotein. *Protein Sci.*, 23, 34–46.

¹²³ KODAN, A.; YAMAGUCHI, T.; NAKATSU, T.; SAKIYAMA, K.; HIPOLITO, C. J.; FUJIOKA, A.; HIROKANE, R.; IKEGUCHI, K.; WATANABE, B.; HIRATAKE, J.; KIMURA, Y.; SUGA, H.; UEDA, K.; KATO, H. (2014). Structural basis for gating mechanisms of a eukaryotic P-glycoprotein homolog. *PNAS*, 111(11), 4049–4054.

¹²⁴ MARTIN, C.; BERRIDGE, G.; HIGGINS, C. CHARLTON, P.; CALLAGHAN, R. (2000). MARTIN, C.; BERRIDGE, G.; HIGGINS, C. CHARLTON, P.; CALLAGHAN. *Mol. Pharmacol.*, 58(3), 624–632.

de un compuesto que reúne las propiedades de anticancerígeno e inhibidor de los transportadores de fármacos¹¹⁷.

Los agentes revertidores de la MDR, también llamados quimiosensibilizadores o quimiomoduladores, son capaces de inhibir la actividad de las bombas transportadoras y otros mecanismos de resistencia, lo que potencia la actividad citotóxica de un fármaco. La expresión simultánea de diferentes transportadores con sustratos en común, hace que un buen revertidor sea capaz de actuar frente un amplio espectro de transportadores¹¹², incrementando la concentración intracelular del fármaco para restituir la farmacosenibilidad, con una baja toxicidad intrínseca y altamente efectivo¹²⁵.

Desde la identificación del primer quimiosensibilizador en el año 1981, verapamilo⁶², se han descrito una gran cantidad de compuestos con actividad inhibidora de la Pgp¹²⁶, que se pueden resumir en:

- Arilalquilaminas (verapamilo y derivados).
- Antranilamidas, salicilamidas y compuestos relacionados (tariquidar).
- Heterociclos nitrogenados (estaurosporina y derivados, derivados del imidazol, dihidropiridinas, quinolinas e isoquinolinas, acridinas y compuestos relacionados, quinoxalinas, quinazolinas y otros derivados condensados).
- Heterociclos oxigenados (derivados piránicos, carbohidratos y glicósidos).
- Polifenoles (flavonoides, lignanos)
- Péptidos cíclicos (ciclosporina y análogos, aureobasidinas y hapalosinas).
- Macrolactonas y compuestos relacionados (biricodar VX-710).
- Esteroides y compuestos relacionados.
- Terpenoides (taxanos, triterpenos, sequiterpenos dihidro- β -agarofuranos).

Hasta la fecha, se han evaluado numerosos compuestos en estudios clínicos por su potencial revertidor de la MDR en cáncer, compuestos que se pueden clasificar en moduladores de primera, segunda y tercera generación. En la **primera generación** se evaluaron agentes con demostrada actividad inhibidora de la Pgp pero cuyo perfil farmacológico es otro, incluyendo bloqueantes de los canales de calcio, como el verapamilo, o el inmunosupresor ciclosporina A. El cambio de perfil farmacológico, las

¹²⁵ WU, C.-P.; CALCAGNO, A. M.; AMBUDKAR, S. V. (2008). Reversal of ABC drug transporter-mediated multidrug resistance in cancer cells: evaluation of current strategies. *Curr. Mol. Pharm.*, 1, 93-105

¹²⁶ AVENDAÑO, C.; MENÉNDEZ, J. C. (2004). Recent advances in multidrug resistance modulators. *Med. Chem. Rev-Online*, 1(4), 419-444.

altas concentraciones y una elevada toxicidad de estos compuestos, motivaron el desarrollo de los quimiosensibilizadores de **segunda generación**, como elacridar⁴⁵ o MM 36¹²⁷, un análogo de verapamilo. Aunque estos compuestos resultaron más específicos, más potentes y menos tóxicos que los de primera generación, presentaban como efectos adversos ser sustratos del citocromo P450, lo que condujo a su fácil eliminación y, además, la coadministración con agentes anticancerígenos presentó efectos secundarios debido a interacciones farmacocinéticas. Estos inconvenientes condujeron al desarrollo de revertidores de **tercera generación** más específicos, como son tariquidar y laniquidar. Estos compuestos se mostraron más potentes, con menos interacciones farmacocinéticas y capaces de actuar como inhibidores no-competitivos de la Pgp en un rango nanomolar. Muchos de los ensayos clínicos siguen en curso, aunque ninguno de ellos se ha convertido en un fármaco con aplicación en clínica.

Con estos antecedentes es evidente que la identificación de compuestos revertidores más específicos, potentes, no transportados y menos tóxicos para el paciente continúa siendo de alta prioridad en Salud Pública para combatir el fenómeno de la multirresistencia a fármacos en cáncer.

Recientemente, los productos naturales han sido descrito como agentes revertidores de la MDR de **cuarta generación**¹²⁸. Sus ventajas son obvias, ya que tienen una amplia diversidad estructural muchas veces unido a una baja toxicidad y una buena tolerancia en el organismo¹¹². Como ejemplos, se pueden citar: carotenoides¹²⁹, alcaloides¹³⁰, flavonoides, triterpenos¹³¹, taxanos¹³², curcuminoides¹³³ y sesquiterpenos⁶⁰ (Fig. 3.102).

¹²⁷ BISCARDI, M.; TEODORI, E.; CAPORALE, R.; BUDRIESI, R.; BALESTRI, F.; SCAPPINI, B.; GAVAZZI, S.; GROSSI, A. (2006). Multidrug reversing activity toward leukemia cells in a group of new verapamil analogues with low cardiovascular activity. *Leuk. Res.*, 20, 1–8.

¹²⁸ WU, C. P.; OHNUMA, S.; AMBUDKAR, S. V. (2011). Discovering natural product modulators to overcome multidrug resistance in cancer chemotherapy. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 12(4), 609–620.

¹²⁹ MOLNÁR, J.; SERLY, J.; PUSZTAI, R.; VINCZE, I.; MOLNÁR, P.; HORVÁTH, G.; DELI, J.; MAOKA, T.; ZALATNAI, A.; TOKUDA, H.; NISHINO, H. (2012). Putative supramolecular complexes formed by carotenoids and xanthophylls with ascorbic acid to reverse multidrug resistance in cancer cells. *Anticancer Res.*, 32, 507–518.

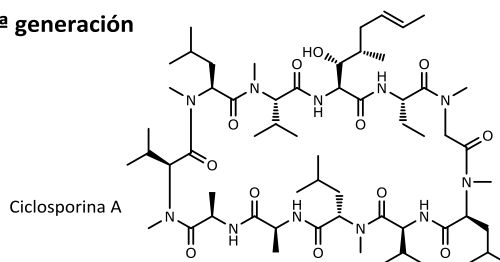
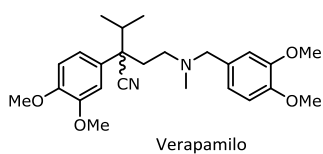
¹³⁰ MUNAGALA, S.; SIRASANI, G.; KOKKONDA, P.; PHADKE, M.; KRYNETSKAIA, N.; LU, P.; SHAROM, F. J.; CHAUDHURY, S.; ABULHAMEED, M. D. M.; TAWA, G.; WALLQVIST, A.; MARTÍNEZ, R.; CHILDERS, W.; ABOU-GHARBA, M.; KRYNETSKIY, E.; ANDRADE, R. B. (2014). Synthesis and evaluation of *Strychnos* alkaloids as MDR reversal agents for cancer cell eradication. *Bioorg. Med. Chem.*, 22, 1148–1155.

¹³¹ YAN, X.-J.; GONG, L.-H.; ZHENG, F.-Y.; CHENG, K.-J.; CHEN, Z.-S.; SHI, Z. (2013). Triterpenoids as reversal agents for anticancer drug resistances treatment. *Drug Discov. Today*, 19(4), 482–488.

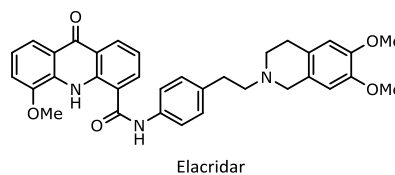
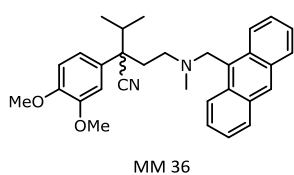
¹³² OKUMURA, H.; CHEN, Z.-S.; SAKOU, M.; SUMIZAWA, T.; FURUKAWA, T.; KOMATSU, M.; IKEDA, R.; SUZUKI, H.; HIROTA, K.; AIKOU, T.; AKIYAMA, S.-I. (2000). Reversal of P-glycoprotein and multidrug-resistance protein-mediated drug resistance in KB cells by 5-O-benzoylated Taxinine K. *Mol. Pharmacol.*, 58(6), 1563–1569.

¹³³ LU, J.; CAI, Y. J.; DING, J. (2012). Ther short-time treatment with curcumin sufficiently decreases cell viability, induces apoptosis and copper enhances these effects in multidrug-resistant K562/A02 cells. *Mol. Cell. Biochem.*, 360, 253–260.

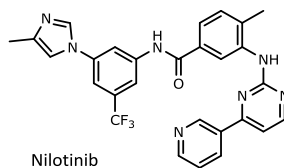
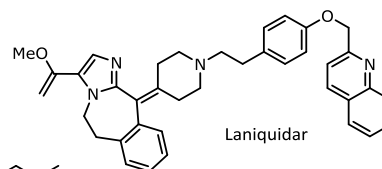
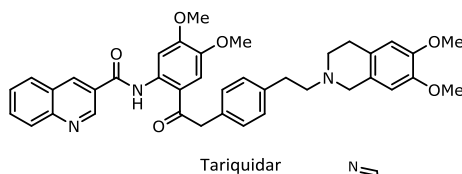
Quimiosensibilizadores, 1ª generación



Quimiosensibilizadores, 2ª generación



Quimiosensibilizadores, 3ª generación



Quimiosensibilizadores, 4ª generación

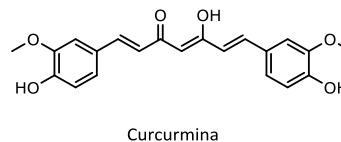
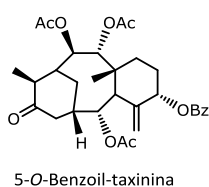
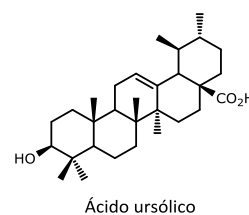
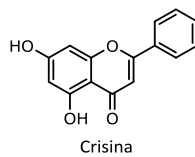
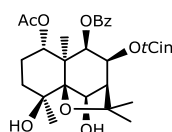
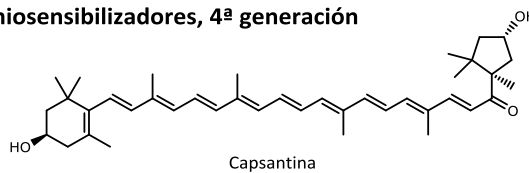
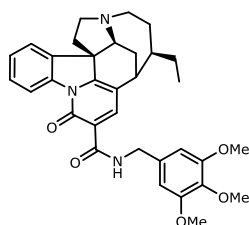


Fig. 3.102 | Compuestos con actividad revertidora de la MDR a fármacos en cáncer.

Esta amplia variedad estructural de los quimomoduladores descritos hace difícil la identificación de los sitios de unión a la Pgp, con el objetivo de realizar un cribado de potenciales inhibidores y no es posible formular ningún patrón estructural necesario de un ligando ideal. Sin embargo, existen aproximaciones basadas en el ligando, incluyendo estudios SAR, QSAR, 3D-QSAR y estudios del farmacóforo, así como modelado por homología, indican unas características que favorecen la reversión de la MDR¹¹⁷:

- La lipofilia de los moduladores de la Pgp juegan un papel fundamental en su actividad con valores de log *P* mayor de 2.92.
- La molécula tiene que ser capaz de formar enlaces de hidrógeno con la Pgp.
- Un modulador debe tener como mínimo un átomo terciario de nitrógeno para formar un catión a pH fisiológico y así, aumentar la fuerza de unión con la Pgp mediante enlaces iónicos.
- Un buen inhibidor de la Pgp debe poseer una alta energía en su orbital molecular ocupado de mayor energía (E_{HOMO}).

Además de los inhibidores directos de los transportadores ABC, se están siguiendo otras estrategias para impedir la actividad de este tipo de proteínas (Fig. 3.104), incluyendo el uso de oligonucleótidos antisentido, ribozimas, ARN pequeño de interferencia (siRNA), regulación de la transcripción del transportador, alteración de la membrana citoplasmática, encapsulación de fármacos, anticuerpos o fármacos que no son sustratos de los transportadores¹²⁵. En este contexto, podemos citar el nilotinib¹³⁴ o el ácido ascórbico (Fig. 3.1), cuyo mecanismo de acción no depende de la interacción con los transportadores de fármacos¹³⁵.

En nuestro grupo de investigación se ha evaluado la actividad quimomoduladora frente a la Pgp humana^{60,63,65} así como de *Leishmania tropica*^{64,136} de una amplia serie de sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos, demostrando que este tipo de metabolitos

¹³⁴ Wang, F.; Wang, X.-K.; Shi, C.-J.; Zhang, H.; Hu, Y.-P.; Chen, Y.-F.; Fu, L.-W. (2014). Nilotinib enhances the efficacy of conventional chemotherapeutic drugs in CD34⁺CD38⁻ stem cells and ABC transporter overexpression leukemia cells. *Molecules*, 19, 3356–3375.

¹³⁵ CHIANG, C.-D.; SONG, E.-J.; YANG, V.-C.; CHAO, C. C.-K. (1994). Ascorbic acid increases drug accumulation and reverses vincristine resistance of human non-small-cell lung-cancer cells. *Biochem. J.*, 301, 759–764.

¹³⁶ CORTÉS-SELVA, F.; JIMÉNEZ, I. A.; MUÑOZ-MARTINEZ, F.; CAMPILLO, M.; BAZZOCCHI, I. L.; PARDO, L.; RAVELO, A. G.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F. (2005). Dihydro-beta-agarofuran sesquiterpenes: a new class of reversal agents of the multidrug resistance phenotype mediated by P-glycoprotein in the protozoan parasite *Leishmania*. *Curr. Pharm. Desing.*, 2005, 11, 3125–39.

presentan una prometedora actividad revertidora de la MDR, junto a una baja toxicidad¹³⁷.

Con estos antecedentes y dada la estricta necesidad de buscar alternativas al grave problema que implica el fenómeno de la MDR, en este capítulo de esta Memoria, describimos el estudio de la actividad revertidora de los sesquiterpenos dihidro- β -agarofuránicos aislados de las hojas de *Celastrus vulcanicola* y de sus derivados, cuyos resultados presentamos a continuación.

¹³⁷ MUÑOZ-MARTÍNEZ, F.; MENDOZA, C.R.; BAZZOCCHI, I. L.; CASTANYS, S.; JIMÉNEZ, I. A.; GAMARRO, F. (2005). Reversión of human Pgp-dependent multidrug resistance by new sesquiterpenes from *Zinowiewia costaricensis*. *J. Med. Chem.*, 48, 4266-4275.

3.4.2 | Resultados y discusión:

Determinación de la Actividad Revertidora de la Multirresistencia a Fármacos en cáncer

Los ensayos de la actividad revertidora de la multirresistencia a fármacos en cáncer se llevaron a cabo en el grupo de los Drs. Santiago Castanys y Francisco Gamarro en el Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra" del Consejo Superior de Investigaciones Científicas de Granada y con la colaboración de la Dra. María Mercedes Pérez Sánchez-Cañete. La metodología usada se recoge en trabajos previos de nuestra investigación⁶⁵.

A | Actividad revertidora de los sesquiterpenos de origen natural

La evaluación preliminar de 16 sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos, aislados de las hojas de *Celastrus vulcanicola* (Fig. 3.1), como revertidores de la multirresistencia a fármacos en cáncer mediado por la Pgp, se determinó basándonos en la fluorescencia intrínseca de la daunomicina (DNM), lo que permite calcular la cantidad relativa de fármaco acumulado en el citoplasma de las células mediante análisis de citometría de flujo. Así, se determinó la acumulación de fármaco (DNM), tanto en células sensibles como resistentes, en presencia de sesquiterpeno. Esto permitió determinar su capacidad de inhibir el transporte de DNM mediado por la Pgp.

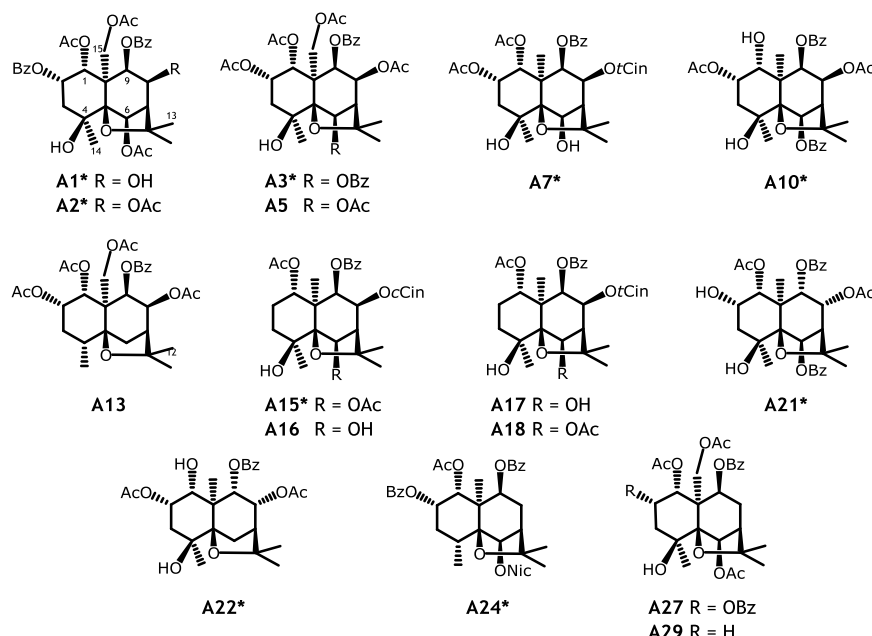


Fig. 3.103 | Sesquiterpenos naturales evaluados como revertidores de la multirresistencia a fármacos en cáncer.

Así, en un primer ensayo, mediante citometría de flujo, se determinó la acumulación intracelular de DNM en la línea celular NIH-3T3 MDR1-G185, en presencia del sesquiterpeno a evaluar (concentración de 10 μ M). El análisis de los resultados (Tabla 3.11 y Fig. 3.104) muestran que todos los sesquiterpenos, a excepción del **A22**, fueron más activos que el control positivo verapamilo (60.26 \pm 3.83%), agente revertidor clásico¹³⁸. Cabe destacar que los sesquiterpenos **A3**, **A7**, **A15**, **A17**, **A18** y **A24** presentaron una potente capacidad quimiomoduladora, con porcentajes de acumulación de daunomicina (DNM) superiores al 75%.

Tabla 3.11 | Porcentaje de inhibición del transporte de daunomicina (DNM), mediado por la Pgp, en células NIH-3T3 MDR1-G185, en presencia de los sesquiterpenos ensayados. DE: desviación estándar.

Compuesto	% de acumulación de DNM \pm DE	Compuesto	% de acumulación de DNM \pm DE
A17	86.68 \pm 5.64	A21*	73.15 \pm 1.48
A7*	85.09 \pm 8.14	A10*	73.14 \pm 2.37
A18	83.47 \pm 4.75	A29	72.36 \pm 2.51
A15*	82.19 \pm 3.31	A16	71.77 \pm 3.53
A24*	80.13 \pm 3.69	A5	69.92 \pm 2.37
A3*	79.74 \pm 2.47	A13	68.15 \pm 0.85
A2*	73.76 \pm 1.42	A22*	37.03 \pm 1.81
A27	73.64 \pm 4.14	Verapamilo	60.26 \pm 3.83
A1*	73.21 \pm 5.24	Control	13.24 \pm 1.05

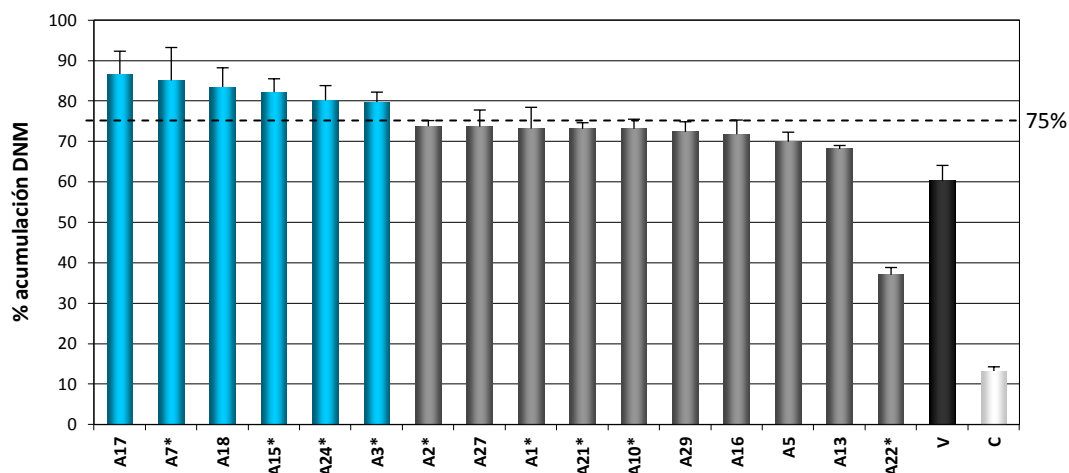


Fig. 3.104 | **Análisis de citometría de flujo** expresado en porcentajes de acumulación intracelular de daunomicina (DNM). Los compuestos que se representan en azul presentaron valores mayor del 75%. V: verapamilo (V). C: blanco control.

¹³⁸ TSURUO, T, TSUKAGOSHI, S, AND SAKURAI, Y. (1981). Overcoming vincristine resistance in P388 leukaemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Cancer Res.*, 41, 1967–1972.

RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD (SAR)

Un cuidadoso análisis del efecto de los sustituyentes en los sesquiterpenos sobre la actividad nos permitió realizar un estudio de relación estructura-actividad, obteniéndose las siguientes conclusiones:

El tipo de sustituyente en la molécula, juega un papel crucial en la actividad, ya que los productos más activos mostraron, como requisito estructural necesario para la expresión de la actividad revertidora, la presencia de dos ésteres aromáticos. Así, los productos **A7**, **A15**, **A17** y **A18**, con porcentajes de acumulación de DNM superior al 80%, y los productos **A3** y **A24**, con un porcentaje de acumulación próximo al 80%, tienen en común esta característica estructural. Estos resultados confirman que los ésteres aromáticos son los mejores sustituyentes (cinamato > nicotinato > benzoato)⁶⁰.

La regiosustitución en el esqueleto sesquiterpénico es un elemento importante para la expresión de la actividad, de tal forma que las sustituciones en el anillo B contribuyen más a la actividad que las sustituciones en el anillo A:

- Los productos más activos (**A3**, **A7**, **A15**, **A17**, **A18** y **A24**) se caracterizan por tener ésteres aromáticos en los carbonos C-6/C-9 o C-8/C-9.
- El producto que presentó menor acumulación, **A22**, tiene como característica estructural la ausencia de éster en el carbono C-6.
- La presencia de un éster en el carbono C-2 no afecta la actividad revertidora [**A17** (86.7%) vs. **A7** (85.1%), **A27** (73.6%) vs. **A29** (72.4%)].
- La preferencia del segundo benzoato en carbono C-6 más que en C-2 [**A2** (73.8%) vs. **A3** (79.7%)].

El análisis SAR preliminar de la estructura-actividad podemos concluir que el tipo de éster y la regiosustitución sobre el esqueleto dihidro- β -agarofurano juegan un papel fundamental en la actividad revertidora.

Determinación de la constante de inhibición K_i

Los sesquiterpenos más activos en la evaluación preliminar, usando como criterio de selección aquellos productos que inhiben el transporte de DNM mediado por la Pgp con un porcentaje superior del 75%, fueron sometidos a ensayos posteriores. Así, en primer lugar, se determinó la **constante de inhibición K_i** , concentración de compuesto que inhibe en un 50% el transporte de DNM mediado por la Pgp. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 3.12.

Tabla 3.12 | Constante de inhibición K_i de los sesquiterpenos seleccionados. Los resultados se expresan como el valor medio \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

Compuesto	K_i (μM)
A17	0.28 \pm 0.02
A18	0.29 \pm 0.07
A24	0.29 \pm 0.07
A7	0.42 \pm 0.10
A15	0.61 \pm 0.11
A3	0.78 \pm 0.08

El análisis de los valores obtenidos mostró que los seis compuestos analizados presentan un alto grado de afinidad por la Pgp ($K_i < 0.8 \mu\text{M}$), siendo los tres sesquiterpenos más activos **A17**, **A18** y **A24** (K_i 0.28, 0.28 y 0.29 μM , respectivamente). Estos datos indican el alto grado de afinidad de estos sesquiterpenos por la Pgp, ya que inhiben en un 50% el transporte de DNM a concentraciones submicromolares.

Determinación de la toxicidad intrínseca

Posteriormente, con la finalidad de distinguir entre la muerte de las células por el efecto de la DNM o VNB de la muerte provocada por los sesquiterpenos, se realizó un **ensayo de toxicidad intrínseca** en líneas celulares NIH-3T3, tanto transfectadas como sensibles a fármacos, a una concentración de 10 μM .

Tabla 3.13 | Citotoxicidad intrínseca de los sesquiterpenos seleccionados en células NIH-3T3 MDR1 y parentales (NIH-3T3). Los resultados se expresan como el porcentaje de crecimiento celular \pm la desviación estándar ($P < 0.05$) de tres experimentos independientes, realizados por triplicado, con respecto a un control sin tratar.

Compuesto	Células MDR1	Células parentales
A7	78.4 \pm 1.3	69.0 \pm 2.0
A18	73.6 \pm 1.7	73.8 \pm 4.9
A17	73.8 \pm 2.1	84.8 \pm 2.3
A3	71.4 \pm 5.4	64.4 \pm 5.2
A24	70.2 \pm 3.1	75.4 \pm 6.4
A15	64.3 \pm 5.9	51.4 \pm 4.4
Verapamilo	80.8 \pm 1.1	96.0 \pm 3.6

El análisis de los datos obtenidos en este ensayo (Tabla 3.13) mostró que los sesquiterpenos presentan una baja citotoxicidad con valores de crecimiento celular superiores al 64%, exceptuando el compuesto **A15** en la línea parental (51.4%).

Determinación del índice de reversión

A continuación, se realizaron estudios de la **modulación de la sensibilidad a daunomicina (DNM) y vinblastina (VNB)** de los seis sesquiterpenos seleccionados, determinándose el índice de reversión de cada sesquiterpeno (I.R., relación entre CI_{50} sin sesquiterpeno y CI_{50} con sesquiterpeno) a concentraciones de 1.0, 3.0 y 10.0 μM , usando el ensayo colorimétrico MTT, y el agente revertidor verapamilo como control positivo. Los resultados obtenidos (Tabla 3.14 y en la Fig. 3.105), nos permiten establecer la eficacia de los sesquiterpenos para revertir la resistencia al fármaco.

Tabla 3.14 | Índice de reversión^a de la resistencia a DNM o VNB en células NIH-3T3 MDR1.

Compuesto	Índice de reversión con DNM ^b			Índice de reversión con VNB ^c		
	1 μM	3 μM	10 μM	1 μM	3 μM	10 μM
A17	5.58 ± 0.24	9.07 ± 0.29	15.13 ± 4.71	23.72 ± 2.10	30.25 ± 2.48	86.63 ± 8.45
A18	7.19 ± 0.94	10.57 ± 0.82	13.54 ± 2.03	28.46 ± 1.86	38.95 ± 2.83	135.39 ± 9.05
A24	6.85 ± 2.63	13.10 ± 1.38	17.27 ± 2.75	21.65 ± 8.37	33.58 ± 5.35	54.93 ± 9.88
A3	3.86 ± 0.67	12.72 ± 2.80	25.59 ± 4.32	16.41 ± 2.98	22.44 ± 2.48	70.30 ± 8.67
A15	6.99 ± 1,79	24.03 ± 6.40	30.26 ± 6.52	12.14 ± 1.86	19.67 ± 3.06	77.02 ± 8.78
A7	6.04 ± 1.64	16.38 ± 2.51	20.43 ± 5.48	12.76 ± 0.46	24.08 ± 4.22	87.14 ± 9.52
Verapamilo	2.84 ± 0.22	6.23 ± 2.41	10.84 ± 2.12	8.66 ± 1.13	27.84 ± 2.55	129.88 ± 4.23

^a Índice de reversión (I.R.): relación entre CI_{50} de las células sin sesquiterpeno y CI_{50} de las células con sesquiterpeno. Los resultados se expresan como el porcentaje de crecimiento celular ± la desviación estándar ($P < 0.05$) de dos experimentos independientes realizados por triplicado. ^b El índice máximo de reversión con DNM (relación entre las células MDR y células sensibles a fármaco) es de 22. ^c El índice máximo de reversión con VNB (relación entre las células MDR y células sensibles a fármaco) es de 152.

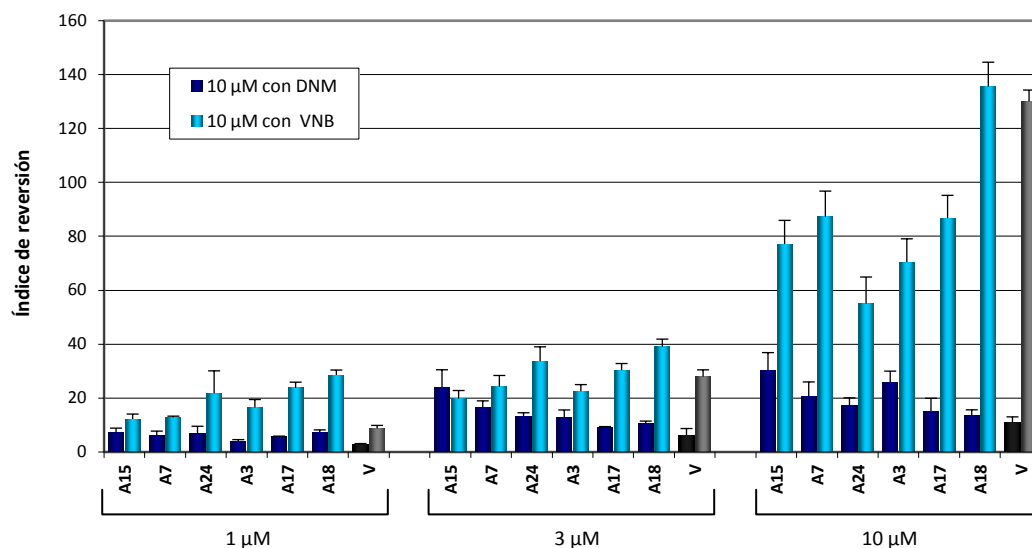


Fig. 3.105 | Índice de Reversión (I.R.) de los sesquiterpenos ensayados a concentraciones de 1, 3 y 10 μM en presencia de DNM (azul) y VNB (celeste). Control: verapamilo (V).

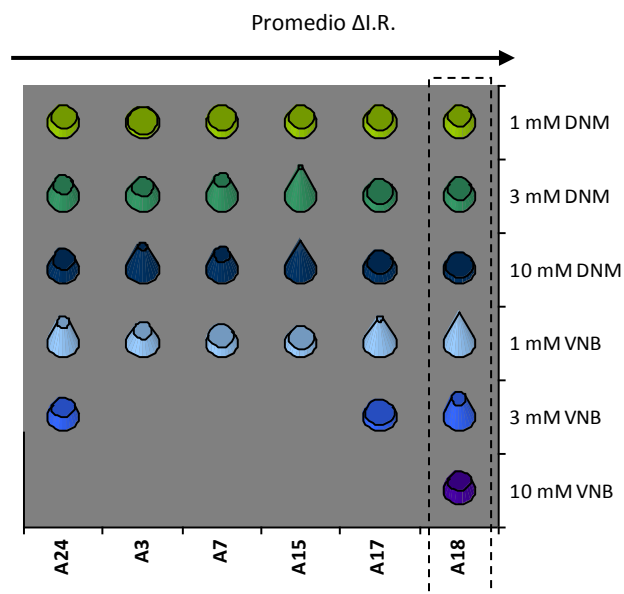


Fig. 3.106 | Diferencia de los índices de reversión de los sesquiterpenos naturales con verapamilo ($I.R._{sesquiterpeno} - I.R._{verapamilo}$). Se indican las diferencias que resultaron con un valor positivo como un cono, indicando la magnitud de la diferencia en la altura del mismo.

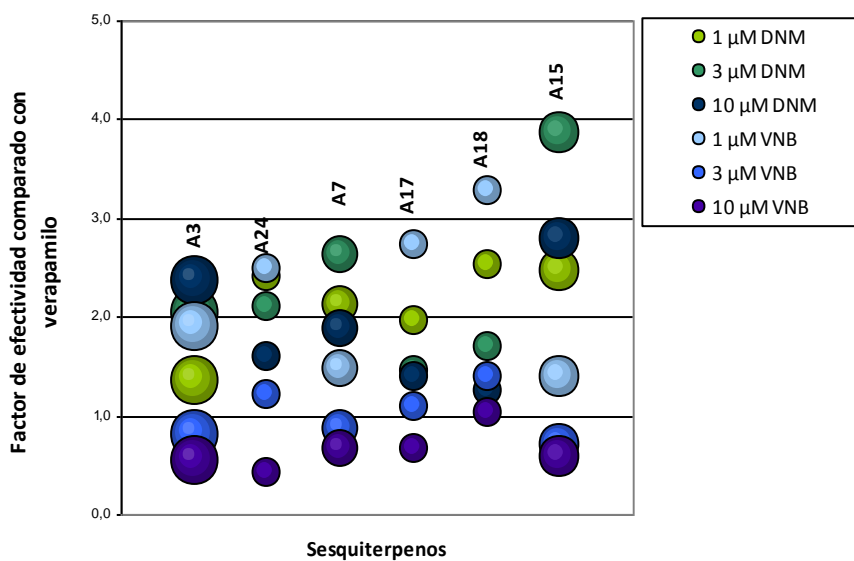


Fig. 3.107 | Factores de efectividad calculados por comparación de los índices de reversión de los sesquiterpenos naturales con verapamilo. Los resultados se presentan como factor de I.R. de sesquiterpeno frente a Verapamilo a las diferentes concentraciones con daunomicina (DNM, verde) y vinblastina (VNB, azul). Además, el tamaño de la esfera indica el correspondiente valor de K_i .

El análisis de los datos obtenidos en la **determinación de los índices de reversión** de los sesquiterpenos (Tabla 3.14, Fig. 3.105, Fig. 3.106, Fig. 3.107) con daunomicina (DNM) y vinblastina (VNB) nos mostró:

- Con DNM, todos los compuestos resultaron más eficaces que el revertidor clásico verapamilo. El compuesto más activo a la concentración de 1 μM fue **A18** (7.19 μM vs. 2.84 μM), presentando un I.R. tres veces mayor que el control positivo, y el compuesto **A15** resultó cuatro veces más activo a 3 μM (23.03 μM vs. 6.23 μM).
- Con VNB, se observa que todos los sesquiterpenos fueron más activos que el control positivo a la concentración de 1 μM , destacando el producto **A18**, con un I.R. tres veces superior al verapamilo (28.46 μM vs. 8.66 μM), seguido por **A17** y **A24**, más activos que verapamilo a las concentraciones de 1 y 3 μM .
- El compuesto más eficaz con ambos fármacos fue **A18**, con I.R. mayores que el control positivo a todas las concentraciones ensayadas.

En **resumen**, podemos concluir que los sesquiterpenos aislados de las hojas de *Celastrus vulcanicola* se perfilan como candidatos para posteriores estudios dirigidos a explorar su potencial como agentes terapéuticos en el tratamiento de la multirresistencia a fármacos en cáncer, confirmando que el tipo de sustituyente y el patrón de regiosustitución son elementos fundamentales para la potente actividad revertidora de esta serie de sesquiterpenos naturales.

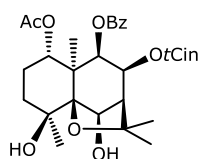
Desde el punto de vista sintético y farmacológico, los compuestos **A17** y **A18** nos parecían *cabezas de serie* apropiados, ya que eran los compuestos mayoritarios en la planta, lo que nos permitió la preparación de una quimioteca con la finalidad de potenciar la actividad revertidora, así como profundizar en el conocimiento de la relación estructura-actividad.

B | Actividad revertidora de la MDR de la quimioteca de análogos de sesquiterpenos

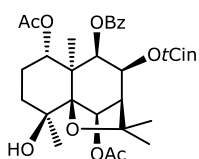
La evaluación preliminar de 78 análogos de sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos (2a–31a, 33a–59a, 61a–71a y 73a–82a) como revertidores de la MDR mediada por la Pgp humana, se determinó siguiendo la misma metodología usada para los sesquiterpenos naturales descrita anteriormente. Los derivados se evaluaron en cuatro series secuenciales (Fig. 3.108) con el objetivo de optimizar el ciclo de síntesis con la siguiente distribución:

- **Serie 1:** 3a–7a, 15a, 16a, 18a, 21a, 22a, 24a, 26a, 27a, 31a, 34a–37a, 42a, 44a, 47a, 48a, 54a,
- **Serie 2:** 2a, 13a, 17a, 19a, 23a, 25a, 28a–30a, 38a–40a, 66a, 70a, 71a, 82a,
- **Serie 3:** 8a–11a, 20a, 33a, 45a, 46a, 51a, 52a, 63a, 65a, 68a, 73a, 76a–79a, 81a,
- **Serie 4:** 12a, 14a, 41a, 43a, 49a, 50a, 53a, 55a–59a, 61a, 62a, 64a, 67a, 69a, 74a, 75a, 80a.

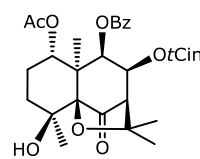
Las estructuras de los correspondientes compuestos se presentan a continuación.



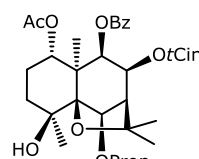
A17



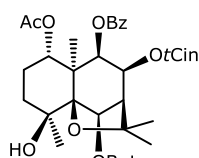
A18



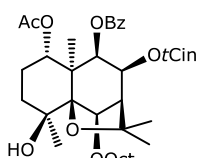
2a



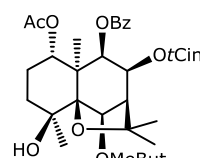
3a



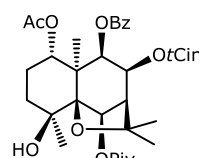
4a



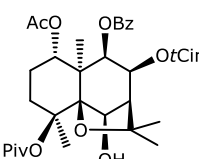
5a



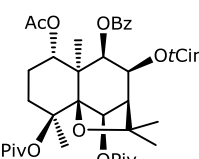
6a



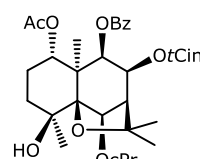
7a



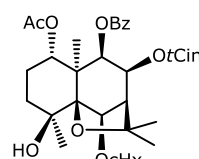
8a



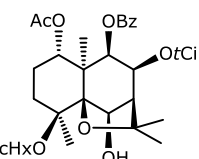
9a



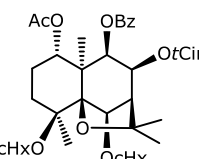
10a



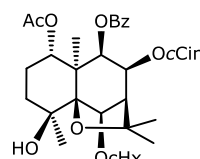
11a



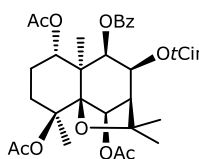
12a



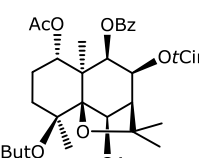
13a



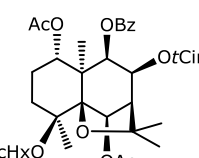
14a



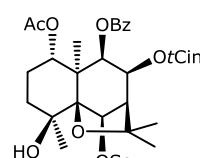
15a



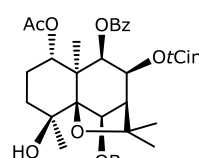
16a



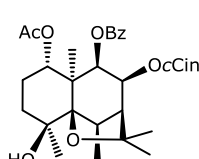
17a



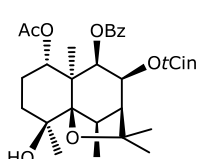
18a



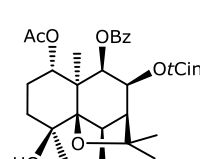
19a



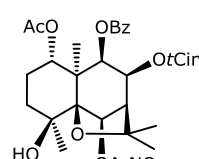
20a



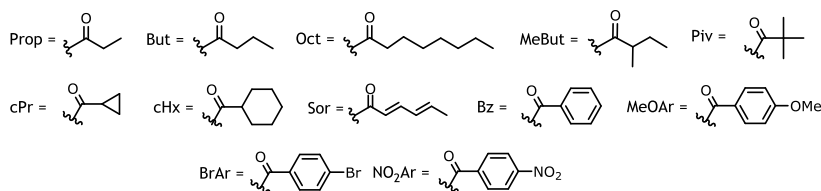
21a

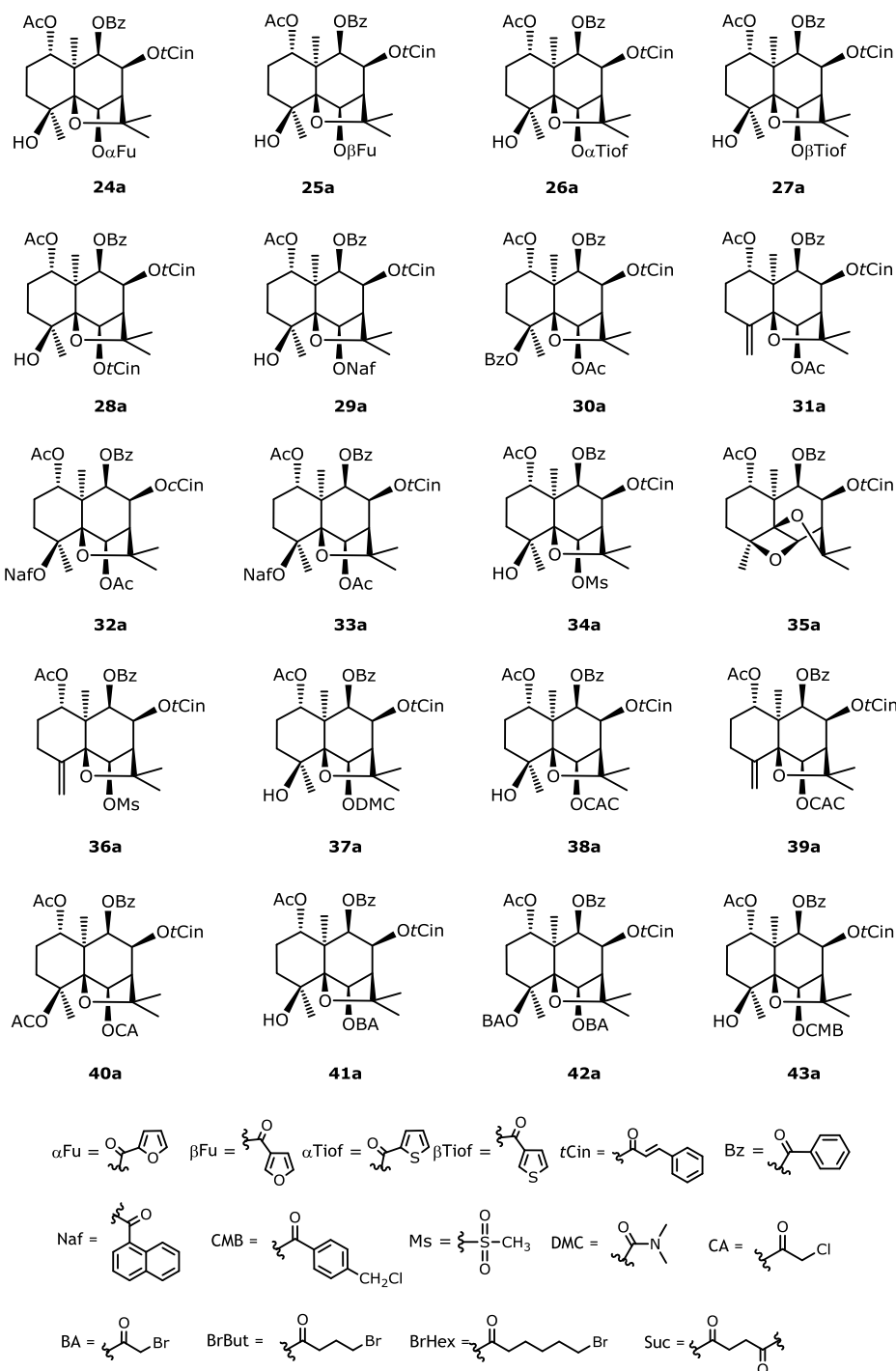


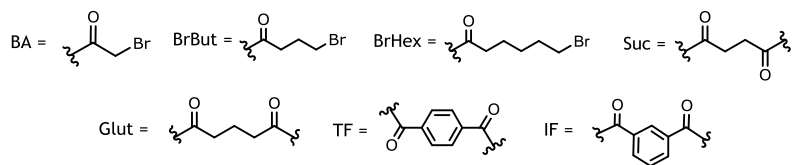
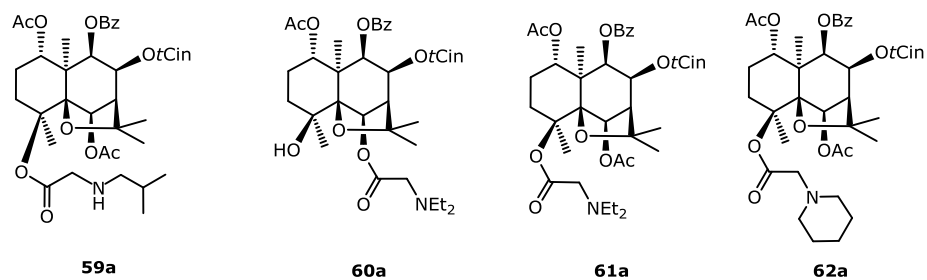
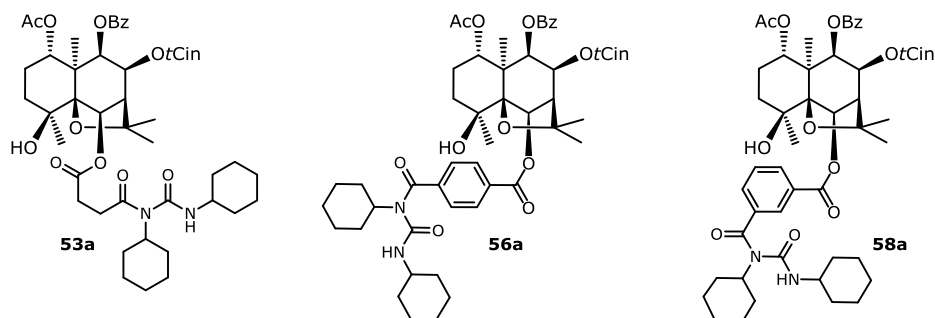
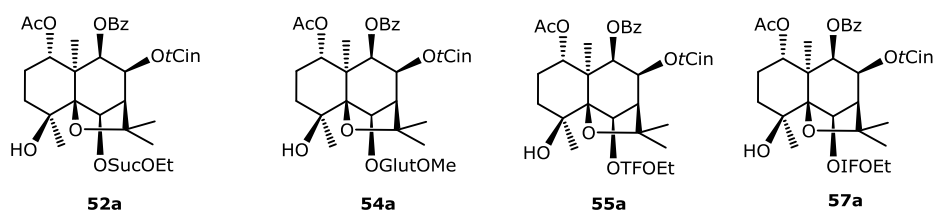
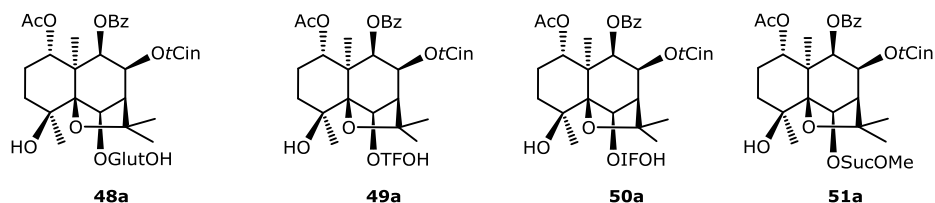
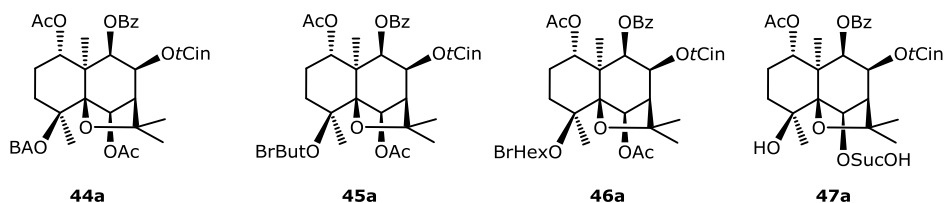
22a



23a







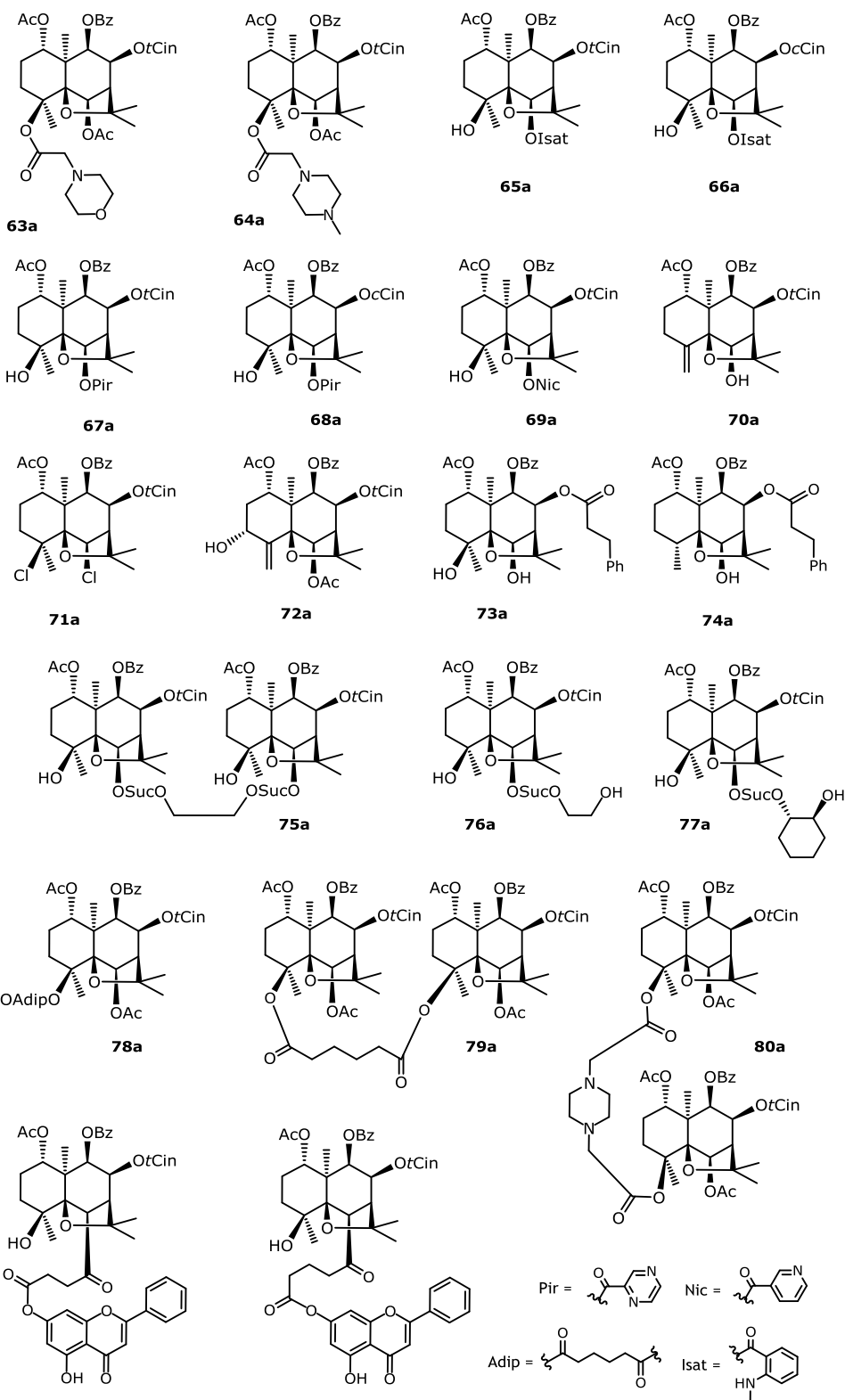


Tabla 3.15 | Porcentajes de inhibición del transporte de daunomicina (DNM), mediado por la Pgp, en células NIH-3T3 MDR1, en presencia de sesquiterpenos a 10 μ M. La retención de DNM se determinó por citometría de flujo. Los resultados se expresan como fluorescencia relativa comparada con el control a 10 μ M. DE: desviación estándar. V: verapamilo, C: blanco control.

Compuesto	% acumulación DNM \pm DE	Compuesto	% acumulación DNM \pm DE
A16	71.77 \pm 3.53	42a	25.95 \pm 5.59
A17	86.68 \pm 5.64	43a	70.38 \pm 1.77
A18	83.47 \pm 4.75	44a	58.82 \pm 1.78
2a	82.32 \pm 1.75	45a	75.29 \pm 6.42
3a	87.48 \pm 5.47	46a	72.65 \pm 1.41
4a	87.83 \pm 10.00	47a	12.73 \pm 2.38
5a	64.86 \pm 5.01	48a	10.06 \pm 1.64
6a	86.43 \pm 7.18	49a	70.02 \pm 2.58
7a	71.96 \pm 3.73	50a	57.23 \pm 5.14
8a	73.78 \pm 4.85	51a	82.51 \pm 3.68
9a	71.44 \pm 2.97	52a	89.41 \pm 5.44
10a	81.98 \pm 1.80	53a	81.76 \pm 2.82
11a	73.72 \pm 3.88	54a	77.54 \pm 13.22
12a	69.99 \pm 1.34	55a	71.38 \pm 1.21
13a	13.73 \pm 0.08	56a	55.78 \pm 3.92
14a	73.72 \pm 1.76	57a	73.92 \pm 4.85
15a	85.22 \pm 4.21	58a	59.27 \pm 3.60
16a	74.45 \pm 7.70	59a	77.95 \pm 2.57
17a	49.24 \pm 4.43	61a	72.82 \pm 2.65
18a	58.23 \pm 0.01	62a	73.74 \pm 1.82
19a	79.03 \pm 1.10	63a	86.81 \pm 4.98
20a	78.42 \pm 0.23	64a	74.84 \pm 1.67
21a	56.89 \pm 8.47	65a	50.05 \pm 3.00
22a	34.42 \pm 5.26	66a	57.29 \pm 5.62
23a	53.81 \pm 1.00	67a	84.43 \pm 5.88
24a	64.68 \pm 8.57	68a	78.86 \pm 1.04
25a	67.03 \pm 4.05	69a	80.86 \pm 6.50
26a	73.78 \pm 2.35	70a	68.77 \pm 3.08
27a	53.71 \pm 14.59	71a	76.51 \pm 4.57
28a	50.34 \pm 3.74	73a	86.23 \pm 0.90
29a	22.04 \pm 1.45	74a	77.86 \pm 2.59
30a	65.85 \pm 4.83	75a	46.41 \pm 1.91
31a	74.70 \pm 8.03	76a	86.88 \pm 1.79
33a	44.30 \pm 1.75	77a	82.92 \pm 0.85
34a	82.75 \pm 7.72	78a	39.66 \pm 2.76
35a	77.98 \pm 10.80	79a	23.67 \pm 0.83
36a	65.72 \pm 5.85	80a	69.77 \pm 2.15
37a	80.21 \pm 5.57	81a	74.23 \pm 1.56
38a	82.65 \pm 7.41	82a	14.63 \pm 0.32
39a	65.73 \pm 3.94	V	60.26 \pm 3.83
40a	44.62 \pm 3.93	C	13.24 \pm 1.05
41a	83.23 \pm 4.02		

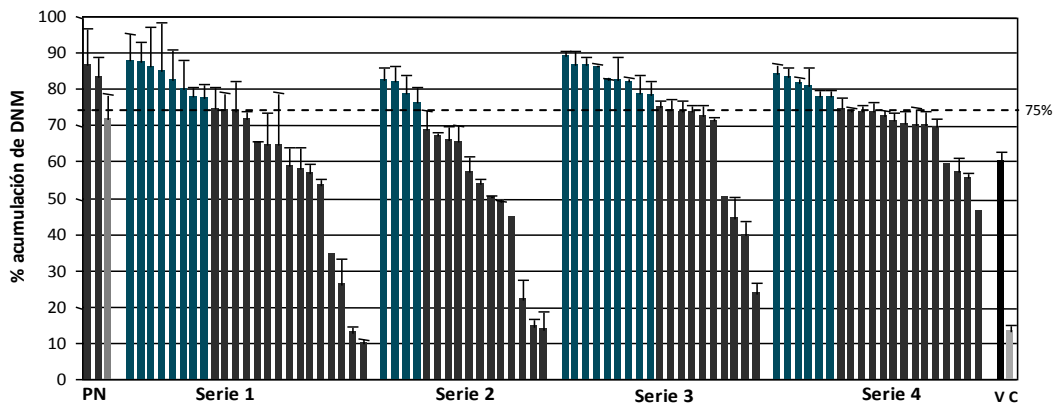


Fig. 3.108 | Porcentajes de inhibición del transporte de DNM, mediado por la Pgp, en células NIH-3T3 MDR1, en presencia de sesquiterpenos. Se indican los valores de las cuatro series de análogos. Procedimiento: Las células fueron previamente incubadas con DNM (2 μ M) y sesquiterpeno (10 μ M), y la retención de DNM se determinó mediante citometría de flujo. Los resultados se expresan como la fluorescencia relativa comparada con el control (VER 10 μ M). PN: sesquiterpenos de origen natural (A16, A17, A18), azul: compuestos seleccionados por tener una acumulación de DNM > 75%.

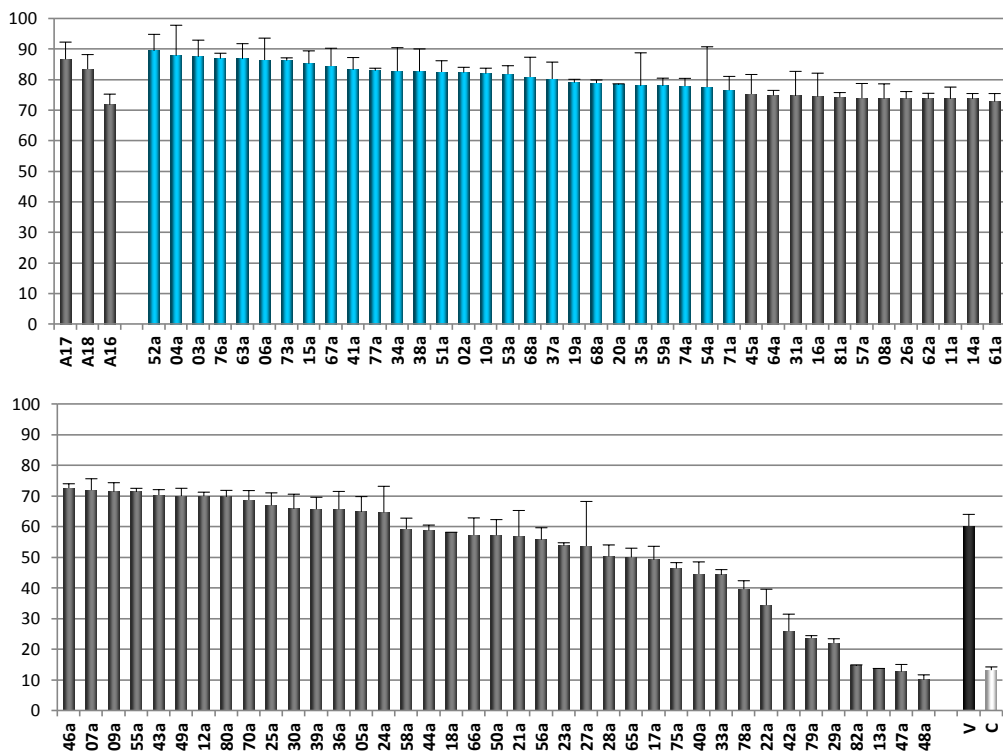


Fig. 3.109 | Porcentajes de inhibición del transporte de DNM, mediado por la Pgp, en células NIH-3T3 MDR1, en presencia de sesquiterpenos con orden decreciente de actividad.

El análisis de citometría de flujo (Fig. 3.109 y Tabla 3.15) mostró que los sesquiterpenos presentaron capacidad quimiomoduladora al producirse un aumento en la concentración intracelular de DNM, lo que indica una inhibición de la Pgp. El porcentaje de inhibición de 64 de los sesquiterpenos resultó superior al verapamilo (60.3%). Se seleccionaron los 29 sesquiterpenos que presentaron una acumulación de daunomicina superior al 75% para, en posteriores estudios, determinar la constante de inhibición K_i , citotoxicidad e índice de reversión.

Relación estructura-actividad (SAR)

Un cuidadoso análisis del efecto de los sustituyentes en los derivados sobre la actividad nos permitió realizar un estudio de relación estructura-actividad, obteniendo las conclusiones que se presentan a continuación.

EFECTO POR ENLACES DE HIDRÓGENO

Un análisis comparativo de la actividad revertidora de los compuestos oxidados, esterificados y clorados en C-4 y/o C-6 (**2a**, **A18**, **15a** y **70a**), con **A17** que presenta grupos hidroxilos en dichas posiciones (Fig. 3.110), indica lo siguiente:

- Al anular la posibilidad de actuar como dador de enlaces de hidrógeno mediante oxidación o esterificación, la actividad revertidora no se modifica.
- La cloración de ambas posiciones C-4 y C-6 disminuye la actividad biológica.

Por lo tanto, proponemos que, en ambas posiciones, aceptores de enlaces de hidrógeno son favorables para la actividad revertidora de los compuestos, mientras que la presencia de dadores de enlaces de hidrógeno no influye en la actividad.

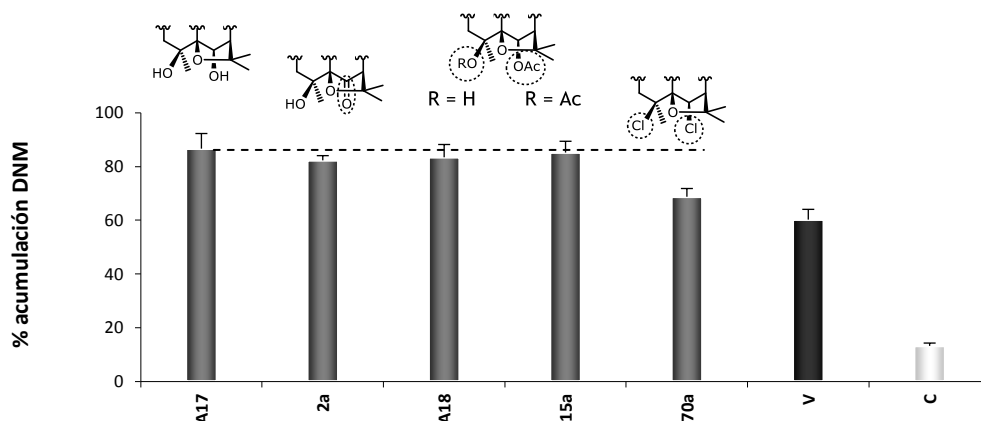


Fig. 3.110 | Porcentaje de acumulación de DNM. V: verapamilo, C: control.

Un estudio de Mécanica Molecular del producto **A17** (PC Model, versión 9.200), indica la presencia de un enlace de hidrógeno intramolecular entre el OH-6 y el oxígeno del OH-4 (Fig. 3.111). Un análisis similar, usando ChemBioDraw3D, nos indicó otro enlace de hidrógeno entre el OH-4 y el oxígeno del tetrahidrofurano. Esta observación justifica el porque **A17**, con un grupo OH secundario en C-6, presenta una actividad tan alta, a pesar de que estudios anteriores han mostrado que éste es desfavorable para la actividad revertidora en este tipo de compuestos¹³⁹.

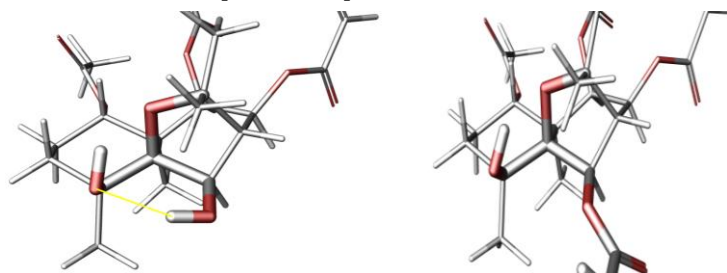


Fig. 3.111 | Representación de los enlaces de hidrógeno intramoleculares (amarillo) en A17 (izquierda) y A18 (derecha) calculados mediante Mecánica Molecular (PC Model, versión 9, y Maestro 9.2).

INFLUENCIA DE LA LIPOFILIA Y TAMAÑO DEL ÉSTER

En un trabajo anterior de nuestro grupo de investigación¹³⁹, se propuso que la actividad de los moduladores de la Pgp, incluyendo los sesquiterpenos, dependía de sus valores de $\log P$, siendo los valores idóneos entre 5 y 9.5. Para comprobar, si esta propuesta coincidía con nuestros resultados, se calcularon el CLogP y el Índice de Refracción Calculado (CMR)¹⁴⁰ para los compuestos que se prepararon con ácidos carboxílicos alifáticos.

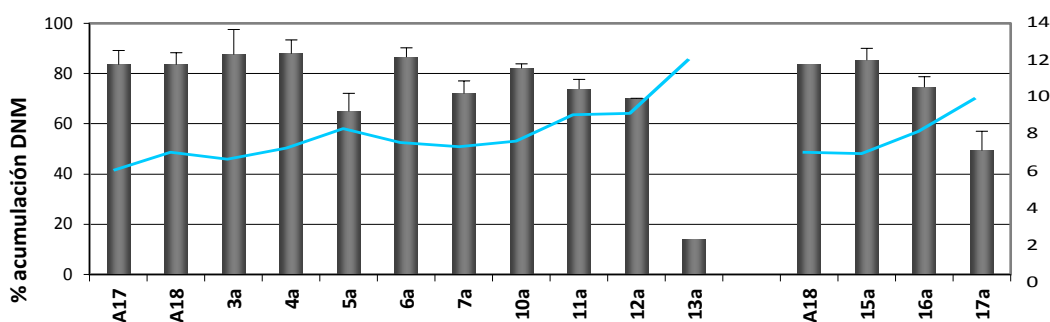


Fig. 3.112 | Porcentaje de acumulación de DNM presentado de los metabolitos A17 y A18 y sus análogos con ésteres de cadena alifática, y correlación con los correspondientes valores de cLogP.

¹³⁹ CORTÉS-SELVA, F.; CAMPILLO, M.; REYES, C. P.; JIMÉNEZ, I. A.; CASTANYS, S.; BAZZOCCHI, I. L.; PARDO, L.; GAMARRO, F.; RAVELO, A. G. (2004). SAR studies of dihydro-b-agarofuran sesquiterpenes as inhibitors of the multidrug-resistance phenotype in a *Leishmania tropica* line overexpressing a P-glycoprotein-like transporter. *J. Med. Chem.*, 47, 576–578.

¹⁴⁰ LEESON, P. D.; SPRINGTHORPE, B. (2007). The influence of drug-like concepts on decision-making in medicinal chemistry. *Nature Rev. Drug Discov.*, 6, 881–890.

El análisis de los resultados (Fig. 3.112) mostró una correlación entre la actividad revertidora y el carácter lipofílico de los compuestos, observándose que:

- Los compuestos con ésteres de cadena alifática y un porcentaje de acumulación de DNM mayor del 75% presentan un CLogP entre 6.0 y 7.6. Si tenemos en cuenta toda la quimioteca y una acumulación de DNM mayor del 85%, obtenemos un valor de ClogP entre 6.6 y 8.3 (Tabla 3.16, Fig. 3.113).
- El tamaño de la cadena alifática del éster sobre C-6 idónea es aquella que tiene entre 3-5 átomos de carbono y está poco ramificada. En posición C-4, un grupo acetato es el mejor sustituyente.
- Como valores óptimos para el CMR, medida del tamaño de la molécula y calculados mediante Modelización Molecular, se han obtenido valores entre 15-20 cm³/mol (Fig. 3.113). Ello se pone de manifiesto al observar el comportamiento del compuesto **7a** el cual pierde actividad debido al tamaño del grupo *terc*-butilo presente en posición C-6.

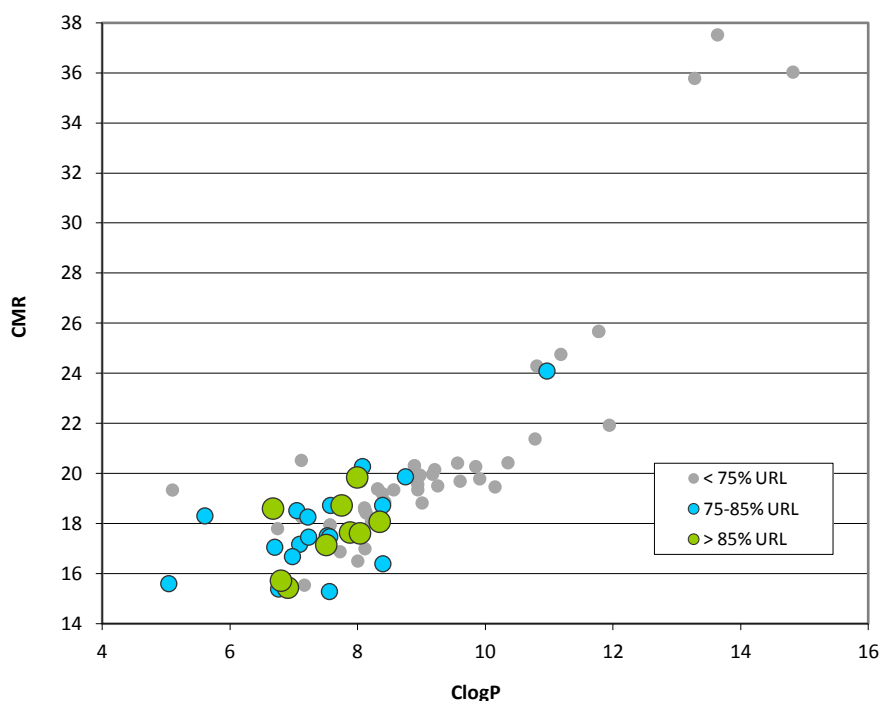


Fig. 3.113 | Representación gráfica bidimensional que relaciona tamaño de molécula (CMR) con lipofilia (ClogP).

EFFECTO DE SUSTITUYENTES DE ANÁLOGOS DE ÁCIDOS CARBOXÍLICOS

Los sulfonatos y carbamatos se consideran isómeros de los carboxilatos^{141,142,143}, por lo cual nos planteamos preparar derivados con este tipo de análogos carboxílicos.

El análisis comparativo de los datos de la actividad revertidora de los derivados **34a**, **35a**, **36a** y **37a** con los del producto de partida, **A17**, mostró que las características estereoestructurales, así como el efecto aceptor de enlaces de hidrógeno del grupo metanosulfonilo y carbamoilo, no modifican de manera considerable la actividad. Como resultado más destacado, indicar que el compuesto **36a**, con un doble enlace $\Delta^{4(14)}$, presenta una reducción drástica de la actividad.

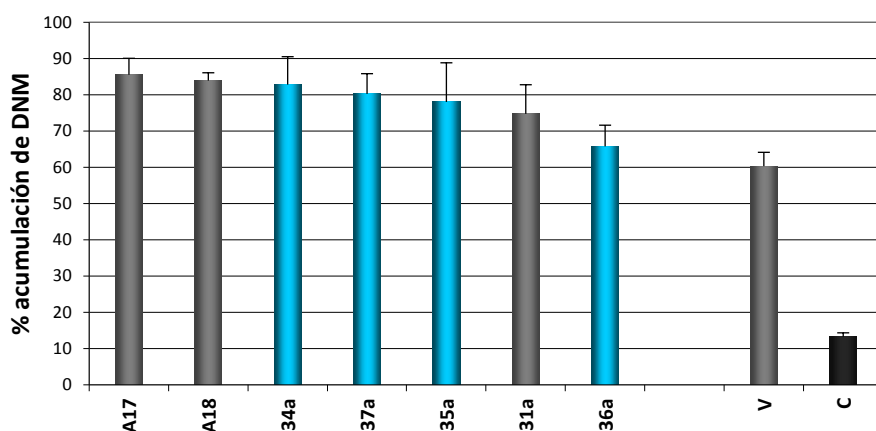


Fig. 3.114 | Porcentaje de acumulación de DNM presentado por **A17** y **A18** y sus derivados **34a-36a**.

EFFECTO DE LAS INSATURACIONES

La preparación de ésteres olefínicos dio como resultado una pérdida drástica de la actividad (**A17** vs. **18a**). Dado que el grupo ciclopropilo se considera un bioisómero del grupo vinílico⁸⁹, se preparó el ciclopropilcarboxiléster **10a**, que presentó una actividad similar al producto de partida **A17** (Fig. 3.115).

¹⁴¹ CAROLAN, C. G.; DILLON, G. P. GAYNOR, J. M.; REIDY, S.; RYDER, S. A.; KHAN, D.; MARQUEZ, J. F.; GILMER, J. F. (2008). Isosorbide-2-carbamate Esters: Potent and Selective Butyrylcholinesterase Inhibitors. (2008). *J. Med. Chem.*, 51(20), 6400–6409.

¹⁴² ROSOWSKY, A.; FORSCH, R. A.; FREISHEIM, J. H.; MORAN, R. G.; WICK, M. (1984). Methotrexate analogues. 19. Replacement of the glutamate side chain in classical antifolates by L-homocysteic acid and L-cysteic acid: effect on enzyme inhibition and antitumor activity. *J. Med. Chem.*, 27, 600–604.

¹⁴³ CHENG, H.; CHONG, Y.; HWANG, I.; TAVASSOLI, A.; ZHANG, Y.; WILSON, I. A.; BENKOVIC, S. J.; BOGER, D. L. (2005). Design, synthesis and biological evaluation of 10-methanesulfonyl-DDACTHF, 10-methanesulfonyl-5-DACTHF and 10-methylthio-DDACTHF as potent inhibitors of GAR Tfase and the de novo purine biosynthetic pathway. *Bioorg. Med. Chem.*, 13, 3577–3585.

La introducción de un doble enlace $\Delta^{4(14)}$ afecta la actividad revertidora, tal como se observa en el análisis comparativo de la actividad de los productos **A17** y **A18** con sus derivados **71a** y **31a**. Por otro lado, la hidrogenación del doble enlace de la unidad C₃ del cinamato localizado en el carbono C-8, no produce cambios significativos en la actividad (**A17** vs. **73a**).

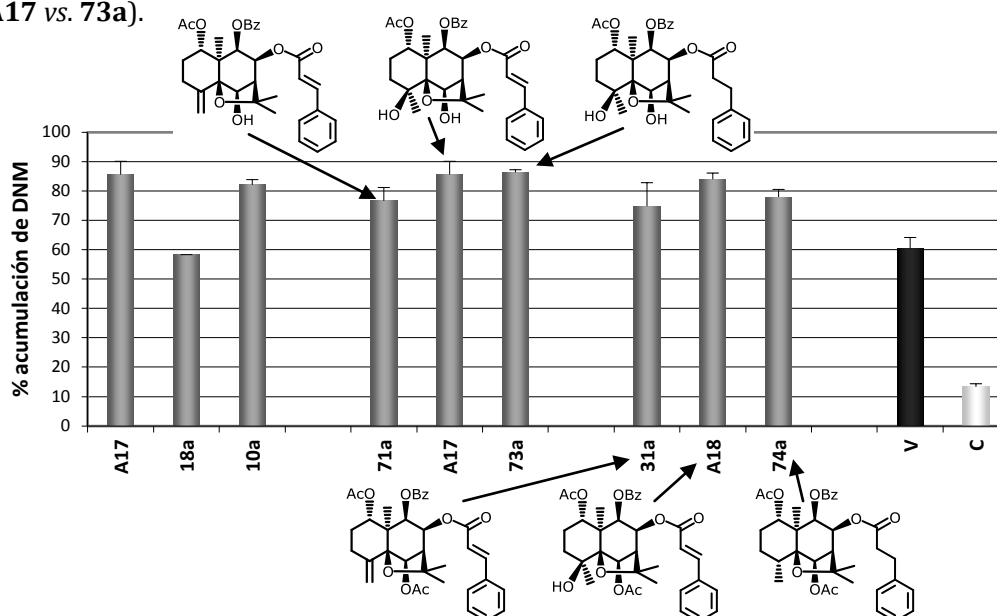


Fig. 3.115 | Porcentaje de acumulación de DNM presentado por los compuestos **A17**, **A18** y **31a** y sus análogos hidrogenados.

EFEECTO DE LA AROMATICIDAD

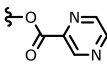
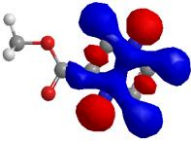
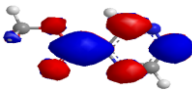
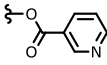
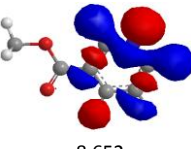
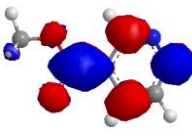
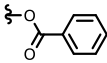
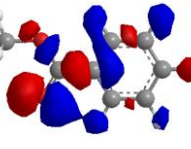
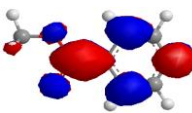
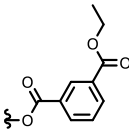
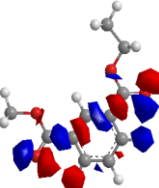

La introducción de ésteres aromáticos con distintas características estereoelectrónicas indica que este tipo de ésteres juega un papel relevante en la actividad, lo que se refleja al comparar los resultados obtenidos de los derivados con ésteres aromáticos en posición C-4 o/y C-6 con el producto de partida **A18**.

- Los ésteres aromáticos en C-6 con anillos de seis miembros que presentaron mayor actividad son el pirazincarboxilato, nicotinato y benzoato, con porcentajes de acumulación de DNM mayor del 75%.
- Al comparar la actividad revertidora de los compuestos **30a** (65.85%) y **33a** (44.30%), ambos con ésteres aromáticos en C-4, con su producto de partida **A18** (83.87%), se observa una reducción de la actividad.

Con el objetivo de explicar este comportamiento de los ésteres aromáticos, se llevó a cabo el cálculo teórico del orbital molecular ocupado de más energía (HOMO), del orbital

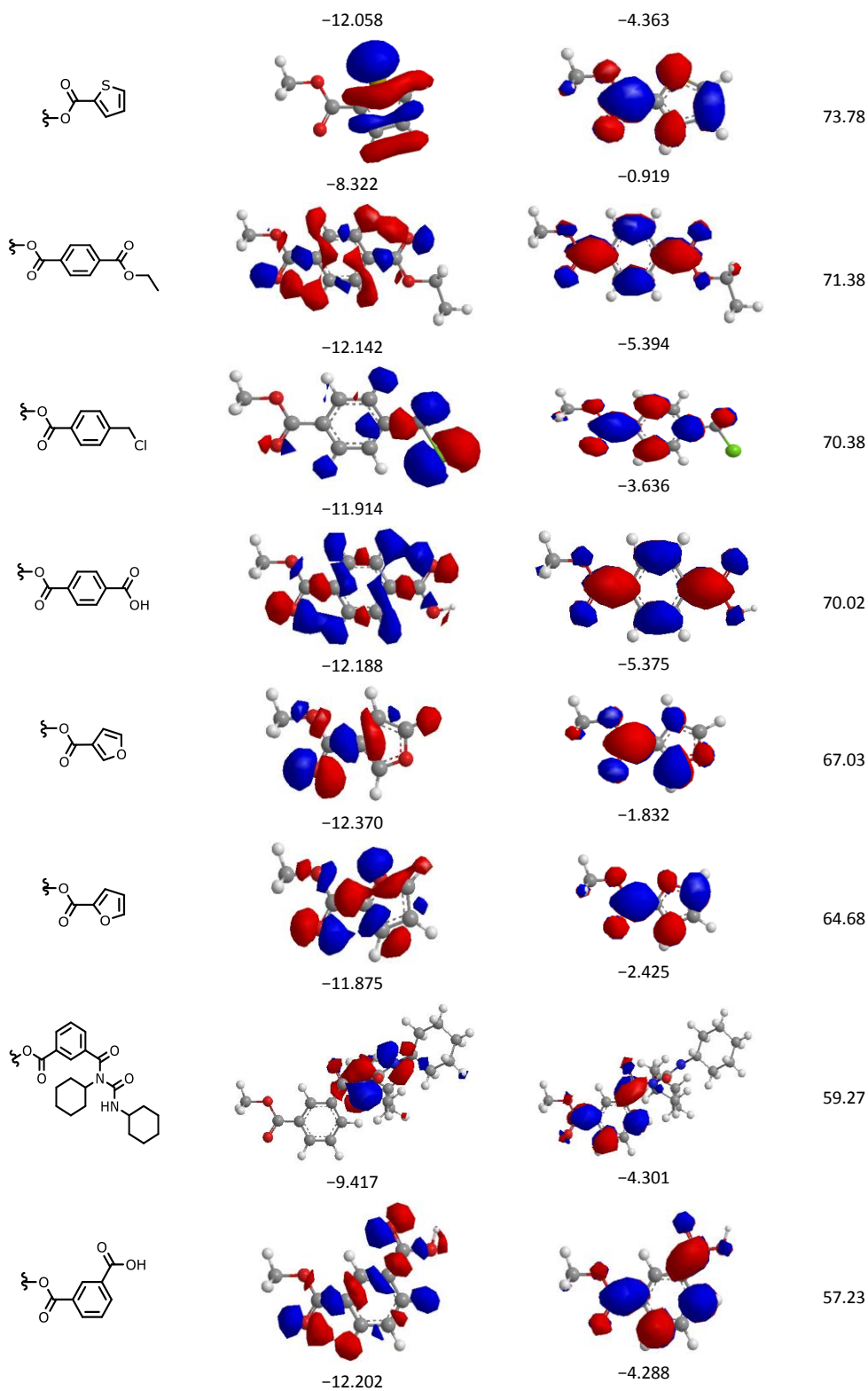
molecular no ocupado de más baja energía (LUMO) y las correspondientes energías, descriptores moleculares de relevancia usados en diferentes estudios QSAR^{144,145}.

En este estudio se incluyeron todos los ésteres aromáticos de los análogos (Fig. 3.116), así como los tres compuestos más activos (67a, 69a, 19a), el menos activo (29a) y A17 (Fig. 3.117). Un análisis preliminar de las energías HOMO y LUMO correspondientes y comparación con la actividad que exhibe cada sesquiterpeno, no mostró correlación. Así, por ejemplo, la forma y energías HOMO y LUMO de los compuestos 19a y 29a son similares, aunque sus actividades revertidoras son muy diferentes. Sin embargo, se observa una influencia de la disposición espacial del éster aromático en C-6. El carácter del anillo aromático conlleva una reorganización espacial de los ésteres situados en C-8 y C-9, tal como se muestra en el esquema. Como conclusión, la presencia de un grupo aromático en C-4 o C-6 modifica la actividad dependiendo de la disposición espacial del anillo aromático.

Fragmento	HOMO eV	LUMO eV	% acumulación DNM
	 -5.615	 -3.650	84.43
	 -8.652	 -3.721	80.86
	 -12.452	 0.345	79.03
	 -12.452		73.92

¹⁴⁴ CHEN, H. F.; YAO, X.; PETITJEAN, M.; XIA, H.; YAO, J. H.; PANAYE, A.; DOUCET, J. P.; FAN, B. T. (2004). Insight into the bioactivity and metabolism of human glucagon receptor antagonists from 3D-QAR analyses. *QSAR Comb. Sci.*, 23, 603–619.

¹⁴⁵ SANTOS, C. B. R.; LOBATO, C. C.; BRAGA, L.; MORAIS, S. S. S.; SANTOS, C. F.; FERNANDES, C. P.; BRASIL, D. S. B.; HAGE-MELIM, L. I. S.; MACÊDO, W. J. C.; CARVALHO, J. C. T. (2014). Application of Hartree-Fock Method for Modeling of Bioactive Molecules Using SAR and QSPR. *Comput. Mol. Biosci.*, 4(1), 1–24, doi:10.4236/cmb.2014.41001.



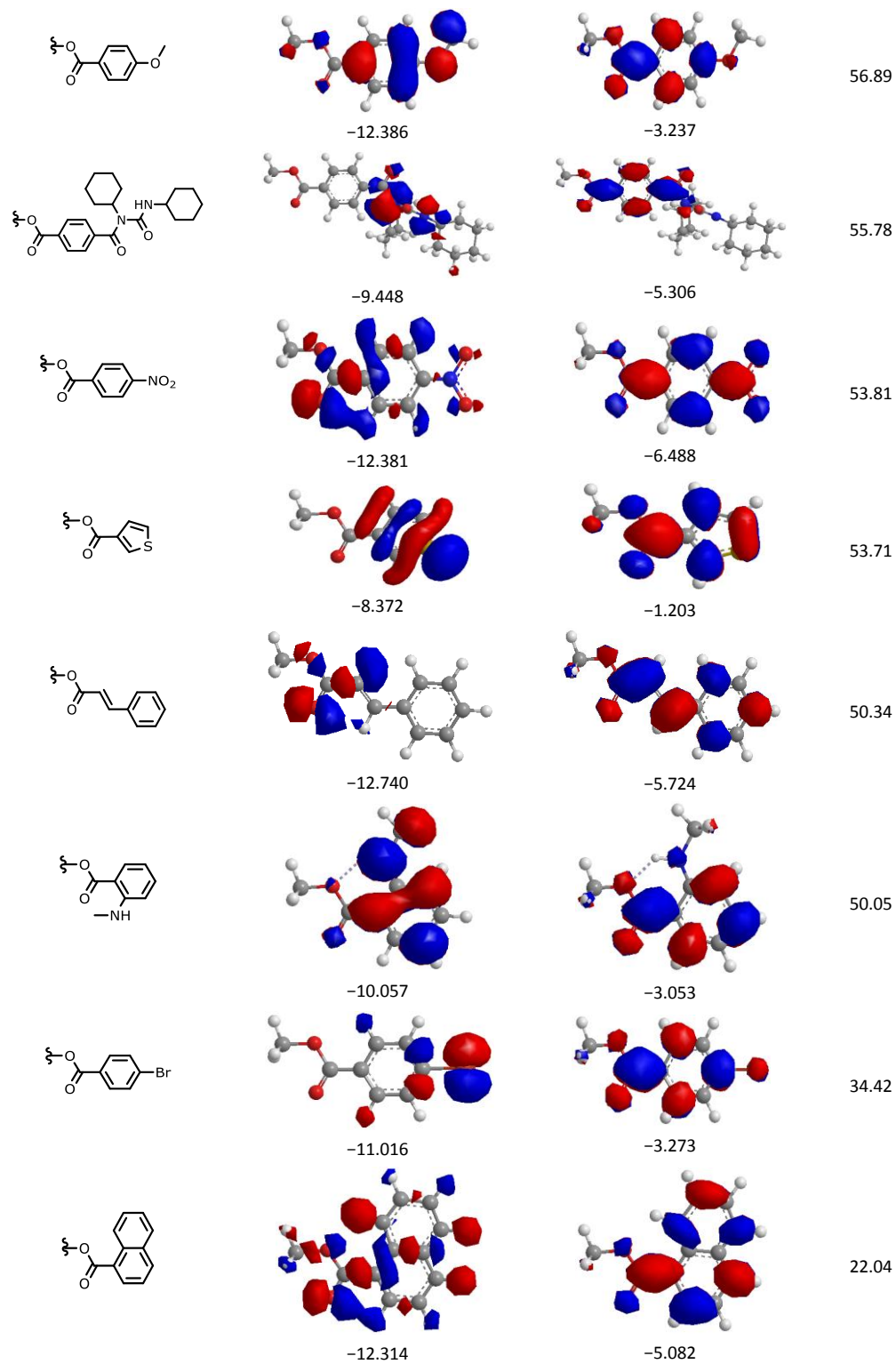


Fig. 3.116 | Cálculo teórico de HOMO y LUMO de los sustituyentes aromáticos, ordenados por actividad

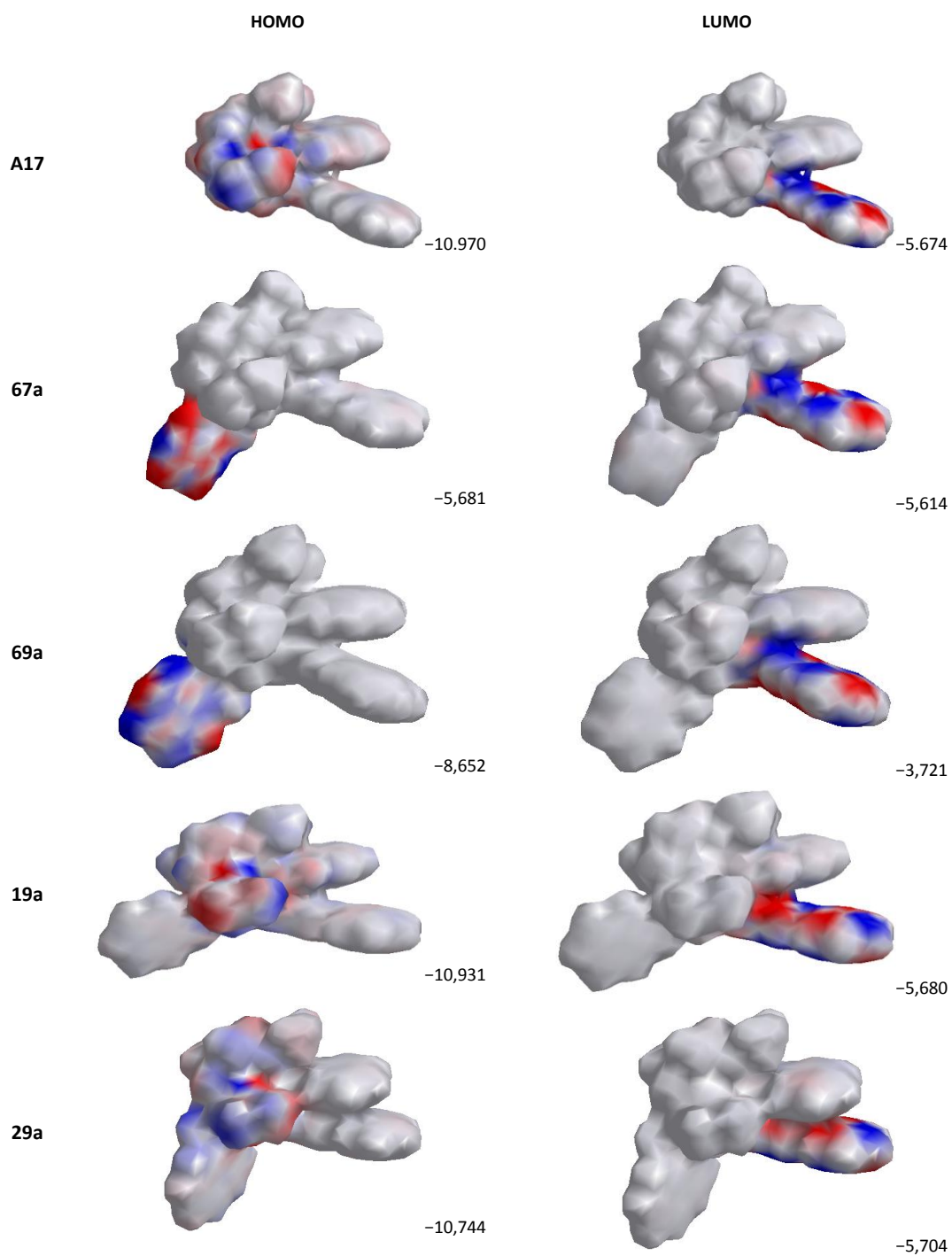


Fig. 3.117 | Cálculo teórico de HOMO y LUMO de cinco sesquiterpenos con ésteres aromáticos.

EFECTO DE HALOÉSTERES

La presencia de ésteres halogenados en C-6 no afecta la actividad, tal como se observa al comparar **A17** (86.68%) con **A18** (83.47%), **41a** (83.23%) y **38a** (82.65%), mientras que la presencia de un haloéster en C-4 disminuye la actividad (Fig. 3.118). En cuanto a la naturaleza del halógeno, resultó más efectivo el cloro que el bromo.

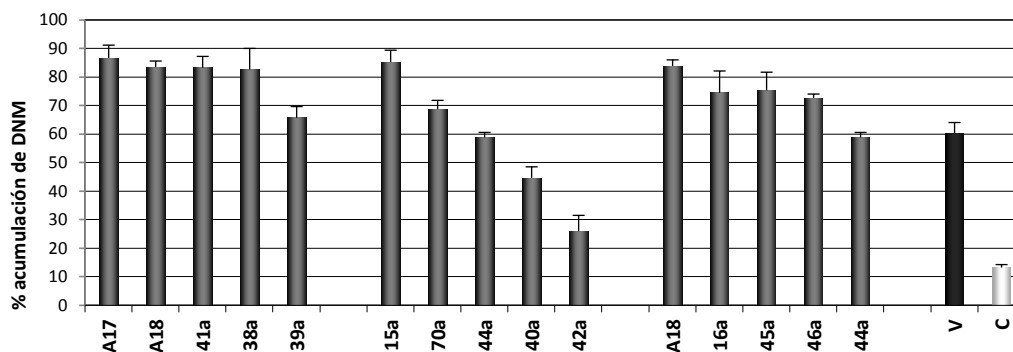


Fig. 3.118 | Efecto de haloésteres sobre la acumulación de DNM. Se indican los compuestos de partida (A17 y A18), compuestos de comparación sin halógeno (15a, 16a) y los compuestos con haloésteres. V: verapamilo, C: control.

EFECTO DE CARBOXIÉSTERES

Un análisis de la actividad revertidora de los análogos con carboxiésteres, alifáticos o aromáticos, mostró una disminución de la bioactividad, siendo moderada para los aromáticos y más drástica para los alifáticos. Por otro lado, en el caso de los carboxiésteres alifáticos, se observa una recuperación de la actividad cuando el ácido carboxílico libre se esterifica, mientras que, en los análogos aromáticos, la recuperación de la actividad es escasa y se ve afectada por la regiosustitución del anillo aromático. Estos resultados están de acuerdo con que la lipofilia de la molécula contribuye de forma significativa en la actividad.

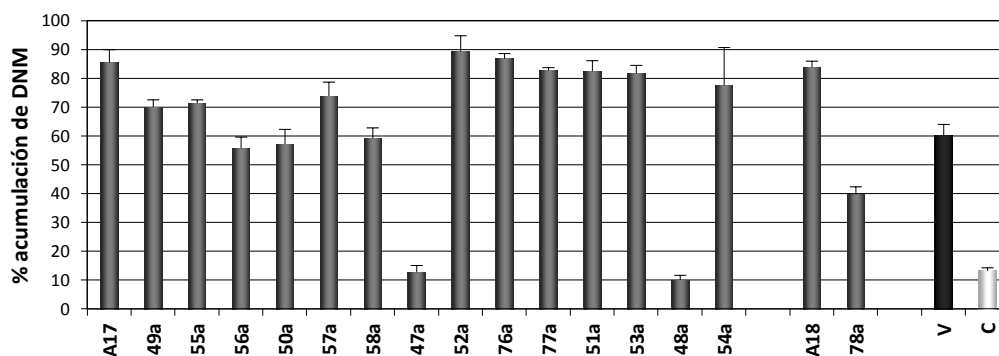


Fig. 3.119 | Porcentaje de acumulación de DNM en los derivados con carboxiésteres y sus correspondientes análogos.

EFEECTO DE AMINOÉSTERES

El análisis comparativo de los datos de los compuestos **A16** y **A17** con sus correspondientes análogos aminoésteres, nos permitió sacar las siguientes conclusiones (Fig. 3.120):

- La presencia de ésteres con nitrógeno terciario en C-6 dio lugar a análogos que conservan la actividad con respecto al producto de partida (**67a** y **68a**).
- Si el nitrógeno se encuentra en un arilaminoéster, la actividad revertidora se pierde de manera drástica (**65a** y **66a**).
- La actividad de los derivados con *N*-acilurea depende del tipo de espaciador que la une al sesquiterpeno. Así, cuando éste es alifático, la actividad no se ve afectada (**53a**), mientras que se pierde cuando el espaciador es aromático (**58a**, **56a**).
- La introducción de nitrógeno sobre el carbono C-4 mediante esterificación con bromoacilos y posterior sustitución nucleofílica con nucleófilos de nitrógeno (**59a**, **61a-64a** y **80a**), observamos ligeras modificaciones de la actividad revertidora con respecto al producto de partida **A18**.

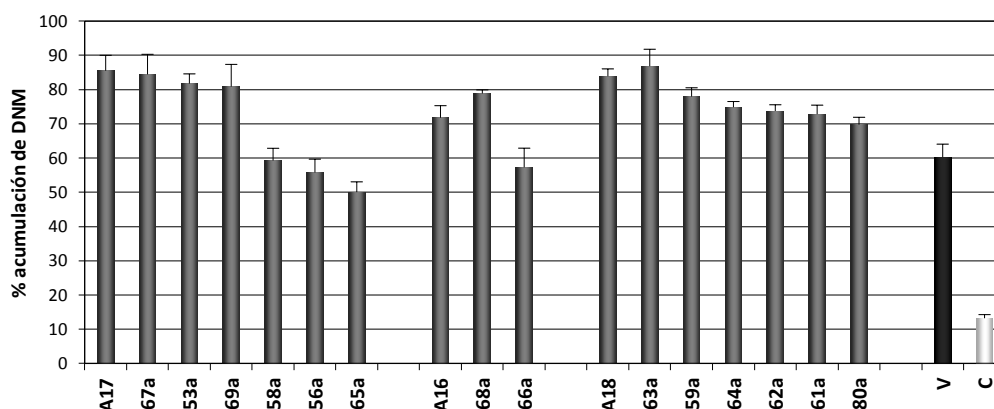


Fig. 3.120 | Porcentaje de acumulación de DNM en presencia de los derivados esterificados con aminoésteres y sus correspondientes productos de partida.

Sin embargo, estos resultados no están de acuerdo con los datos existentes en la bibliografía para estudios de requisitos estructurales imprescindibles para la actividad revertidora, en los cuales, además de los anillos aromáticos, la existencia de un nitrógeno terciario son imprescindibles para un buen revertidor¹¹⁷. Una vez más, estos datos ponen de manifiesto que los sesquiterpenos son una clase de productos revertidores novedosos.

EFECTO DE DIMERIZACIÓN

El análisis de los datos obtenidos para los compuestos homo- y heterodiméricos y comparación con los datos de compuestos estructuralmente relacionados (Fig. 3.121) nos permite concluir que este tipo de compuestos disminuyen la actividad revertidora. Al analizar los heterodímeros **A17**–chrisina (**81a** y **82a**), se observa que el espaciador es crucial en la actividad, siendo el derivado con un grupo succínico como espaciador cuatro veces más activo que aquel con un grupo glutárico. Estos resultados sugieren que la longitud, así como la rigidez del espaciador, juegan un papel importante en la actividad revertidora de este tipo de sesquiterpenos.

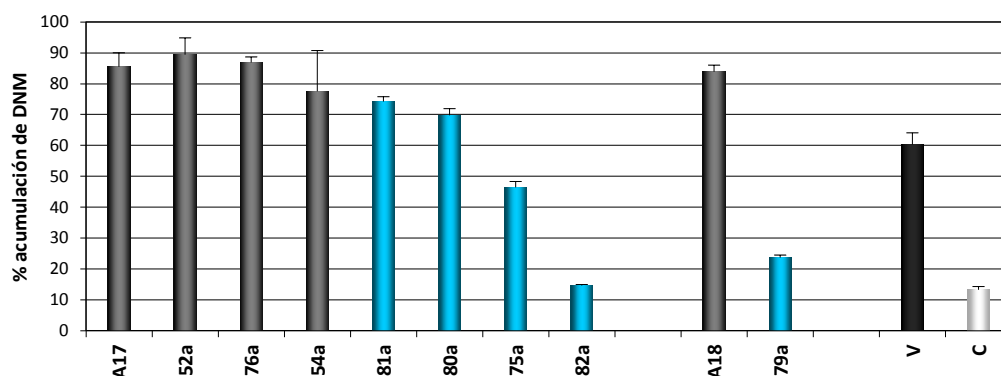


Fig. 3.121 | Porcentaje de acumulación de DNM en presencia de los dímeros (en azul) y sus correspondientes productos de partida.

Tabla 3.16 | Descriptores moleculares de los sesquiterpenos ensayados calculados con ChemBio3D Ultra 13.0.2.3021 tras optimización de las estructuras con el método MM2.

Compuesto	log P	MR	TPSA	ClogP	CMR	log S	pK _a	%DNM	±DE
02a	3.48	151.96	125.43	5.0434	15.594	-6.16	12.845	82.32	1.75
03a	4.36	166.78	134.66	7.5097	17.139	-7.33	13.168	87.48	5.47
04a	4.78	171.38	134.66	8.0387	17.603	-7.75	13.164	87.83	10.00
05a			134.66	10.1547	19.458	-9.41	13.162	64.86	5.01
06a	5.34	176.3	134.66	8.3477	18.066	-7.97	13.171	86.43	7.18
07a	5.63	176.24	134.66	8.2177	18.066	-7.74	13.182	71.96	3.73
08a	5.63	176.24	134.66	8.2842	18.066	-7.74	12.741	73.78	4.85
09a			140.73	10.3570	20.421	-9.24		71.44	2.97
10a	4.43	169.42	134.66	7.5647	17.465	-7.39	13.179	81.98	1.80
11a	5.68	183.22	134.66	9.0117	18.817	-8.86	13.166	73.72	3.88
13a			140.73	11.9450	21.922	-11.5		13.73	0.08
15a	3.94	171.39	140.73	7.8830	17.638	-8.04		85.22	4.21
17a			140.73	9.9140	19.780	-9.77		49.24	4.43
18a	5.27	183.79	134.66	8.4281	18.859	-8.52	13.197	58.23	0.01
19a	5.60	182.16	134.66	8.3935	18.722	-9.01	13.173	79.03	1.10
21a	5.48	189.41	143.89	8.5675	19.339	-9.07	13.178	56.89	8.47
22a	6.43	189.85	134.66	9.2565	19.499	-9.82	13.173	34.42	5.26
23a			177.53	5.1015	19.334	-9.14	13.169	53.81	1.00
24a	4.22	174.68	143.89	7.5695	17.936	-7.94	13.168	64.68	8.57
25a	4.16	175.63	143.89	7.5695	17.936	-7.90	13.159	67.03	4.05
26a	5.59	180.15	134.66	8.1160	18.532	-8.40	13.174	73.78	2.35

Compuesto	log P	MR	TPSA	ClogP	CMR	log S	pK _a	%DNM	±DE
27a	5.53	181.10	134.66	8.1160	18.532	-8.64	13.169	53.71	14.59
28a	5.95	192.93	134.66	8.9795	19.929	-9.36	13.186	50.34	3.74
29a	6.60	199.33	134.66	9.5675	20.410	-10.4	13.165	22.04	1.45
30a	5.83	191.52	140.73	9.6073	19.686	-9.92		65.85	4.83
31a	4.49	160.32	114.43	8.0040	16.497	-7.26		74.70	8.03
33a			140.73	10.7813	21.374	-11.3		44.30	1.75
34a	3.02	167.46	151.73	6.7035	17.048	-7.33	13.004	82.75	7.72
35a	4.11	149.40	97.36	6.7635	15.381	-7.24		77.98	10.80
36a	3.80	165.75	131.5	7.7268	16.870	-7.46		65.72	5.85
37a	3.85	170.96	137.9	7.5267	17.508	-7.14		80.21	5.57
38a	4.23	167.36	134.66	7.0937	17.166	-7.45	13.124	82.65	7.41
39a	5.01	165.65	114.43	8.1170	16.988	-7.58		65.73	3.94
40a	4.99	182.04	140.73	8.1090	18.621	-8.67		44.62	3.93
41a	4.35	170.33	134.66	7.2337	17.452	-7.70	13.128	83.23	4.02
42a	5.23	187.98	140.73	8.3890	19.192	-9.18		25.95	5.59
43a	6.38	195.52	134.66	9.1755	19.963	-9.81	13.172	70.38	1.77
44a	4.58	179.68	140.73	8.1360	18.415	-8.61		58.82	1.78
45a	5.15	188.19	140.73	8.9440	19.343	-9.17		75.29	6.42
46a			140.73	9.8520	20.271	-9.70		72.65	1.41
47a	3.37	172	171.96	6.7479	17.791	-7.04	3.984, 13.142	12.73	2.38
48a	3.79	176.6	171.96	7.1257	18.255	-7.32	4.458, 13.161	10.06	1.64
49a	5.16	188.98	171.96	8.3150	19.375	-9.10	4.177, 13.167	70.02	2.58
50a	5.16	188.98	171.96	8.3150	19.375	-9.14	3.873, 13.164	57.23	5.14
51a	3.64	177.44	160.96	7.2227	18.255	-7.19	13.144	82.51	3.68
52a	3.98	182.24	160.96	7.7517	18.719	-7.53	13.144	89.41	5.44
53a			184.07	10.9677	24.086	-11.30	13.145	81.76	2.82
54a	4.05	182.04	160.96	7.5777	18.719	-7.47	13.161	77.54	13.22
55a			160.96	8.8915	20.303	-9.60	13.165	71.38	1.21
56a			184.07	11.7785	25.670	-13.30	13.166	55.78	3.92
57a			160.96	8.8915	20.303	-9.63	13.162	73.92	4.85
58a			184.07	11.7785	25.670	-13.40	13.162	59.27	3.60
59a			152.76	8.7510	19.862	-8.38	6.901	77.95	2.57
61a			143.97	8.9584	19.862	-8.40	6.850	72.82	2.65
62a			143.97	9.2090	20.149	-8.72	6.649	73.74	1.82
63a			153.2	7.9950	19.838	-7.82	4.615	86.81	4.98
64a			147.21	7.1204	20.517	-7.91	0.922, 8.582	74.84	1.67
65a	5.10	191.35	146.69	8.9433	19.555	-9.41	13.162	50.05	3.00
67a	3.35	178.15	159.38	5.60911	18.300	-8.66	13.127	84.43	5.88
69a	4.27	180.64	147.02	7.0495	18.511	-8.16	13.136	80.86	6.50
70a	4.26	150.97	108.36	7.1682	15.533	-6.36	13.035	68.77	3.08
71a	5.93	158.93	88.13	8.3970	16.388	-8.62		76.51	4.57
73a	3.50	150.83	128.59	6.9090	15.433	-6.09	12.929, 15.187	86.23	0.90
74a	4.63	149.61	108.36	7.5603	15.280	-6.61	13.077	77.86	2.59
75a			321.92	13.2816	35.776	-14.10	13.143	46.41	1.91
76a			181.19	6.6762	18.594	-6.47	13.143, 13.787	86.88	1.79
77a			181.19	8.0782	20.271	-7.79	13.142, 13.657	82.92	0.85
78a			178.03	8.0530	19.682	-8.26	4.637	39.66	2.76
79a			281.46	14.8215	36.027	-16.60		23.67	0.83
80a			287.94	13.6399	37.514	-15.90	0.568	69.77	2.15
81a			198.26	10.8092	24.288	-11.40	5.882, 13.148	74.23	1.56
82a			198.26	11.1858	24.752	-11.70	6.100, 13.161	14.63	0.32
A17	3.48	152.68	128.59	6.8009	15.712	-6.45	12.960, 15.189	86.68	5.64
A18	3.71	162.03	134.66	6.9807	16.675	-7.13	13.161	83.47	4.75

log P: lipofilia expresada como logaritmo del coeficiente de partición. MR: tamaño de la molécula expresada como índice de refracción molecular. TPSA: área de la superficie polar topológica. ClogP: lipofilia expresada como logaritmo del coeficiente de partición basado en fragmentos. CMR: tamaño de la molécula expresada como índice de refracción molecular calculado. log S: solubilidad acuosa. pK_a: logaritmo negativo de la constante de disociación ácida. %DNM: porcentaje de acumulación de DNM.

Determinación de la constante de inhibición K_i

Se determinó la constante de inhibición K_i , que se define como la concentración de sesquiterpeno que inhibe un 50% del transporte de DNM mediado por la Pgp, de los 29 sesquiterpenos que presentaron una acumulación intracelular de DNM mayor del 75% en el ensayo de citometría de flujo (Fig. 3.122).

Tabla 3.17 | Constante de inhibición K_i de los compuestos seleccionados. Los resultados se expresan como el valor medio \pm desviación estándar (DE) de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

Compuesto	K_i (μM)	Compuesto	K_i (μM)	Compuesto	K_i (μM)
P32	0.13 \pm 0.06	P43	0.32 \pm 0.01	P45	0.54 \pm 0.07
P168A	0.19 \pm 0.03	P204	0.40 \pm 0.11	P41A	0.60 \pm 0.11
P137	0.23 \pm 0.04	P64	0.41 \pm 0.07	P13	0.61 \pm 0.13
P131	0.24 \pm 0.02	P38B	0.42 \pm 0.15	P16	0.63 \pm 0.17
P15B	0.25 \pm 0.02	P170A	0.46 \pm 0.09	P203	0.63 \pm 0.11
P168	0.26 \pm 0.03	P171	0.47 \pm 0.07	P28	1.21 \pm 0.15
V1	0.28 \pm 0.02	P15	0.50 \pm 0.06	P54B	1.34 \pm 0.21
V2	0.29 \pm 0.07	P41B	0.50 \pm 0.04	P120	1.52 \pm 0.28
P1	0.31 \pm 0.05	P146D	0.50 \pm 0.18	P38	1.74 \pm 0.65
P151	0.31 \pm 0.02	P109	0.52 \pm 0.08		

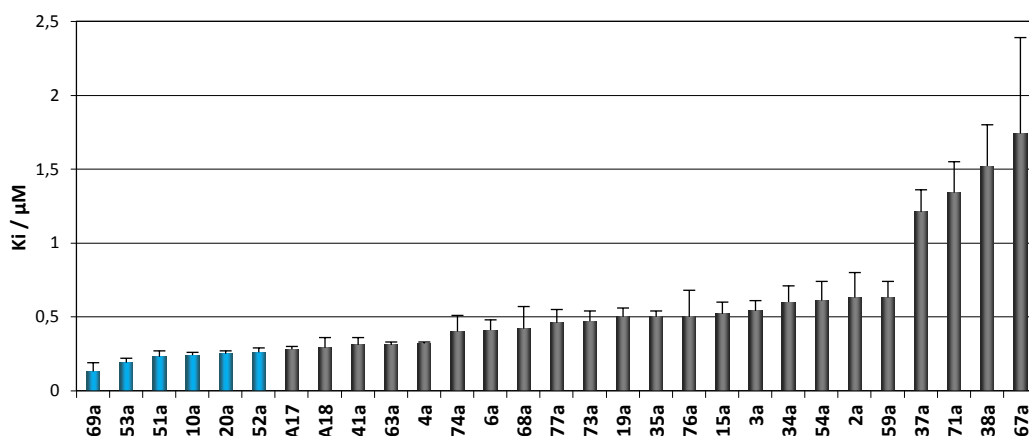


Fig. 3.122 | Representación gráfica de las constantes de inhibición (K_i) de los sesquiterpenos ensayados.

El análisis de los valores de las K_i obtenidos para los 29 sesquiterpenos evaluados nos permitió obtener las siguientes conclusiones:

- Todos los sesquiterpenos evaluados presentaron una K_i inferior a 2.0 μM .
- Seis sesquiterpenos presentaron una K_i menor que el producto de partida A17 (69a > 53a > 51a \geq 10a \geq 20a \geq 52a > A17).

Estos datos indican el alto grado de afinidad de estos sesquiterpenos por la Pgp, ya que inhiben el transporte de DNM a concentraciones submicromolares.

Determinación de la citotoxicidad y selectividad

Con la finalidad de completar el estudio de esta quimioteca, se realizó un ensayo de toxicidad intrínseca frente a las líneas celulares NIH-3T3, tanto transfectadas como sensibles a fármacos. Los datos obtenidos se muestran en la Tabla 3.18.

Los compuestos que produjeron un crecimiento de las células MDR1 por debajo de un 60% fueron descartados para el siguiente estudio, el análisis de reversión a DNM o VNB, puesto que en estos casos no podemos distinguir si la muerte de las células es debida al efecto de DNM o VNB o del propio compuesto.

Tabla 3.18 | Citotoxicidad intrínseca de los sesquiterpenos seleccionados en células NIH-3T3 MDR1 y parentales (NIH-3T3). Los resultados se expresan como el porcentaje de crecimiento celular \pm la desviación estándar ($P < 0.05$) de tres experimentos independientes, realizados por triplicado, con respecto a un control sin tratar.

Compuesto	células MDR1	células parentales	Compuesto	células MDR1	células parentales
67a	93.6 \pm 4.1	86.0 \pm 7.5	35a	73.3 \pm 0.5	85.6 \pm 2.1
15a	86.0 \pm 6.8	72.0 \pm 3.0	37a	71.9 \pm 4.2	84.6 \pm 5.3
34a	82.8 \pm 1.3	86.8 \pm 2.1	59a	69.3 \pm 5.1	65.3 \pm 7.1
63a	81.0 \pm 4.2	97.7 \pm 0.4	69a	66.2 \pm 5.7	67.2 \pm 4.8
verapamilo	80.8 \pm 1.1	96.0 \pm 3.6	77a	64.3 \pm 5.1	77.1 \pm 8.0
2a	79.6 \pm 1.4	62.4 \pm 5.2	74a	63.9 \pm 4.7	80.4 \pm 5.3
68a	79.0 \pm 1.2	92.8 \pm 2.3	54a	63.6 \pm 0.2	95.3 \pm 2.2
71a	77.5 \pm 1.2	82.5 \pm 4.6	3a	62.3 \pm 4.1	86.0 \pm 2.5
76a	75.6 \pm 7.1	92.3 \pm 2.2	6a	62.0 \pm 3.7	82.3 \pm 5.1
19a	75.0 \pm 6.1	61.4 \pm 3.5	52a	59.1 \pm 1.1	81.5 \pm 5.3
53a	74.9 \pm 6.7	65.9 \pm 6.4	4a	56.4 \pm 1.7	69.0 \pm 5.3
73a	73.9 \pm 6.8	80.1 \pm 4.4	51a	52.6 \pm 8.7	70.3 \pm 3.1
A17	73.8 \pm 2.1	84.8 \pm 2.3	10a	46.1 \pm 2.0	79.8 \pm 0.1
20a	73.7 \pm 4.7	85.3 \pm 5.4	41a	6.5 \pm 0.1	7.5 \pm 2.4
A18	73.6 \pm 1.7	73.8 \pm 4.9	38a	1.8 \pm 0.1	2.9 \pm 1.4

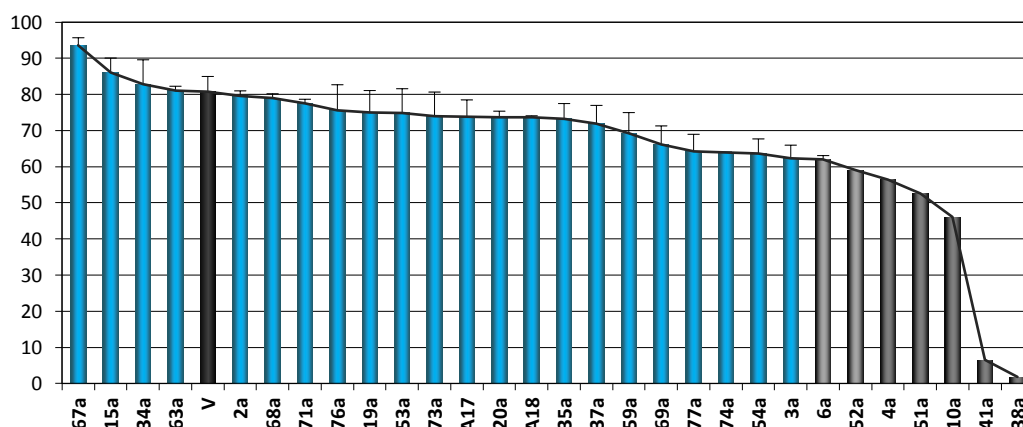


Fig. 3.123 | Representación gráfica de la citotoxicidad de los sesquiterpenos según Tabla 3.18.

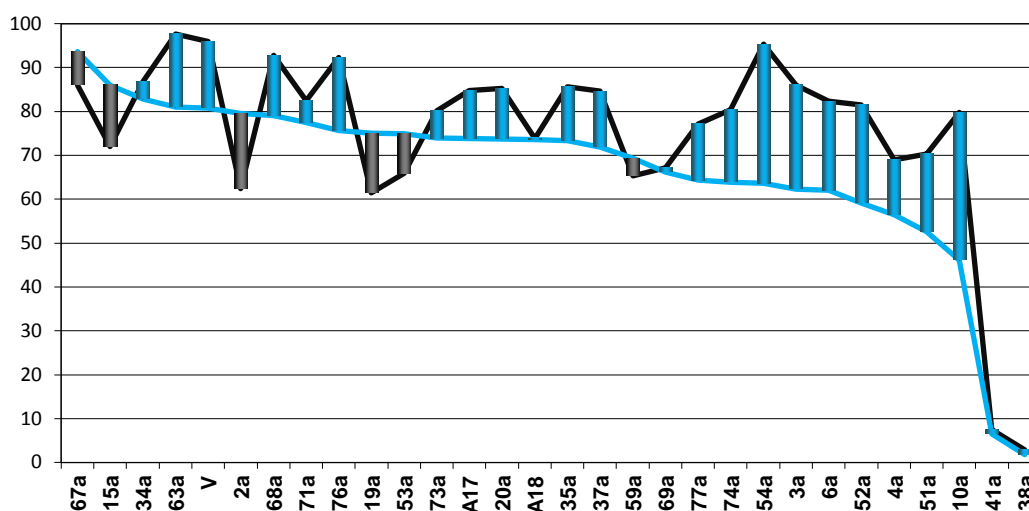


Fig. 3.124 | Selectividad de los compuestos entre células parentales (línea gris) y MDR-1 (línea azul). Los compuestos con las barras azules resultaron selectivos frente a células MDR-1.

En análisis de los datos obtenidos en el ensayo de citotoxicidad, nos indica:

- 23 sesquiterpenos presentan valores bajos de toxicidad intrínseca (< 40%) en ambas líneas celulares.
- 20 de los compuestos presentaron selectividad frente a la línea celular MDR-1 y, a su vez, una baja citotoxicidad (< 70%) en células parentales (Fig. 3.124).
- Los compuestos **67a** < **15a** < **34a** < **63a** exhiben una citotoxicidad intrínseca inferior al control positivo verapamilo, mientras que **34a** y **63a** presentan una citotoxicidad y selectividad similar.
- Dos compuestos destacan por su alto grado de citotoxicidad [**41a** (7.5 y 6.5%), **38a** (2.9 y 1.8%) en células parentales y MDR-1, respectivamente]. Este resultado, aunque desfavorable como potenciales quimiomoduladores, es novedoso, ya que los sesquiterpenos ensayados en nuestro grupo de investigación han mostrado baja o nula citotoxicidad, abre una nueva línea de trabajo para el estudio de este tipo de compuestos como anticancerígenos.

Determinación de la efectividad de los metabolitos en revertir la MDR con daunomicina y vinblastina

A continuación se realizaron estudios de la modulación de la sensibilidad a daunomicina (DNM) y vinblastina (VNB) de estos sesquiterpenos, determinada usando el ensayo colorimétrico MTT. Las concentraciones de sesquiterpeno ensayadas fueron 1.0, 3.0 y 10.0 μM .

Tabla 3.19 | Índice de reversión^a de la resistencia a fármacos (DNM o VNB) en células NIH-3T3 MDR1 de los sesquiterpenos ensayados.

Compuesto	Índice de reversión con DNM ^b			Índice de reversión con VNB ^c		
	1 μM	3 μM	10 μM	1 μM	3 μM	10 μM
67a	2.31 ± 0.21	3.96 ± 0.85	9.02 ± 0.64	3.66 ± 0.25	8.83 ± 1.55	20.63 ± 1.25
76a	2.56 ± 0.23	7.54 ± 1.87	10.62 ± 1.81	6.47 ± 0.88	26.84 ± 1.74	145.94 ± 1.64
68a	3.22 ± 0.91	5.23 ± 2.15	9.00 ± 2.53	5.17 ± 1.26	18.67 ± 2.45	39.58 ± 4.43
73a	3.27 ± 0.17	8.09 ± 2.79	11.64 ± 3.00	11.10 ± 2.22	23.56 ± 2.40	43.75 ± 6.13
77a	3.89 ± 0.66	10.98 ± 2.81	12.84 ± 2.05	9.94 ± 1.30	40.25 ± 4.27	107.76 ± 7.62
20a	4.12 ± 1.10	14.49 ± 2.92	14.67 ± 4.30	15.52 ± 1.93	30.06 ± 5.86	59.49 ± 4.78
71a	5.19 ± 0.27	12.93 ± 1.30	14.79 ± 5.13	11.61 ± 3.15	33.03 ± 11.85	113.88 ± 9.22
2a	5.19 ± 1.48	10.38 ± 0.66	15.86 ± 2.83	11.61 ± 1.51	29.37 ± 7.54	106.30 ± 6.79
6a	5.27 ± 1.03	16.40 ± 4.73	19.48 ± 3.29	15.59 ± 0.70	83.37 ± 5.00	148.45 ± 6.94
A17	5.58 ± 0.24	9.07 ± 0.29	15.13 ± 4.71	23.72 ± 2.10	30.25 ± 2.48	86.63 ± 8.45
63a	5.66 ± 1.42	10.89 ± 3.38	16.05 ± 1.65	21.07 ± 0.91	49.57 ± 0.77	173.38 ± 9.35
74a	5.73 ± 1.47	8.50 ± 1.34	13.12 ± 0.89	15.05 ± 3.61	31.57 ± 6.28	90.96 ± 6.53
35a	5.88 ± 3.37	8.69 ± 2.41	15.56 ± 1.20	15.17 ± 1.51	75.80 ± 3.11	125.21 ± 8.87
54a	5.95 ± 1.08	12.32 ± 2.70	15.89 ± 3.17	7.53 ± 1.95	37.72 ± 6.92	103.63 ± 8.54
19a	6.21 ± 1.11	10.07 ± 2.34	17.52 ± 4.01	13.88 ± 1.63	33.57 ± 7.20	126.19 ± 8.65
15a	6.88 ± 3.20	10.32 ± 1.63	15.15 ± 3.27	21.23 ± 4.39	58.16 ± 1.18	91.66 ± 9.78
34a	6.96 ± 1.55	11.08 ± 1.57	16.26 ± 0.18	18.46 ± 3.21	86.58 ± 7.19	149.19 ± 8.79
A18	7.19 ± 0.94	10.57 ± 0.82	13.54 ± 2.03	28.46 ± 1.86	38.95 ± 2.83	135.39 ± 9.05
59a	10.03 ± 2.13	15.06 ± 0.41	22.24 ± 2.81	20.57 ± 1.55	49.09 ± 7.11	82.86 ± 5.45
3a	10.76 ± 3.50	11.50 ± 1.71	12.43 ± 0.52	19.12 ± 3.63	69.03 ± 3.30	110.90 ± 6.43
69a	11.77 ± 2.12	14.69 ± 1.31	16.13 ± 0.81	17.39 ± 7.08	56.01 ± 0.60	113.48 ± 9.73
37a	11.82 ± 5.24	13.94 ± 3.17	16.30 ± 2.80	11.19 ± 0.92	37.73 ± 6.40	90.22 ± 9.28
53a	15.83 ± 4.17	19.53 ± 3.04	24.92 ± 1.99	27.35 ± 2.64	36.10 ± 3.47	89.96 ± 7.53
verapamilo ^d	2.84 ± 0.22	6.23 ± 2.41	10.84 ± 2.12	8.66 ± 1.13	27.84 ± 2.55	129.88 ± 4.23

^a Índice de reversión (I.R.): relación entre CI_{50} de las células sin sesquiterpeno y CI_{50} de las células con sesquiterpeno. Los resultados se expresan como porcentajes de crecimiento celular \pm desviación estándar ($P < 0.05$) de dos experimentos independientes realizados por triplicado. ^b El índice máximo de reversión con DNM (relación entre las células MDR y células sensibles a fármaco) es de 22. ^c El índice máximo de reversión con VNB (relación entre las células MDR y células sensibles a fármaco) es de 152.

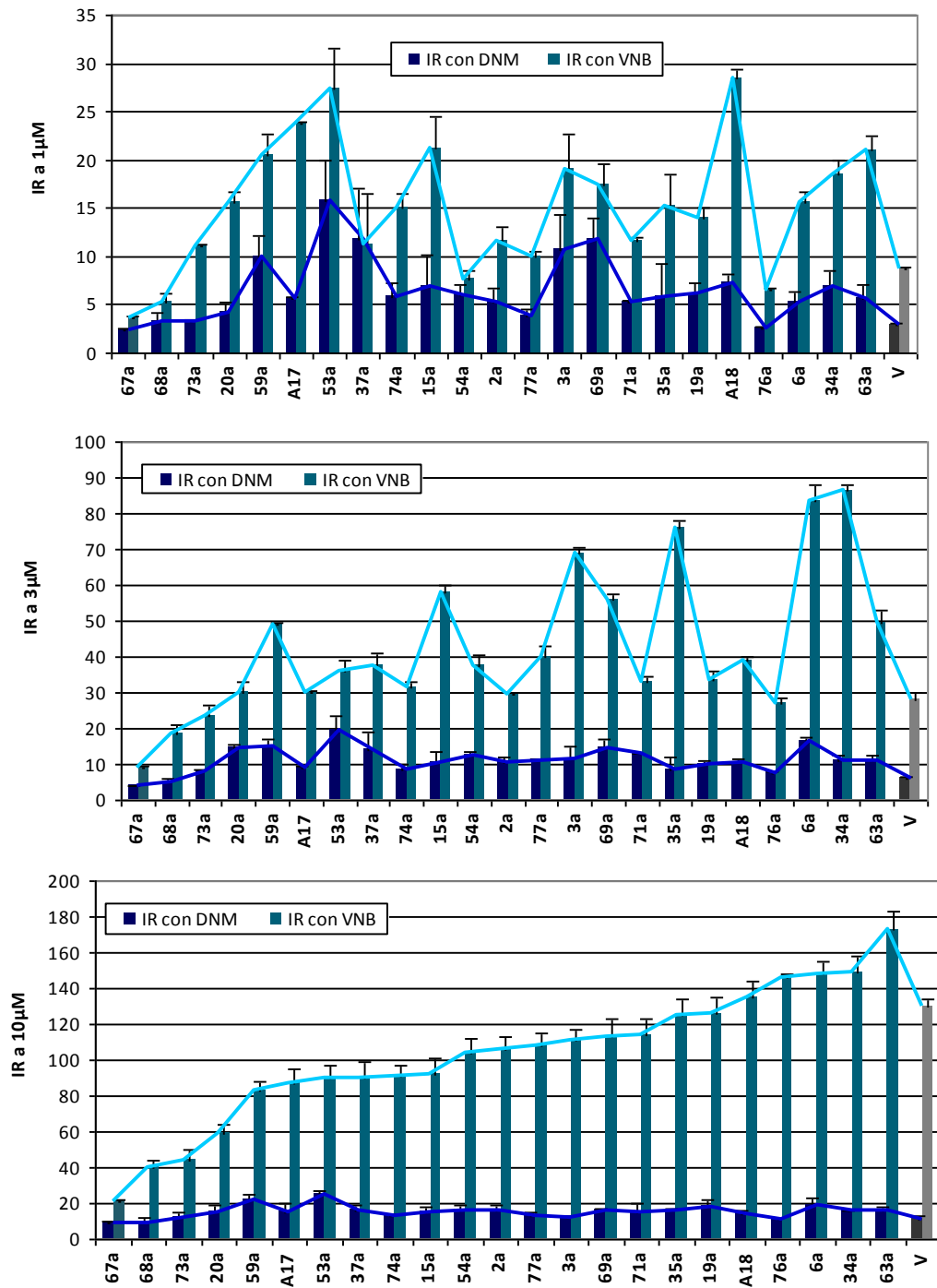


Fig. 3.125 | Índice de reversion (I.R.) de los 23 sesquiterpenos seleccionados en los ensayos de citotoxicidad. Los compuestos se ordenan por su I.R. en presencia de DNM de manera creciente.

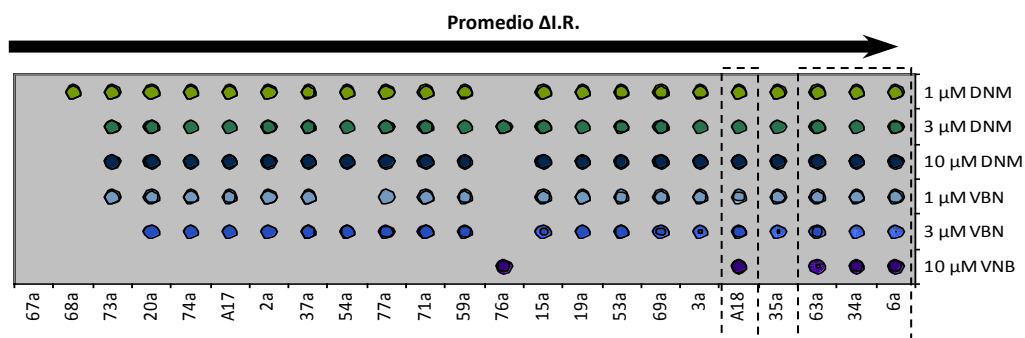


Fig. 3.126 | Comparación de los índices de reversión (I.R.) a las concentraciones de 1, 3 y 10 μM de sesquiterpeno con DNM y VNB en comparación con el verapamilo. ($\Delta\text{I.R.} = \text{I.R.}_{\text{Sesquiterpeno}} - \text{I.R.}_{\text{A17}}$).

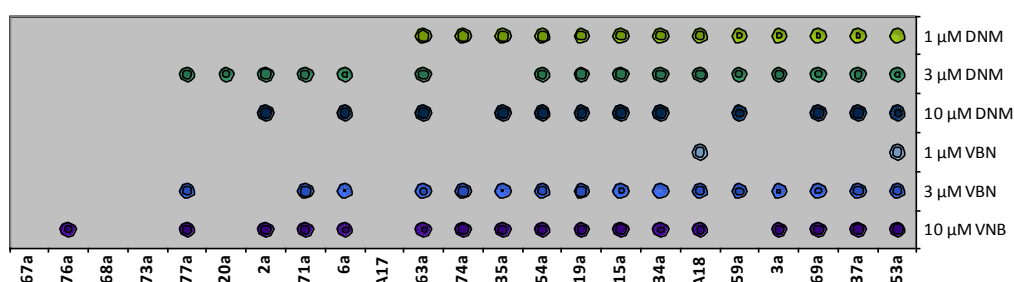


Fig. 3.127 | Comparación de los índices de reversión (I.R.) a las concentraciones de 1, 3 y 10 μM de sesquiterpeno con DNM y VNB en comparación con el producto de partida A17. ($\Delta\text{I.R.} = \text{I.R.}_{\text{Sesquiterpeno}} - \text{I.R.}_{\text{A17}}$).

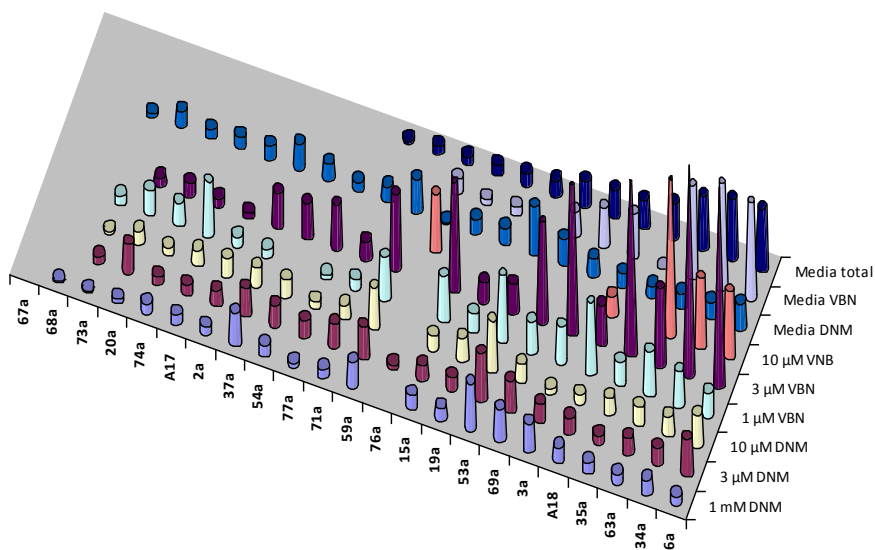


Fig. 3.128 | Comparación de los índices de reversión (I.R.) a las concentraciones de 1, 3 y 10 μM de sesquiterpeno con DNM y VNB en comparación con el verapamilo. ($\Delta\text{I.R.} = \text{I.R.}_{\text{Sesquiterpeno}} - \text{I.R.}_{\text{A17}}$). La magnitud de I.R. se corresponde con la altura del cono.

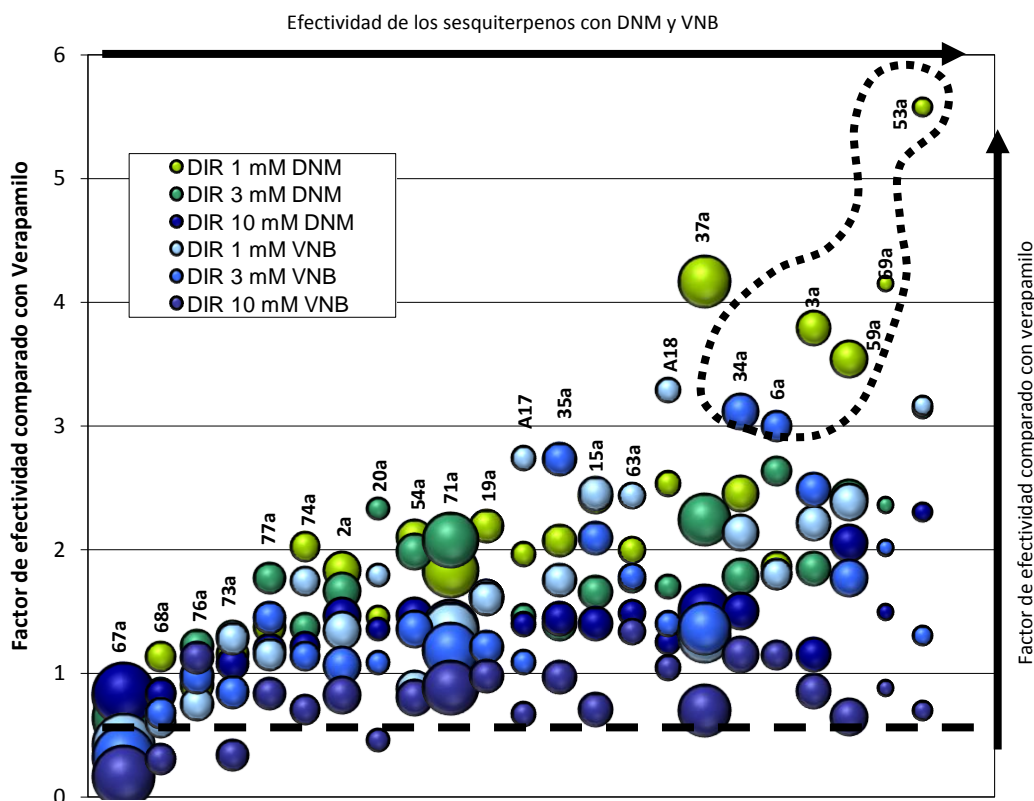


Fig. 3.129 | Comparación de los índices de reversión de la MDR (VNB, DNM) de los análogos con verapamilo. El tamaño de la esfera se corresponde con la afinidad de los sesquiterpenos (K_i). Los compuestos con un factor > 1 son más activos que verapamilo. Los análogos más prometedores son aquellos que se encuentran en el área remarcada.

La determinación del **índice de reversión** (I. R.) de los sesquiterpenos seleccionados en el ensayo de citotoxicidad (Tabla 3.19, Fig. 3.125–3.129), tanto con DNM como con VNB, nos permitió determinar la eficacia de los sesquiterpenos para revertir la resistencia al fármaco. El análisis de los resultados obtenidos nos permitió sacar las siguientes conclusiones:

- Los compuestos **A18**, **63a**, **34a** y **6a**, a todas las concentraciones ensayadas con DNM y VNB, presentan valores de I.R. superiores al control positivo verapamilo.
- Los compuestos **53a** y **A18** presentan los mejores índices de reversión a la concentración de 1 μM en la línea resistente con VNB con valores de actividad superiores al triple que el control positivo.
- Los compuestos **53a**, **69a** y **37a**, a la concentración de 1 μM en la línea resistente con DNM, muestran los mejores índices de reversión, siendo los

compuestos **37a** y **69a** cuatro veces y el compuesto **53a** 5.5 veces superior a verapamilo.

- Los compuestos **63a**, **54a**, **19a**, **15a**, **34a**, **59a**, **69a**, **37a** y **53a**, a todas las concentraciones ensayadas con DNM, presentan valores de I.R. superiores que el *cabeza de serie* **A17**.
- Los compuestos **A18** y **53a**, a todas las concentraciones ensayadas con VNB, presentan valores de I.R. superiores que **A17**.
- El compuesto **53a**, a todas las concentraciones con DNM y VNB, resulta más efectivo que **A17**.
- La comparación de los índices de reversión de DNM y VNB en la línea NIH-3T3 MDR1, indicó que la eficacia de los sesquiterpenos en revertir la MDR es mayor para vinblastina, resultados que están de acuerdo con estudios previos realizados dentro de esta línea de investigación.

Un estudio conjunto de la afinidad (K_i) y de los índices de reversión nos permite concluir que los mejores compuestos de esta quimioteca son **53a**, **69a**, **3a**, **59a**, **6a** y **34a** según se puede observar en la Fig. 3.129.

Conclusión

Los resultados obtenidos muestran que este tipo de sesquiterpenos naturales y sus análogos son prometedores como quimiomoduladores de la multirresistencia a fármacos en cáncer, presentando como características más relevantes una alta afinidad a la glicoproteína P, una baja toxicidad, excelentes índices de reversión y, además, son compuestos no transportados por este tipo de proteína.

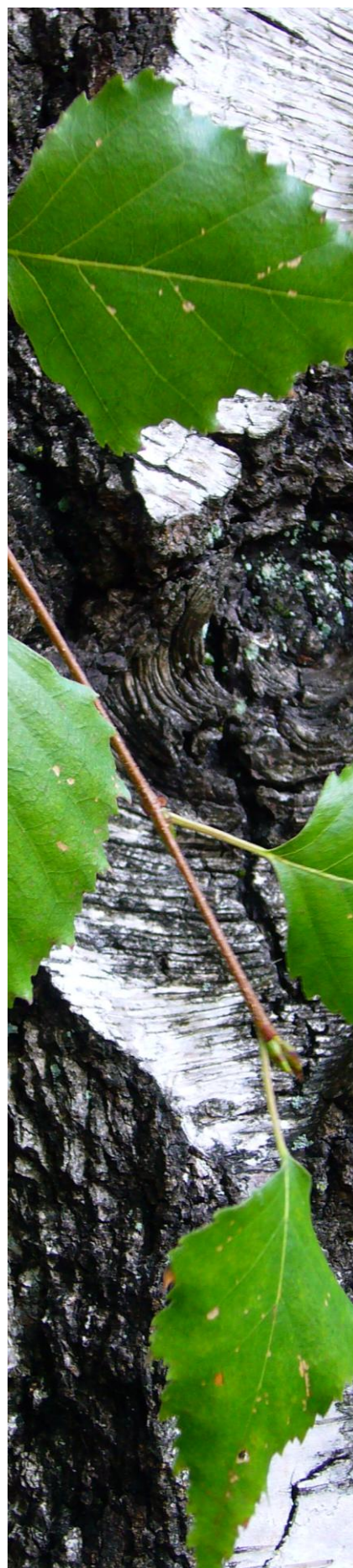
Los resultados de nuestra investigación, avalan futuros estudios para el desarrollo de este tipo de metabolitos como fármacos clínicamente útiles para revertir el fenómeno de la multirresistencia en enfermedades parasitarias o en cáncer.

IV

Capítulo

TRITERPENOS DE LA SERIE DE LUPANO Y SU POTENCIAL ANTI-VIH

TRITERPENOS PENTACÍCLICOS



4 | LOS TRITERPENOS DE LA SERIE DE LUPANO Y SU POTENCIAL ANTI-VIH

4.1 | INTRODUCCIÓN

Triterpenos y triterpenoides

Los **terpenos**, como hemos comentado en el capítulo anterior de esta Memoria de Tesis, constituyen el grupo de productos naturales más amplio, ubicuo y estructuralmente diverso. Entre los diversos grupos de terpenos destacan los **triterpenos** (C₃₀), compuestos constituidos por seis unidades de isopreno mediante una serie de reacciones de condensación intramolecular y con una gran variedad estructural.

Biosintéticamente, estos compuestos se forman por la unión *cola-cola* de dos unidades de difosfato de farnesilo (FPP, C₁₅), seguido por la formación de escualeno con la participación de varios sistemas enzimáticos. La posterior ciclación del intermedio 2,3-epoxiesqualeno y las diferentes formas de plegamiento en la superficie del enzima son responsables de la diversidad de esqueletos triterpénicos, tanto tetra- como pentacíclicos. Así, si el plegamiento del epoxiesqualeno se aproxima a una conformación de *silla-bote-silla-bote*, da lugar a la formación de un catión protosterilo, precursor de los esteroides, lanosterol y cycloartenol. Si el plegamiento resulta en una conformación de *silla-silla-silla-bote*, se origina el catión dammarenilo. Posteriores transposiciones del carbocatión dan lugar a los cationes baccharenilo y lupenilo, precursores de los triterpenos pentacíclicos¹ (Fig. 4.1). Posteriores reacciones de eliminación de protón o hidroxilación dan lugar a una amplia variedad estructural², generando de esta manera los casi 200 esqueletos de triterpenoides identificados de fuentes naturales hasta la fecha,³.

¹ DEWICK, P. M. (2009). *Medicinal Natural Products: A biosynthetic approach*. (3^a ed.) Oxford, UK: Wiley-Blackwell.

² CHRISTIANSON, D. W. (2008). Unearthing the roots of the terpenome. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 12, 141–150.

³ SHANMUGAM, M. K.; NGUYEN, A. H.; KUMAR, A. P.; TAN, B. K. H.; SETHI, G. (2012). Targeted inhibition of tumor proliferation, survival and metastasis by pentacyclic triterpenoids: Potential role in prevention and therapy of cancer. *Cancer Lett.*, 320, 158–170.

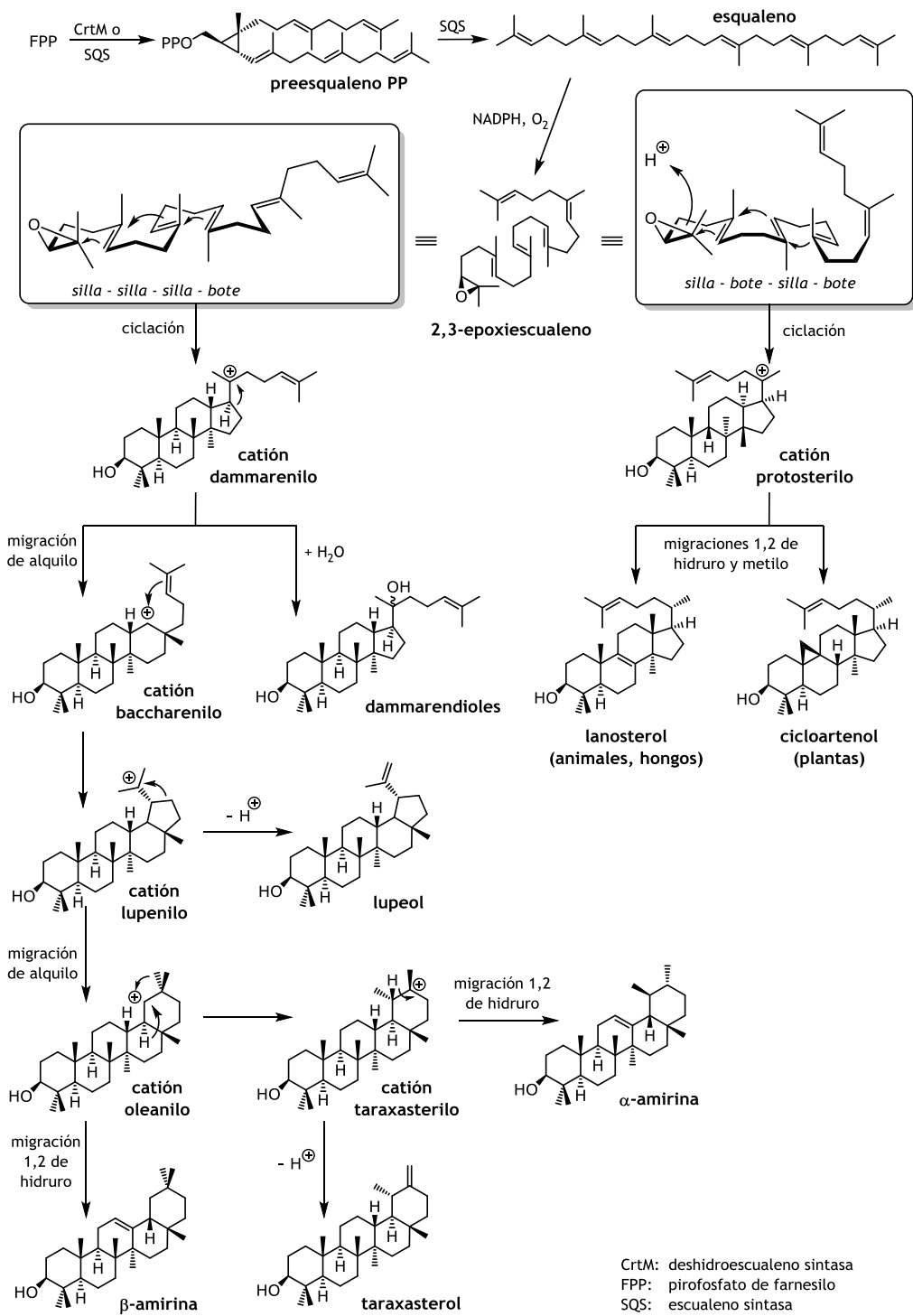


Fig. 4.1 | Ruta biosintética de triterpenos tetracíclicos y pentacíclicos.

Los **enzimas responsables** de estas transformaciones son las escualeno **ciclasas** o oxidoescualeno ciclasas específicas, que catalizan la ciclación del 2,3-oxidoescualeno⁷. Como ejemplos, se pueden nombrar la lupeol sintasa, α -amirina sintasa y β -amirina sintasa, que convierten el oxidoescualeno en lupeol, α -amirina y β -amirina, respectivamente⁴. Cabe destacar, que la especificidad del enzima puede variar drásticamente: así, por ejemplo, la aristoloqueno sintasa es altamente específica generando un único producto, mientras que enzimas promiscuos como la γ -humuleno sintasa, genera 52 productos, entre los cuales el γ -humuleno constituye sólo un 28.6%^{5,6}.

La mayoría de las modificaciones posteriores a la ciclación se realizan con la participación de **citocromo P450 monooxigenasas** (CYPs), y de hecho la subfamilia citocromos CYP716A se encuentra altamente conservada en las plantas⁷. Procesos tales como la introducción de hidroxilo, cetona, aldehído o carboxilo, diversifican el esqueleto triterpénico, incluyendo la posibilidad posterior glicosilación para formar las saponinas⁷. Así, por ejemplo, varios pasos de oxidación de un grupo metilo en los esqueletos triterpénicos de lupeol, α -amirina o β -amirina, generan el ácido betulínico, ácido oleanólico o ácido ursólico⁴. Este conjunto de ciclasas y oxigenasas da lugar a una quimioteca de más de 65.000 terpenoides, también conocida como terpenoma².

Actualmente, se han localizado **triterpenoides** en prácticamente todos los **organismos**. La razón es que su ruta biosintética se remonta hasta los orígenes de la vida y, de hecho, se han encontrado triterpenoides en fósiles de numerosas formaciones y sedimentos geológicos⁸. En bacterias y eucariotas, incluyendo animales, hongos, plantas, protistas ameboides y cinetoplástidos, las **rutas biosintéticas de los hopanoides y esteroides** están altamente conservadas. Así, los hopanopolioides son producidos por una gran cantidad de bacterias. Sin embargo, la biosíntesis de esteroides es escasa en bacterias y ausente en cianobacterias, pero está omnipresente en las eucariotas. Ello indica que los pasos iniciales en la biosíntesis de esteroides se remontan al último ancestro común universal (LUCA) de eucariota. Así, por ejemplo, los 2-metilhopanoides se han encontrado en rocas con una antigüedad de más de 2715

⁴ HUANG, L.; LI, J.; YE, H.; LI, C.; WANG, H.; LIU, B.; ZHANG, Y. (2012). Molecular characterization of the pentacyclic triterpenoid biosynthesis pathway in *Catharanthus roseus*. *Planta*, 236, 1571–1581.

⁵ CHRISTIANSON, D. W. (2008). Unearthing the roots of the terpenome. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 12, 141–150.

⁶ HAMMER, S. C.; SYRÉN, P.-O.; SEITZ, M.; NESTL, B. M.; HAUER, B. (2013). Squalene hopene cyclases: highly promiscuous and evolvable catasysts for stereoselective C-C and C-X bond formation. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 17, 293–300.

⁷ FUKUSHIMA, E. O.; SEKI, H.; OHYAMA, K.; ONO, E.; UMEMOTO, N.; MIZUTANI, M.; SAITO, K.; MURANAKA, T. (2011). CYP716A Subfamily members are multifunctional oxidases in triterpenoid biosynthesis. *Plant Cell Physiol.*, 51(12), 2050–2061.

⁸ TAYLOR, R. F. (1984). Bacterial Triterpenoids. *Microbiol. Rev.*, 48(3), 181–198.

millones de años⁹. Comparando la **función fisiológica de esteroides y hopanoides**, existen evidencias de que ambos juegan un papel fundamental en la regulación de la fluidez de la membrana celular. Sin embargo, los esteroides son necesarios en procesos complejos de la membrana y ello representa un paso fundamental en el desarrollo de procesos tales como la endocitosis o la exocitosis¹⁰⁹.

En **organismos vegetales**, los triterpenos se encuentran generalmente en la cáscara de frutas, hojas y corteza. Las fuentes naturales más abundantes que se conocen incluyen la corteza del abedul (*Betula pendula*: betulina), plátano (*Platanus* sp.: ácido betulínico), hojas del olivo (*Olea europea*: ácido oleanólico) y hollejo de manzana (*Malus domestica*: ácido ursólico).

Triterpenos pentacíclicos

Los triterpenos pentacíclicos de la serie del lupano¹¹, oleano^{12,13} y ursano^{14,15} exhiben diversos **efectos farmacológicos**. Así, su potencial como agentes terapéuticos se pone de manifiesto con el uso en clínica del ácido oleanólico, ácido glicirrético, asiaticoside y carbenoxolona². Entre las actividades biológicas que presentan este tipo de metabolitos se incluyen la actividad antiinflamatoria, antitumoral, insecticida¹⁶, anti-VIH¹⁷, antimicrobiana, quimiopreventiva³, antiparasitaria¹⁸ y antifúngica¹⁹.

-
- ⁹ SUMMONS, R. E.; BRADLEY, A. S.; JAHNKE, L. L.; WALDBAUER, J. R. (2006). Steroids, triterpenoids and molecular oxygen. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 361, 951–968.
- ¹⁰ WELANDER, P. V.; HUNTER, R. C.; ZHANG, L.; SESSIONS, A. L.; SUMMONS, R. E.; NEWMAN, D. K. (2009). Hopanoids play a role in membrane integrity and pH homeostasis in *Rhodospseudomonas palustris* TIE-1. *J. Bacteriol.*, 191(19), 6145–6156.
- ¹¹ TOLSTIKOVA, T. G.; SOROKINA, I. V.; TOLSTIKOV, A. G.; FLEKHTER, O. B. (2006). Biological activity and pharmacological prospects of lupane terpenoids: II. Semisynthetic lupane derivatives. *Russ. J. Bioorg. Chem.*, 32(3), 291–276.
- ¹² OSORIO, A. A.; MUÑOZ, A.; TORRES-ROMERO, D.; BEDOYA, L. M.; PERESTELO, N. R.; JIMÉNEZ, I. A.; ALCAMÍ, J.; BAZZOCCHI, I. L. (2012). Olean-18-ene triterpenoids from Celastraceae species inhibit HIV replication targeting NF-κB and Sp1 dependent transcription. *Eur. J. Med. Chem.*, 52, 295–303.
- ¹³ POLLIER, J.; GOOSSENS, A. (2012). Oleanolic acid. *Phytochem.*, 77, 10–15.
- ¹⁴ SALVADOR, J. A. R.; MOREIRA, V. M.; GONÇALVES, B. M. F.; LEAL, A. S.; JING, Y. (2012). Ursane-type pentacyclic triterpenoids as useful platforms to discover anticancer drugs. *Nat. Prod. Rep.*, 29, 1463–1479.
- ¹⁵ SHANMUGAM, M. K.; DAI, X.; KUMAR, A. P.; TAN, B. K. H.; SETHI, G.; BISHAYEE, A. (2013). Ursolic acid in cancer prevention and treatment: Molecular targets, pharmacokinetics and clinical studies. *Biochem. Pharmacol.* 85, 1579–1587.
- ¹⁶ HILL, R. A.; CONOLLY, J. D. (2013). Triterpenoids. *Nat. Prod. Rep.*, 30, 1028–1065.
- ¹⁷ KASHIWADA, Y.; HASHIMOTO, F.; COSENTINO, L.M.; CHEN, C.H.; GARRETT, P.E.; LEE, K.H. (1996). Betulinic acid and dihydrobetulinic acid derivatives as potent anti-HIV agents. *J. Med. Chem.*, 39, 1016–1017.
- ¹⁸ CHOWDHURY, S.; MUKHERJEE, T.; SENGUPTA, S.; CHOWDHURY, S. R.; MUKHOPADHYAY, S.; MAJUMDER, H. K. (2011). Novel betulin derivatives as antileishmanial agents with mode of action targeting type IB DNA topoisomerase. *Mol. Pharmacol.*, 80, 694–703.

Así, por ejemplo, las avicinas, triterpenos saponinas, exhiben actividad antioxidante y antitumoral en cáncer de piel²⁰, los derivados con esqueleto de ursano han mostrado actividad inductora de apoptosis e inhibición del crecimiento tumoral en ensayos *in vivo*²¹. Por otra parte, extractos de plantas naturales cuyos principios activos mayoritarios son triterpenos pentacíclicos, se han evaluado en clínica para la prevención y tratamiento de enfermedades metabólicas y vasculares²² (Fig. 4.2).

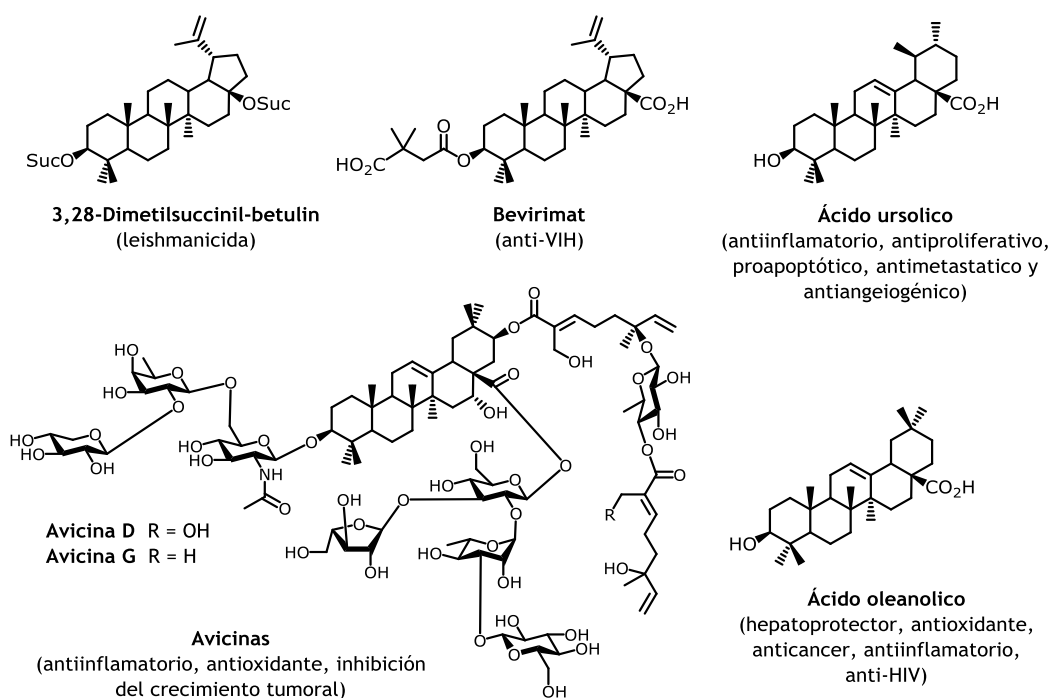


Fig. 4.2 | Triterpenos pentacíclicos y derivados y sus correspondientes actividades biológicas.

En especies de la familia **Celastraceae**, los **triterpenos pentacíclicos** mayoritarios presentan esqueleto de oleano, lupano y friedelano, mientras que los glutinanos,

¹⁹ BERNARDO, T. C.; CUNHA-OLIVEIRA, T.; SERAFIM, T.; HOLY, J. KRASUTSKY, D.; KOLOMITSYNA, O.; KRASUTSKY, P.; MORENO, A. M.; OLIVEIRA, P. J. (2013). Dimethylaminopyridine derivatives of lupane triterpenoids cause mitochondrial disruption and induce the permeability transition. *Bioorg. Med. Chem.*, 21, 7239–7249.

²⁰ HARIDAS, V.; HIGUCHI, M.; JAYATILAKE G. S.; BAILEY, D.; MUJOO, K.; BLAKE, M. E.; ARNTZEN, C. J.; GUTTERMAN, J. U. (2001). Avicins: Triterpenoid saponins from *Acacio victoriae* (Bentham) induce apoptosis by mitochondrial perturbation. *PNAS*, 98(10), 5821–5826

²¹ SHANMUGAM, M. K.; DAI, X.; KUMAR, A. P.; TAN, B. K. H.; SETHI, G.; BISHAYEE, A. (2013). Ursolic acid in cancer prevention and treatment: Molecular targets, pharmacokinetics and clinical studies. *Biochem Pharmacol.*, 85, 1579–1587.

²² SHENG, H.; SUN, H. (2011). Synthesis, biology and clinical significance of pentacyclic triterpenes: a multi-target approach to prevention and treatment of metabolic and vascular diseases. *Nat. Prod. Rep.*, 28(3), 543–593.

taraxeranos, ursanos y dammaranos se aíslan con menos frecuencia²³. Cabe destacar, que en nuestro grupo de trabajo se aislaron *D:B*-friedobaccaranos de especies de esta familia que constituyen los primeros ejemplos con este esqueleto, confirmando la hipótesis de su presencia como intermedio en la biosíntesis de triterpenos de la serie de baccarano e incluso de shionano²⁴. Sin embargo, los compuestos triterpénicos más peculiares en esta familia botánica son los nor-triterpenometilénquinonas, pigmentos que se encuentran ampliamente en las raíces de especies de Celastraceae. El esqueleto base es el núcleo de 24-nor-*D:A*-friedoleano con un sistema metilénquinónico en el anillo A y funciones oxigenadas en las posiciones C-2 y C-3. Este tipo de compuestos también se conocen como celastroloides^{25,26}, incluyendo los derivados fenólicos, los dímeros y trímeros de este tipo de metabolito. Estos últimos están constituidos por unidades de triterpenometilénquinonas, derivada de pristimerina, tingenona, nezahualcoyona, en el caso de los dímeros²⁷, y unidades de pristimerina en el caso de los trímeros^{28,29}.

Triterpenos de la serie del lupano

Entre los triterpenos pentacíclicos destacan los **triterpenos de la serie del lupano** (TPLs) ya que éstos son metabolitos son frecuentes en plantas superiores, incluyendo las especies de la familia Celastraceae²⁹ (Fig. 4.3).

El **primer ejemplo de un TPL descrito en la bibliografía** fue la **betulina**, que se aisló de la corteza del abedul blanco (*Betula alba*) en el año 1788³⁰ (Fig. 4.4). El genero *Betula* (abedules) son ricos en este metabolito y, de hecho, *Betula papyrifera* de los bosques boreales en el norte de Canadá, es la fuente más abundante de este lupano

²³ NÚÑEZ, M. J.; ARDILES, A. E.; MARTÍNEZ, M. L.; TORRES-ROMERO, D.; JIMÉNEZ, I. A.; BAZZOCCHI, I. L. (2013). Triterpenoids from *Cassine xylocarpa* and *Celastrus vulcanicola* (Celastraceae). *Phytochem. Lett.*, 6, 148-151.

²⁴ NÚÑEZ, M. J.; LÓPEZ, M. R.; JIMÉNEZ, I. A.; MOUJIR, L. M.; RAVELO, A. G.; BAZZOCCHI, I. L. (2003). First examples of tetracyclic triterpenoids with a *D:B*-friedobaccharane skeleton. A tentative biosynthetic route. *Tetrahedron Lett.*, 45(39), 7367-7370.

²⁵ BRÜNING, R.; WAGNER, H. (1978). Übersicht über die Celastraceen-Inhaltsstoffe: Chemie, Chemotaxonomie, Biosynthese, Pharmakologie. *Phytochemistry*, 17(11), 1821-1858.

²⁶ GUNATILAKA, A. A. L. (1996). Triterpenoid quinonemethides and related compounds (Celastroloids). En W. Herz, G. W. Kirby, R. E. Moore, W. Steglich, C. Tamm (Eds.), *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe / Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, Vol. 67 (pp. 1-114). Viena: Springer.

²⁷ GONZÁLEZ, A. G.; ALVARENGA, N.; ESTÉVEZ-BRAUN, A.; RAVELO, A. G.; BAZZOCCHI, I. L.; MOUJIR, L. M. (1996). Structure and absolute configuration of triterpene dimers from *Maytenus scutioides*. *Tetrahedron*, 52(28), 9597-9608.

²⁸ GONZÁLEZ, A. G.; ALVARENGA, N. L.; BAZZOCCHI, I. L.; RAVELO, A. G.; MOUJIR, L. (1999). Triterpene trimers from *Maytenus scutioides*: cycloaddition compounds? *J. Nat. Prod.*, 62(8), 1185-1187.

²⁹ ALVARENGA, N.; FERRO, E. A. (2006). Bioactive triterpenes and related compounds from Celastraceae. *Stud. Nat. Prod. Chem.*, 33, 239-307.

³⁰ LOWITZ, J. T. (1788). *Über eine neue, fast benzoeartige Substanz der Birken*. pp. 312-317.

constituyendo entre un 20-35% de peso seco³¹. En cuanto su disponibilidad, debemos tener en cuenta que la corteza del abedul es un producto de desecho a gran escala en la industria maderera, papelera y en la producción de carbón activo, por lo cual la obtención de betulina resulta fácil y económica^{32,33}.

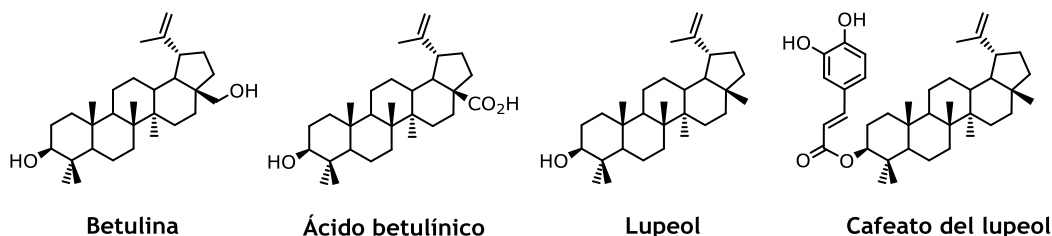


Fig. 4.3 | Ejemplos de triterpenos de la serie del lupano presentes en especies de Celastraceae.

Ya en el siglo XIX, la betulina se empezó a usar en parches por sus propiedades antisépticas. De hecho, los extractos de la corteza del abedul rica en este metabolito, favorece la cicatrización. En la industria cosmética, la betulina se usa ampliamente, por ejemplo como emulgente en champús³⁴. Por otra parte, la betulina exhibe actividad hipocolesterolémica, anti-inflamatoria, colerética, así como efecto hepatoprotector e inductor de apoptosis. La actividad anti-úlceras de algunos de sus ésteres es incluso mayor que la del conocido fármaco omeprazol y derivados sustituidos en posición C-3 exhiben actividad anti-bacteriana frente a diferentes especies de *Staphylococcus*^{11,31,35}.

El **ácido betulínico** seguramente es el triterpeno lupano que más se ha estudiado. La actividad biológica de más de 2.500 especies vegetales se debe a la presencia de este metabolito que exhibe actividad anticancerígena con una baja toxicidad en ensayos *in vivo*, por lo que, llegó a ensayos en fase clínica II para el tratamiento de melanoma humano³³. Por otra parte, el ácido betulínico y sus derivados presentan actividad antiinflamatoria^{36,37}, antinoceptiva³⁸, antimalárica³⁹, hipoglucemiante⁴⁰ y antiviral⁴¹,

³¹ TOLSTIKOV, G. A.; FLEKHTER, O. B.; SHULTZ, E. E.; BALTINA, L. A.; TOLSTIKOV, A. G. (2005). Betulin and its derivatives. Chemistry and biological activity. *Chem. Sust. Dev.* 13, 1-19.

³² ABYSHEV, A. Z.; AGAEV, É. M.; GUSEINOV, A. B. (2007). Studies of the chemical composition of birch bark extracts (*Cortex betula*) from the *Betulaceae* family. *Pharm. Chem. J.* 41(8), 419-423.

³³ KRASUTSKY, P. A. (2006). Birch bark research and development. *Nat. Prod. Rep.*, 23, 919-942.

³⁴ HAYEK, E. W. H.; JORDIS, U.; MOCHE, W.; SAUTER, F. (1989). A bicentennial of betulin. *Phytochem.*, 28(9), 2229-2242.

³⁵ GAUTHIER, C.; LEGAULT, J.; PIOCHON-GAUTHIER, M.; PICHETTE, A. (2011). Advances in the synthesis and pharmacological activity of lupane-type triterpenoid saponins. *Phytochem. Rev.*, 10(4), 521-544.

³⁶ SPORN, M. B.; LIBY, K. T.; YORE, M. M.; FU, L.; LOPCHUK, M.; GRIBBLE, G. W. (2011). New synthetic triterpenoids: potent agents for prevention and treatment of tissue injury caused by inflammatory and oxidative stress. *J. Nat. Prod.*, 74(3), 537-545.

³⁷ BRACA A.; DAL PIAZ, P. F.; MARZOCCO, S.; AUTORE, G.; VASSALLO, A.; DE TOMMASI, N. (2011). Triterpene derivatives as inhibitors of protein involved in the inflammatory process: molecules interfering with phospholipase A2, cyclooxygenase, and lipoxygenase. *Curr. Drug Targets*, 12(3), 302-321.

destacando su gran potencial como agentes anti-VIH (virus de la inmunodeficiencia humana adquirida). Por otra parte, estimula la síntesis de colágeno en la piel por lo que resulta de interés en la industria cosmética^{31,42}.



Fig. 4.4 | Corteza y hojas del abedul blanco (*Betula alba*), primera fuente de betulina.
Este triterpeno es responsable del color blanco característico de la corteza del abedul.

Cabe destacar un derivado del ácido betulínico de interés terapéutico, el **bevirimat** (DSB, PA-457, ácido 3',3'-dimetilsuccinilbetulínico, Fig. 4.5), primer ejemplo de su clase como inhibidor de la maduración del VIH, que se ha obtenido a partir del ácido betulínico por esterificación en posición C-3 con dimetilsuccinato. Sin embargo, el bevirimat no pasó a ensayos de fase clínica III debido a la resistencia observada en los ensayos clínicos realizados. Otra inconveniente de este potencial fármaco ha sido su baja hidrosolubilidad con la consiguiente baja biodisponibilidad de este tipo de compuesto^{17,43,44}.

³⁸ KINOSHITA, K.; AKIBA, M.; SAITOH, M.; YE, Y.; KOYAMA, K.; TAKAHASHI, N.; KONDO, N.; YUASA, H. (1998). Antinociceptive effect of triterpenes from Cacti. *Pharm. Biol.*, 36(1), 50–57.

³⁹ STEELE, J. C.; WARHURST, D. C.; KIRBY, G. C.; SIMMONDS, M. S. (1999). In vitro and in vivo evaluation of betulinic acid as an antimalarial. *Phytother. Res.*, 13(2), 115–119.

⁴⁰ ZHU, P.; BI, Y.; XU, J.; LI, Z.; LIU, J.; ZHANG, L.; YE, W.; WU, X. (2009). Terpenoids. III: Synthesis and biological evaluation of 23-hydroxybetulinic acid derivatives as novel inhibitors of glycogen phosphorylase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 19, 6966–6969.

⁴¹ DECLERCQ, E. (2001). New developments in anti-HIV chemotherapy. *Curr. Med. Chem.*, 8(13), 1543–1572.

⁴² MOGHADDAM, M. G.; AHMAD, F. B. H.; SAMZADEH-KERMANI, A. S. (2012). Biological activity of betulinic acid: a review. *Pharmacol. Pharm.*, 3, 119–123.

⁴³ MARTÍN, D.E.; BLUM, R.; WILTON, J.; DOTO, J.; GALBRAITH, H.; BURGESS, G.L.; SMITH, P.C.; BALLOW, C. (2007). Safety and pharmacokinetics of Bevirimat (PA-457), a novel inhibitor of human immunodeficiency virus maturation, in healthy volunteers. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 51(9), 3063–3066.

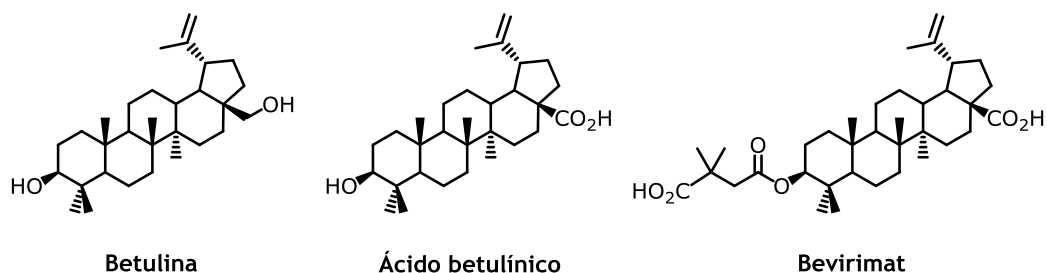


Fig. 4.5 | Ejemplos de triterpenos de la serie del lupanos con actividad anti-VIH.

Para resolver tanto la resistencia del VIH al bevirimat como la baja solubilidad de este tipo de análogos, se han preparado nuevos derivados en la posición C-28 (Fig. 4.6). Así, por ejemplo, su 2-aminoetilamino-derivado presentó mayor hidrosolubilidad, potencia, selectividad e incluso mejor perfil antiviral. Por lo tanto, los derivados del ácido betulínico continúan siendo excelentes candidatos a estudios clínicos^{45,46}.

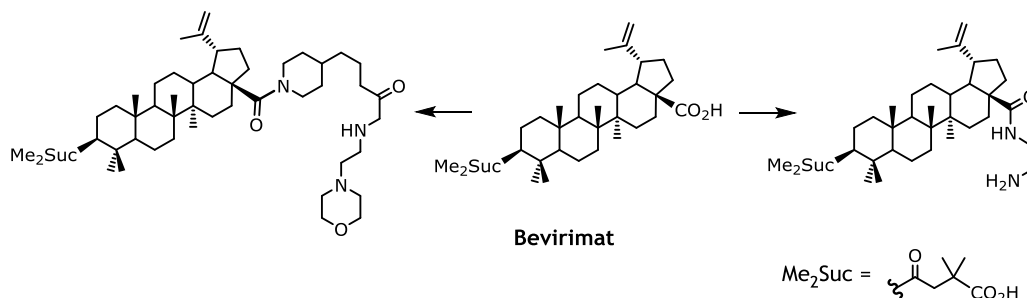


Fig. 4.6 | **Ácido betulínico, Bevirimat y su 2-aminoetilamino-derivado** que presenta mayor actividad y mayor solubilidad en agua con respecto a su producto de partida.

Sin lugar a dudas, los TPLs en los últimos años se han estudiado exhaustivamente como fuente de nuevos **agentes terapéuticos** o con aplicación en la agricultura, destacando los estudios de su potencial anticancerígeno y anti-VIH.

⁴⁴ SMITH, P.F.; OGUDELE, A.; FORREST, A.; WILTON, J.; SLAZWEDEL, K.; DOTO, J.; ALLAWAY, G.P.; MARTÍN, D.E. (2007). Phase I and II study of the safety, virologic effect, and pharmacokinetics/pharmacodynamics of single-dose 3-O-(3',3'-dimethylsuccinyl)betulinic acid (bevirimat) against human immunodeficiency virus infection. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 51(10), 3574–3581.

⁴⁵ CORIC, P.; TURCAUD, S.; SOUQUET, F.; BRIANT, L.; GAY, B.; ROYER, J.; CHAZAL, N.; BOUAZIZ, S. (2013). Synthesis and biological evaluation of a new derivative of bevirimat that targets the Gag CA-SP1 cleavage site. *Eur. J. Med. Chem.*, 62, 453–465.

⁴⁶ QIAN, K.; YU, D.; CHEN, C.H.; HUANG, L.; MORRIS-NATSCHKE, S.L.; NITZ, T.J.; SALZWEDEL, K.; REDDICK, M.; ALLAWAY, G.P.; LEE, K.H. (2009). Anti-AIDS agents. 78. Design, synthesis, metabolic stability assessment, and antiviral evaluation of novel betulinic acid derivatives as potent anti-human immunodeficiency virus (HIV) agents. *J. Med. Chem.*, 52(10), 3248–3258.

En nuestro grupo de trabajo hemos llevado a cabo el estudio de una serie de triterpenos lupanos aislados de dos especies de la familia Celastraceae, *Maytenus chiapiensis* y *M. cuzcoina* por su potencial como antiinflamatorio y citotóxico. Los resultados mostraron que algunos TPLs son capaces de inhibir la generación tanto de óxido nítrico como de la prostaglandina E₂ en macrófagos de ratón (RAW 264.7) con valores de CI₅₀ en un rango micromolar⁴⁷. Asimismo, la evaluación de la actividad citotóxica indicó que compuestos como 28,30-dihidroxi-3-oxo-lup-20(29)-eno y el ácido 3-epi-betulínico exhiben una moderada actividad citotóxica frente a las líneas tumorales humanas de carcinoma de cervix (HeLa, CI₅₀ de 2.1 y 4.0 ug/mL) y carcinoma de laringe (Hep-2, CI₅₀ de 3.1 y 7.1 ug/mL)⁴⁸.

⁴⁷ REYES, C. P.; NÚÑEZ, M. J.; JIMÉNEZ, I. A.; BUSSEROLLES, J.; ALCARÁZ, M. J.; BAZZOCCHI, I. L. (2006). Activity of lupane triterpenoids from *Maytenus* species as inhibitors of nitric oxide and prostaglandin E₂. *Bioorg. Med. Chem.*, 14(5), 1573–1579.

⁴⁸ NÚÑEZ, M. J.; REYES, C. P.; JIMÉNEZ, I. A.; MOUJIR, L.; BAZZOCCHI, I. L. (2005). Lupane triterpenoids from *Maytenus* species. *J. Nat. Prod.*, 68(7), 1018–1021.

4.2 | RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Modificaciones estructurales de triterpenos de la serie de lupano: preparación de una quimioteca para modular la actividad anti-VIH

Este capítulo de la presente Memoria de Tesis se desarrolló dado el interés despertado por los compuestos con esqueleto triterpénico de la serie de lupano (TPL), no sólo por el amplio rango de actividades biológicas que presentan, sino también por sus características estructurales, lo que hace de este grupo de productos naturales *estructuras privilegiadas*^{49,50}. Ello se pone de manifiesto por los grupos de investigación de prestigio internacional que han dirigido sus esfuerzos a investigar esta plataforma química.

En Química Médica, es un hecho bien reconocido que pequeñas **modificaciones estructurales** pueden conllevar cambios significativos en la **bioactividad** de un compuesto. Así, por ejemplo, modificación de la posición C-3 en el ácido betulínico resultó en derivados con potente actividad anti-VIH que inhiben la maduración del virus⁵¹, mientras modificación de la posición C-28 condujo a análogos que inhibieron la entrada de VIH teniendo como diana la glicoproteína HIV-1 pg120⁵².

Por otra parte, los **TPLs** de origen natural ofrecen un grado de sustitución particular que es responsable de su gran diversidad estructural. De esta manera, un estudio de la influencia de la regiosustitución puede proporcionar una comprensión más profunda de como los requerimientos estructurales influyen en su actividad biológica. Por otra parte, permiten obtener información de los mecanismos de acción de este tipo de metabolitos.

⁴⁹ EVANS, B. E.; RITTLE, K. E.; BOCK, M. G.; DIPARDO, R. M.; FREIDINGER, R. M.; WITTER, W. L.; LUNDELL, G. F.; VEBER, D. F.; ANDERSON, P. S.; CHANG, R. S. L.; LOTTI, V. J.; CERINO, D. J.; CHEN, T. B.; KLING, P. J.; KUNKEL, K. A.; SPRINGER, J. P.; HIRSHFELDT, J. (1988). Methods for drug discovery: development of potent, selective, orally effective cholecystokinin antagonists. *J. Med. Chem.*, 31, 2235–2246.

⁵⁰ NICOLAOU, K. C.; EVANS, R. M.; ROECKER, A. J.; HUGHES, R.; DOWNES, M.; PFEFFERKORN, J. A. (2003). Discovery and optimization of non-steroidal FXR agonists from natural product-like libraries. *Org. Biomol. Chem.*, 1, 908–920.

⁵¹ QIAN, K.; KUO, R.-Y.; CHEN, C.-H.; HUANG, L.; MORRIS-NATSCHKE, S. L.; LEE, KUO-HSIUNG. (2010). Anti-AIDS agents 81. Design, synthesis, and structure-activity relationship study of betulinic acid and moronic acid derivatives as potent HIV maturation inhibitors. *J. Med. Chem.*, 53, 3133–3141.

⁵² SOLER, F.; POUJADE, C.; EVERS, M.; CARRY, J. C.; HÉNIN, Y.; BOUSSEAU, A.; HUET, T.; PAUWELS, R.; DE CLERCQ, E.; MAYAUX, J. F.; LE PECQ, J. B.; DEREU, N. (1996). Betulinic acid derivatives: A new class of specific inhibitors of Human Immunodeficiency Virus type 1 entry. *J. Med. Chem.*, 39, 1069–1083.

Siguiendo estos antecedentes para un estudio sistemático de relación estructura-actividad de los TPLs, con el objetivo de ampliar el espacio químico y farmacológico e investigar los mecanismos de acción a través de este tipo de compuestos ejercen su efecto inhibitor del VIH, hemos diseñado y llevado a cabo la síntesis de una serie de 22 derivados (compuestos **T27–T48**), ocho de los cuales (**T30–T32**, **T35–T36**, **T40**, **T42** y **T48**) se reportan por primera vez en la bibliografía (Fig. 4.8).

El **material de partida** en la preparación de esta serie fueron los metabolitos **T8**, **T9**, **T13**, **T18** y **T24** (Fig. 4.7). Éstos fueron productos mayoritarios aislados de las especies *Cassine xylocarpa* Vent. y *Maytenus cuzcoina* Loesener de la familia Celastraceae en trabajos anteriores de nuestro grupo de investigación^{53,54}. La enumeración de los TPLs semisintéticos se comienza a partir del **T27** dado que los compuestos naturales **T1–T26** se incluyen en la evaluación de la actividad anti-VIH que se describe en el apartado de actividades biológicas.

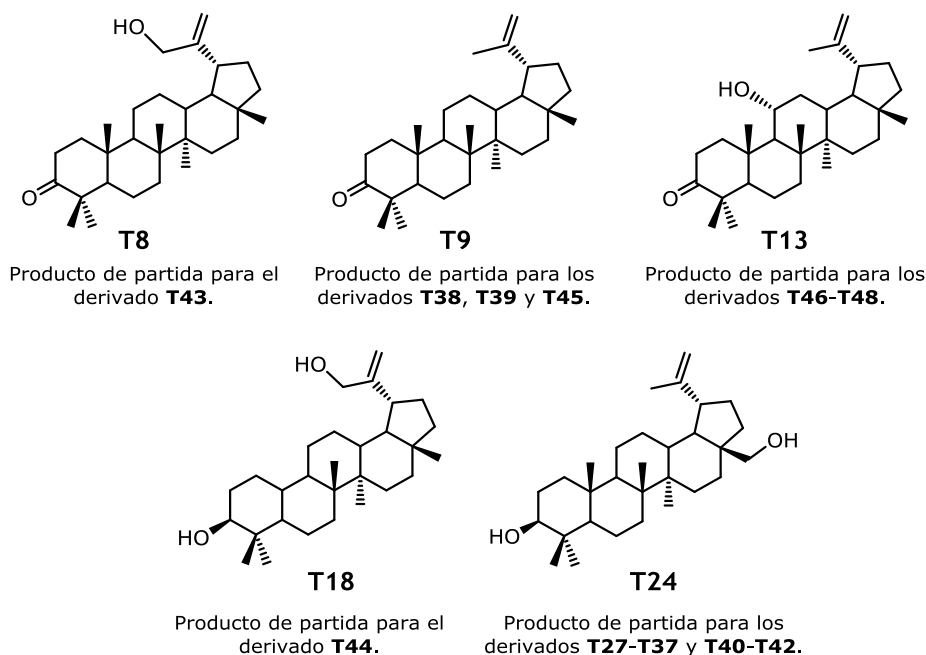


Fig. 4.7 | TPLs naturales usados como productos de partida para la preparación de la quimioteca.

⁵³ PÉREZ REYES, C. (2007). *Maytenus cuzcoina*, fuente de metabolitos secundarios bioactivos. *Estudios de relación estructura-actividad*. (Tesis Doctoral). Departamento de Química Orgánica. Universidad de La Laguna.

⁵⁴ OSORIO LANDAVERDE, A. O. (2012). *Metabolitos secundarios aislados de Cassine xylocarpa y Elaeodendron orientale (Celastraceae): potenciales agentes antivirales y citotóxicos*. (Tesis Doctoral). Departamento de Química Orgánica. Universidad de La Laguna.

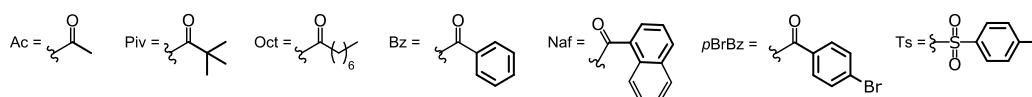
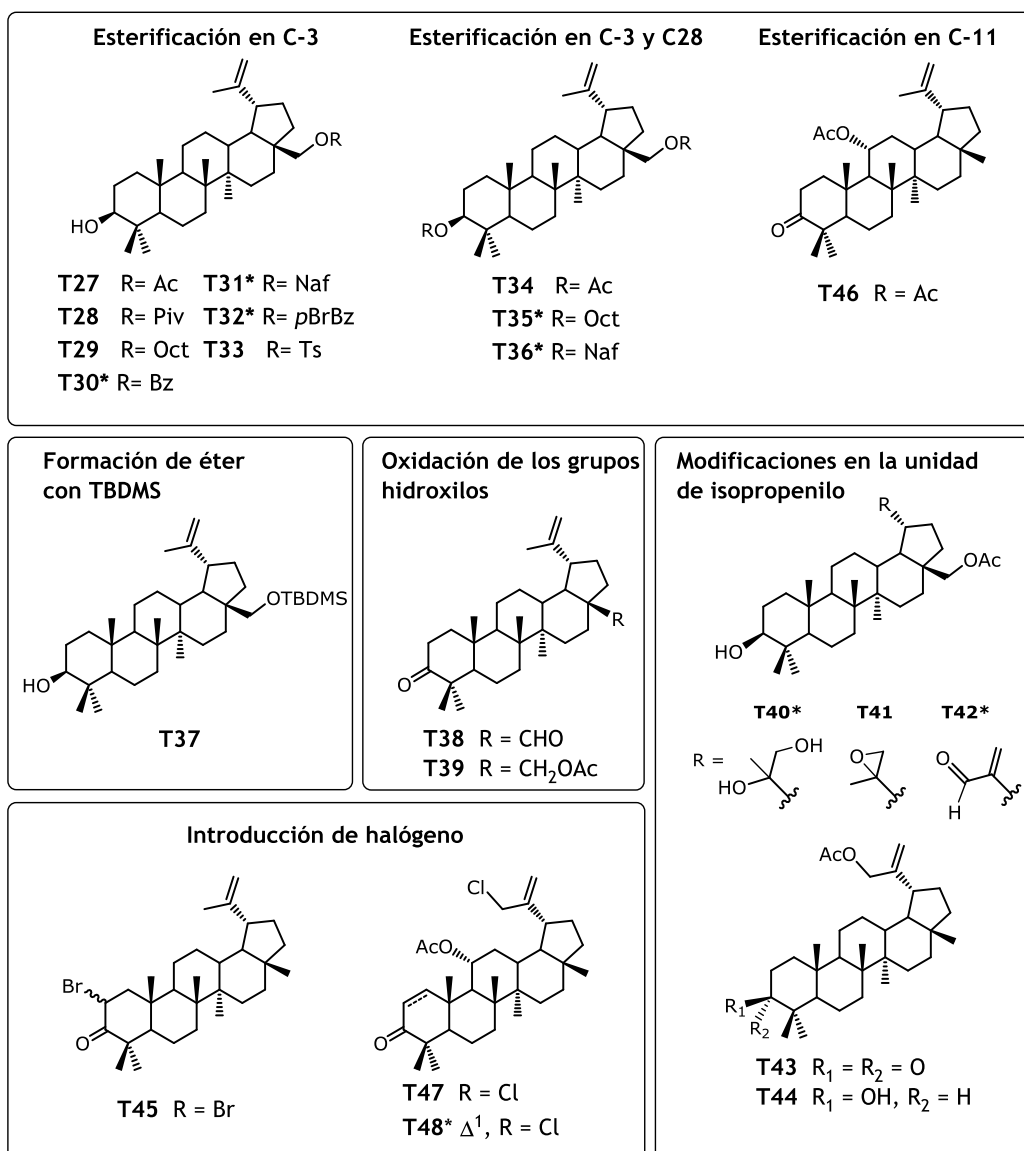


Fig. 4.8 | Derivados preparados a partir de los TPLs T8, T9, T13, T18 y T24. Los compuestos que resultaron nuevos en la bibliografía, se marcaron con un asterisco.

4.2.1 | Transformaciones de los TPLs naturales

Al analizar la estructura de los TPLs usados como productos de partida en la semisíntesis, podemos identificar, en general, diversas **zonas potenciales de interacción** con una molécula diana o receptor, ya sea por enlaces de hidrógeno o de Van der Waals y que podrían modificar su perfil farmacológico: los grupos hidroxilos sobre los carbonos C-3, C-11, C-28 y/o C-30, y la unidad de isopropenilo (Fig. 4.9). Por ello, realizamos una serie de modificaciones en tales grupos funcionales con la finalidad de conocer la relevancia de los mismos en la bioactividad.

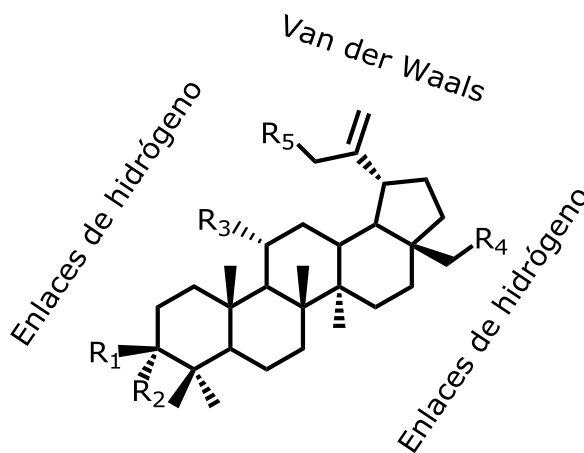


Fig. 4.9 | Estructura general de los TPLs usados como productos de partida para la preparación de la quimioteca y tipos de interacciones potenciales con un receptor.

Las estructuras de los derivados sintetizados fueron elucidados mediante técnicas espectroscópicas de RMN de ^1H y de ^{13}C , incluyendo experimentos homo (COSY y ROESY) y heteronucleares (HSQC y HMBC), IR, UV y espectrometría de masas. Por otra parte, las estructuras de los compuestos anteriormente descritos, fueron caracterizadas basándonos en sus datos físicos y espectroscópicos y comparación de los mismos con los existentes en la bibliografía química.

4.2.2 | Modificaciones en los alcoholes sobre C-3 y C-28

Los **grupos hidroxilos** juegan un papel importante en la actividad de una molécula. Por ejemplo, confieren un cierto grado de polaridad, haciéndola más soluble en disolventes polares y están involucrados en interacciones mediante enlaces de hidrógeno con el receptor. Así mismo, el oxígeno del grupo hidroxilo puede actuar como un nucleófilo. Por ello, nos pareció de interés conocer la relevancia de este grupo en la

actividad biológica de los compuestos objeto de nuestro estudio. Así, los grupos hidroxilos se pueden modificar mediante esterificación, formación de un éter y oxidación con el objetivo de eliminar el efecto dador de puentes de hidrógeno o bien se pueden sustituir por halógeno para eliminar su interacción.

A | Reacciones de esterificación

Las **reacciones de esterificación** sirven para valorar de una manera eficaz si un grupo hidroxilo está involucrado en la formación de enlaces de hidrógeno con una molécula diana o receptor. Pueden darse dos situaciones:

1. El grupo hidroxilo actúa como dador de enlaces de hidrógeno. Así, al sustituir el átomo de hidrógeno, la interacción se pierde.
2. El grupo hidroxilo actúa como aceptor de enlaces de hidrógeno con el receptor. La oxidación, esterificación o formación de un éter de un grupo hidroxilo, por lo tanto, no debería afectar en la actividad de manera significativa.

Por otra parte, las reacciones de esterificación sirven para **introducir grupos adicionales** de potencial interacción en la molécula. Por ello, se seleccionaron diferentes ácidos carboxílicos alifáticos (anhídrido acético, cloruro de octanoilo, cloruro de pivaloilo), aromáticos (cloruro de benzoilo, cloruro de 4-bromobenzoico, cloruro de 1-naftoilo) y un análogo de ácido carboxílico (cloruro de tosilo) para conferir diferentes características estéreo-electrónicas y lipofílicas a los derivados, lo que permite ampliar el estudio de relación-actividad, aportando información sobre los requerimientos necesarios para mejorar su actividad anti-VIH. Por otra parte, cabe destacar que el 50% de los fármacos presentan un grupo aromático en su estructura⁵⁵ que pueden interactuar con un receptor a través de interacciones π - π o hidrógeno- π ⁵⁶, lo que incrementa el interés en el estudio de este tipo de sustituyente en la actividad.

En este trabajo de investigación se prepararon los ésteres **T27-T36** usando diferentes cloruros de ácidos, anhídridos y cloruro de tosilo (Fig. 4.10). Según la reactividad del agente acilante y los grupos hidroxilos, se obtuvieron los compuestos mono y/o diesterificados.

⁵⁵ *The Practice of Medicinal Chemistry*. 3ª ed. Wermuth, C. G. Ed. Academic Press: Elsevier Science, San Diego, 2008.

⁵⁶ SAGGU, M.; LEVINSON, N. M.; BOXER, S. G. (2012). Experimental quantification of electrostatics in X-H... π hydrogen bonds. *J. Am. Chem. Soc.*, 134, 18986-18997.

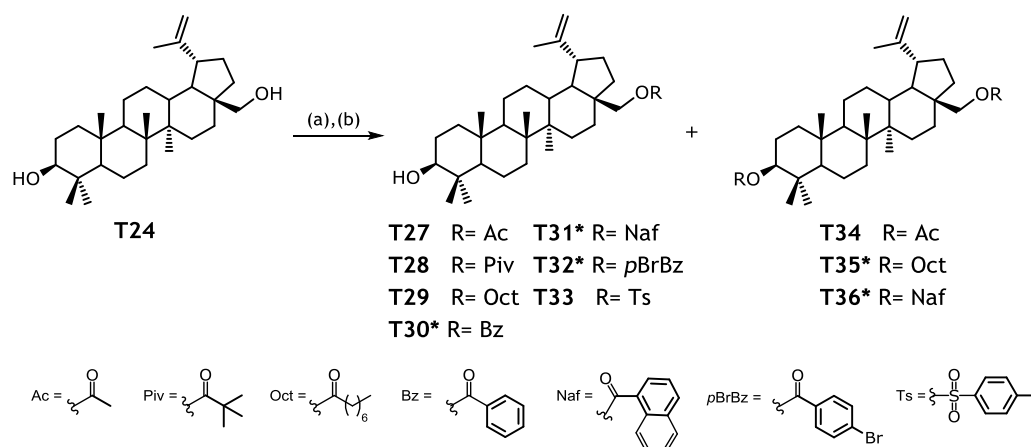


Fig. 4.10 | Síntesis de los compuestos **T27–T36**. Reactivos: (a) RCOX, piridina, CH₂Cl₂. (b) TsCl, DMAP, CH₂Cl₂. (Los compuestos que resultaron nuevos en la bibliografía química se indican con un asterisco).

El procedimiento general que se siguió para obtener los derivados **T27–T36** fue el tratamiento de una disolución de betulina (**T24**) en piridina seca (0.5–1.5 mL) y un exceso del correspondiente ácido activado disuelto en diclorometano seco (2–4 mL). La reacción se llevó a cabo a 0 °C bajo atmósfera de argón y con agitación, modificando las condiciones de reacción donde era necesario, tal como se indica en la Tabla 4.. La reacción se siguió por cromatografía en capa fina analítica. Posteriormente, el crudo de la reacción se llevó a sequedad a presión reducida y se purificó mediante técnicas cromatográficas tal como se detalla en la parte experimental. Así, se obtuvieron los correspondientes mono- y diésteres de la betulina (**T27–T36**).

Tabla 4.1 | Reactivos, condiciones de reacción y rendimiento de los derivados **T27–T36** a partir de betulina (**T24**).

Acilante	Condiciones de reacción		Productos (% de rendimiento)
Ac ₂ O	1.0 eq.	CH ₂ Cl ₂ , t.a., 4 h	T27 (77%), T34 (9%)
	1.1 eq.	py, 0 °C→t.a., 6 h	T27 (72%), T34 (11%)
PivCl	6.2 eq.	CH ₂ Cl ₂ , py, 0 °C, 5 min	T28 (54%)
OctCl	3.5 eq.	CH ₂ Cl ₂ , py, 0 °C, 4.5 h	T29 (9%), T35 (35%)
BzCl	8.7 eq.	CH ₂ Cl ₂ , py, 0 °C, 5 min	T30 (63%)
NafCl	18.8 eq.	CH ₂ Cl ₂ , py, 0 °C, 3 h	T31 (43%), T36 (25%)
pBrArCOCl	1.3 eq.	CH ₂ Cl ₂ , py, 0 °C, 5 min	T32 (24%)
TsCl	3.0 eq.	CH ₂ Cl ₂ , py, DMAP, 0 °C→t.a., 72 h	T33 (19%)

Así, mediante esterificación, se prepararon diez TPLs, cinco de los cuales no habían sido reportados anteriormente (**T30***, **T31***, **T32***, **T35***, **T36***). Por otra parte, cinco de estos derivados habían sido descritos en la bibliografía química: 28-*O*-acetilbetulina [28-acetiloxi-3 β -hidroxi-lup-20(29)-eno]⁵⁷ (**T27**), 28-pivaloiloxibetulina [3 β -hidroxi-28-pivaloiloxi-lup-20(29)-eno]⁵⁸ (**T28**), 28-octanoiloxi-betulina [3 β -hidroxi-28-octanoiloxi-lup-20(29)-eno]⁵⁷ (**T29**), 28-tosiloxibetulina [3 β -hidroxi-28-tosiloxi-lup-20(29)-eno]⁵⁹ (**T33**) y 3,28-di-*O*-acetilbetulina [3 β ,28-dihidroxi-lup-20(29)-eno]⁵⁷ (**T34**). A pesar de que los derivados **T28** y **T33** fueron preparados con anterioridad por otros grupos, hasta el momento no han sido reportados todos sus datos espectroscópicos, por lo que son presentados en ésta Memoria de Tesis.

La estructura de los derivados obtenidos fue establecida mediante estudios de sus datos espectroscópicos y espectrométricos. Así, los derivados acilados presentaron como principal característica en su espectro de RMN de ¹H el desplazamiento a campo más bajo de las señales correspondientes a los protones H₂-28 a en los monoésteres y de las señales correspondientes a H-3 y H₂-28 en los diésteres con respecto a su producto de partida. Asimismo, se observaron las señales correspondientes al sustituyente introducido al esqueleto triterpénico.

A continuación, se describe la síntesis y determinación estructural de los derivados **T29** y **T35** obtenidos tras esterificación con cloruro de octanoilo como ejemplo de ésteres alifáticos, los derivados con cloruro de naftoilo **T31** y **T36** como ejemplos de ésteres aromáticos y el derivado obtenido por tratamiento con cloruro de tosilo **T33**.

I. Esterificación con cloruro de octanoilo

Para formar el derivado de octanoilo de la betulina, a una disolución de betulina (**T24**) en diclorometano se añadió cloruro de octanoilo a 0 °C en atmósfera de argón, tal como se indica en la Fig. 4.11. Tras agitación durante 4.5 h, el crudo fue purificado por cromatografía en capa fina preparativa usando como fase móvil una mezcla de hexanos-acetato de etilo (4:1), obteniéndose 4.5 mg del monoéster **T29** (9% de rendimiento) y 22.5 mg del diéster **T35** (35% de rendimiento) de octanoilo, que fueron identificados mediante el estudio de sus datos físicos, espectroscópicos y espectrométricos.

⁵⁷ HIROYA, K.; TAKAHASHI, T.; MIURA, N.; NAGANUMA, A., SAKAMOTO, T. (2002). Synthesis of betulin derivatives and their protective effects against the cytotoxicity of cadmium. *Bioorg. Med. Chem.*, 10, 3229-3236.

⁵⁸ GAULTIER, C.; LEGAULT, J.; PIOCHON, M.; LAVOIE, S.; TREMBLAY, S.; PICHETTE, A. (2009). Synthesis, cytotoxicity, and hemolytic activity of chacotrioxide lupane-type neosaponins and their germanicane-type rearrangement products. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 19, 2310-2314.

⁵⁹ LAO, A.; FUJIMOTO, Y.; TATSUNO, T. Studies on the constituents of *Artemisia argyi* Levl and Vant. (1984). *Chem. Pharm. Bull.*, 32, 723-727.

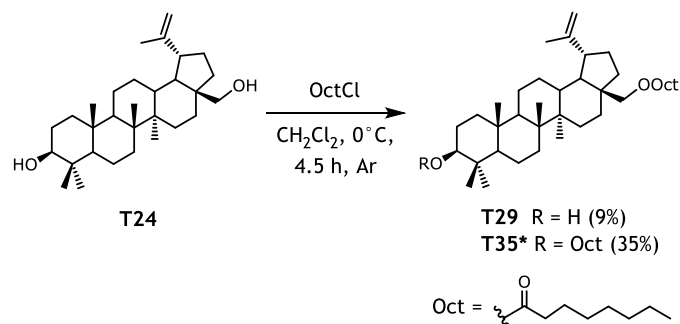


Fig. 4.11 | Síntesis de los compuestos **T29** y **T35** a partir de betulina (**T24**).

Los espectros de masas de alta resolución de los compuestos **T29** y **T35** presentaron una fórmula molecular de $\text{C}_{38}\text{H}_{64}\text{O}_3$ y $\text{C}_{46}\text{H}_{78}\text{O}_4$, respectivamente. El conjunto de los datos de RMN de ^1H (Fig. 4.12) y de ^{13}C del compuesto **T29** mostró como diferencia más notable, con respecto a los datos asignados a la betulina, la presencia de señales correspondientes a un grupo octanoílo a δ_{H} 0.90 y 2.34 y a δ_{C} 34.6 (t), 31.6 (t), 29.8 (t), 25.1 (t), 23.8 (t), 22.6 (t), 15.1 (c), así como la presencia de la señal correspondiente a un grupo carboxilo a δ_{C} 174.1 (s).

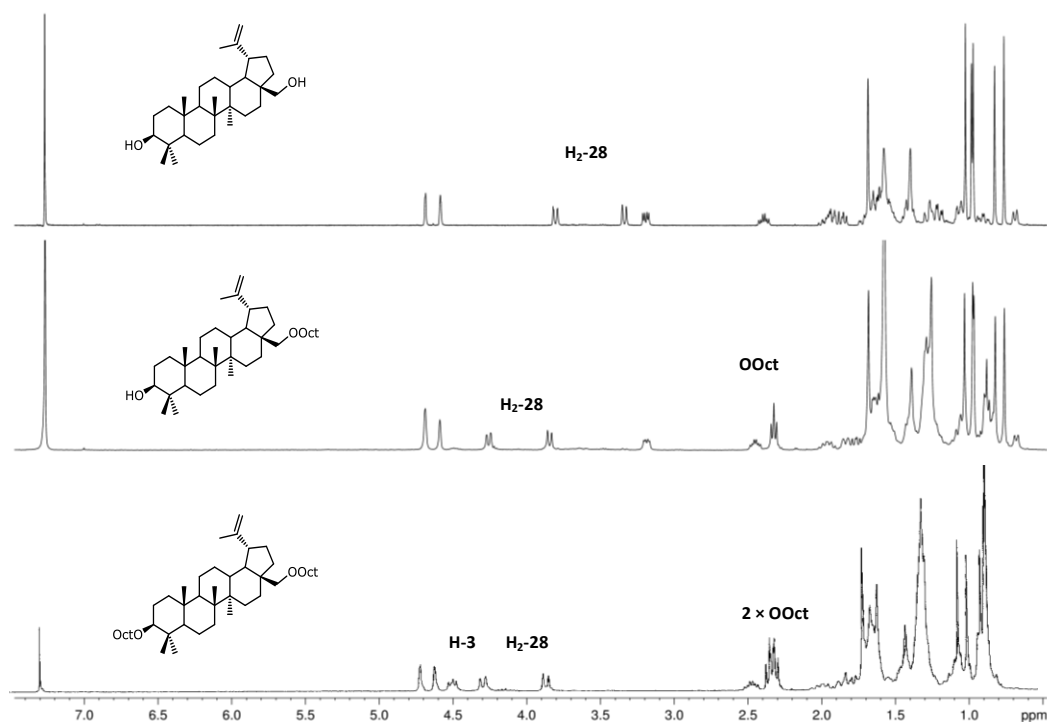


Fig. 4.12 | Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) del producto de partida betulina (**T24**, arriba), del mono-octanoílo de betulina (**T29**, en medio) y del dioctanoílo de betulina (**T35**, abajo).

En los espectros de RMN de ^1H (Fig. 4.12) y de ^{13}C del compuesto **T35**, destaca la presencia de las señales correspondientes a dos grupos octanoílos a δ_{H} 0.90 y 2.34 (Fig. 4.14) y a δ_{C} 14.0 (c), 15.0 (c), 22.6 (2 \times t), 23.7 (2 \times t), 25.1 (2 \times t), 29.6 (t), 29.8 (t), 31.7 (2 \times t) y 34.9 (2 \times t). Por otra parte, se observó la presencia de las señales correspondientes a los carboxilos a δ_{C} 173.8 y 174.4. Estos datos están de acuerdo con las estructuras propuestas para estos derivados, que corresponden a los derivados 28-octanoiloxibetulina [3 β -hidroxi-28-octanoiloxi-lup-20(29)-eno]⁵⁷ (**T29**) y 3,28-dioctanoiloxibetulina [3 β ,28-dioctanoiloxi-lup-20(29)-eno] (**T35**).

II. Esterificación con cloruro de naftoilo

Los derivados con ésteres aromáticos presentaron, además de los desplazamientos de los protones H-3 y/o H₂-28 a campo más bajo, la presencia de señales correspondientes a anillo aromático a δ_{H} 7-8 ppm, dependiendo de las características particulares de cada éster aromático. A modo de ejemplo, se indican los espectros de RMN de ^1H de los derivados mono y diesterificados con cloruro de naftoilo, **T31** y **T36**.

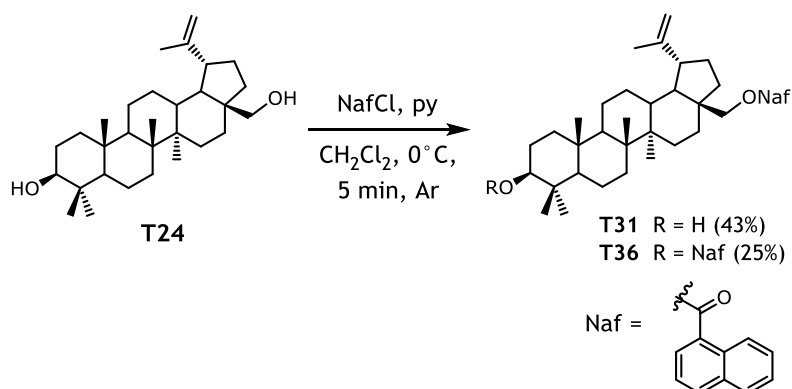


Fig. 4.13 | Síntesis de los compuestos **T31** y **T36**.

La betulina fue sometida a la reacción de esterificación con cloruro de 1-naftoílo, siguiendo el esquema indicado (Fig. 4.13). Después de extracción y purificación de la mezcla de reacción, se obtuvieron los compuestos **T31** y **T36**, cuyas estructuras fueron establecidas basándonos en sus datos físicos, espectrométricos y espectroscópicos. Así, sus espectros de masas de alta resolución indicaron fórmulas moleculares de $\text{C}_{41}\text{H}_{56}\text{O}_3$ y $\text{C}_{52}\text{H}_{62}\text{O}_4$, respectivamente. Los datos espectroscópicos de RMN de ^1H y de ^{13}C del compuesto **T31** (Fig. 4.14) mostraron, como diferencias más notables al compararlos con los del producto **T24**, la presencia de siete protones aromáticos y el desplazamiento del protón H-28 a campo más bajo, de δ_{H} 3.34 y 3.80 a δ_{H} 4.23 y 4.70, así como señales asignables a un carbono carboxílico a δ_{C} 167.9 (s) y a diez carbonos correspondientes al sistema aromático del naftoílo.

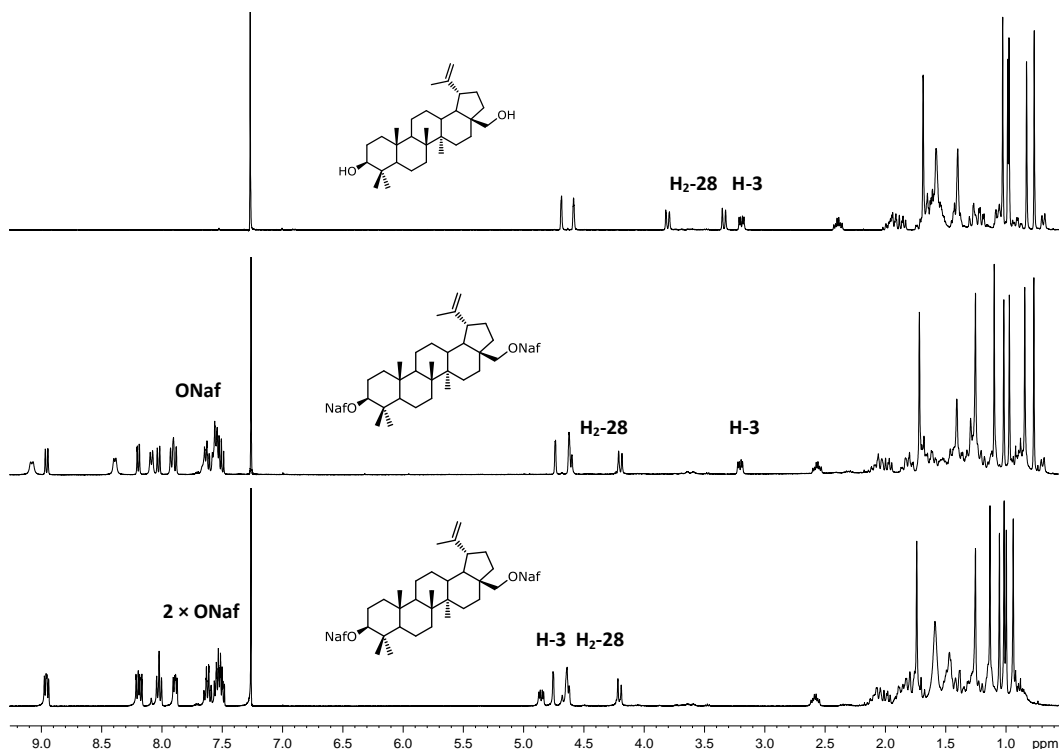


Fig. 4.14 | Espectros de RMN de ^1H de **T31** y **T36** y su producto de partida **T24** (400 MHz, CDCl_3).

Siguiendo la misma metodología que para el compuesto **T31**, en el espectro de RMN de ^1H del derivado **T36** (Fig. 4.14) se observaron, como diferencias más notables, señales correspondientes a 14 protones aromáticos y el desplazamiento de los protones H-3 (δ_{H} 4.88) y H-28 (δ_{H} 4.23, 4.67) a campos más bajos. En su espectro de RMN de ^{13}C se observaron, además de las señales características del producto de partida **T24**, señales asignadas a los 20 carbonos de los anillos aromáticos y dos carbonos carboxílicos a δ_{C} 167.3 ($2 \times \text{s}$).

III. Esterificación con cloruro de *p*-toluensulfónico

Además de los derivados de ácidos carboxílicos, se preparó un derivado de un análogo de ácido carboxílico. Así, a una disolución de betulina en diclorometano seco a temperatura ambiente y en atmósfera de argón, se le añadió cloruro de *p*-toluensulfónico y DMAP (Fig. 4.15). Tras agitación durante tres días, el crudo de reacción se purificó por extracción y cromatografía en capa fina de gel de sílice preparativa usando como fase móvil hexanos–AcOEt (7.5:2.5), para obtener 13.6 mg del derivado **T33** (19% de rendimiento). Si bien este derivado se había descrito con anterioridad, en

esta memoria se indican sus datos espectroscópicos y espectrométricos, ya que éstos no han sido reportados hasta la fecha⁵⁹.

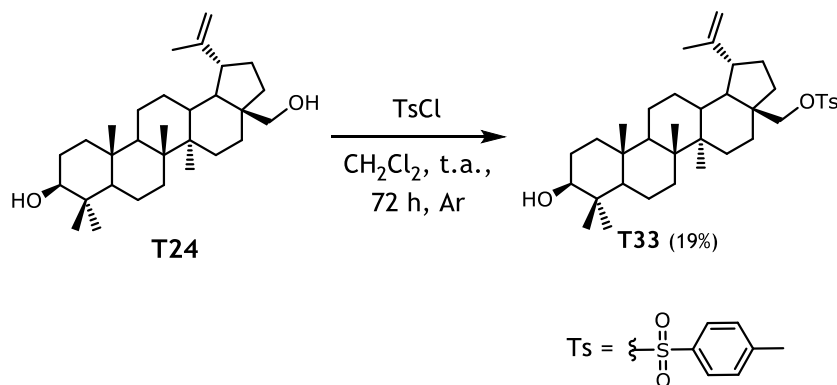


Fig. 4.15 | Síntesis del compuesto T33 a partir de betulina (T24).

Así, en su espectro de ^1H de RMN (Fig. 4.16), se observa el desplazamiento de las señales correspondientes a los protones H₂-28 a campo mas bajo con respecto al producto de partida betulina (T24), así como la presencia de señales asignables al grupo tosilo a δ_{H} 2.48 (3H, s), 7.36 (2H, d, $J = 8.4$ Hz) y 7.81 (2H, d, $J = 8.4$ Hz). En su espectro de RMN de ^{13}C (Fig. 4.17), se observan como principales diferencias con el espectro del producto de partida, la aparición de las señales correspondientes a un grupo tosilo a δ_{C} 144.7 (s), 132.9 (s), 129.9 (2 × d), 128.1 (2 × d) y 21.6 (c).

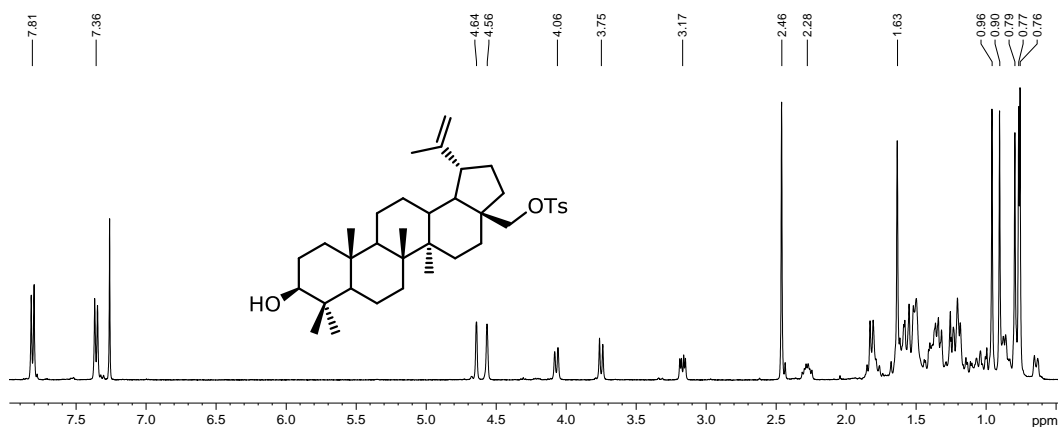


Fig. 4.16 | Espectro de RMN de ^1H del derivado T33 (CDCl_3 , 400 MHz).

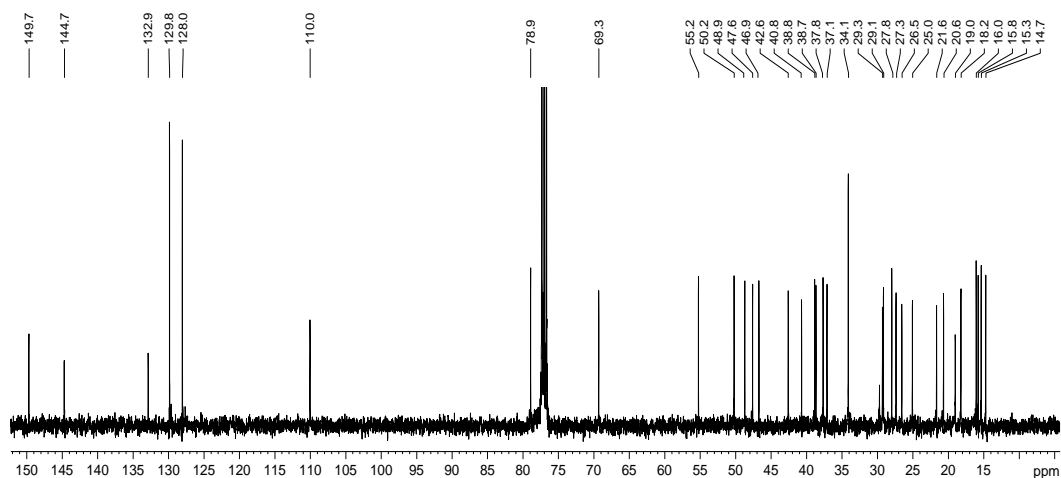


Fig. 4.17 | Espectro de RMN de ^{13}C del derivado T33 (CDCl_3 , 100 MHz).

Tabla 4.2 | Datos de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de los compuestos T24, T30–T32, T35 y T36. Los valores de desplazamiento δ se basan en experimentos de RMN tipo COSY y HSQC editado. La multiplicidad y las constantes de acoplamiento J en Hz se indican en paréntesis. Los valores que se indican sin multiplicidad corresponden a señales cuya multiplicidad no se logró determinar por solapamiento completo. El * indica señales que presentan el mismo centro de la señal, pero cuya multiplicidad se podía determinar.

Posición	T24	T30	T31	T32	T35	T36
3	3.19 dd (5.0, 11.2)	3.21 dd (5.1, 11.2)	3.23 dd (5.0, 11.0)	3.21 dd (6.0, 11.0)	3.20 dd (6.8, 11.6)	4.88 dd (5.1, 11.3)
19	2.40 dt (6.2, 11.2)	2.50 dt (5.7, 11.2)	2.59 dt (6.0, 11.0)	2.53 dt (6.0, 11.0)	2.47 dt (6.8, 11.6)	2.61 dt (5.9, 11.0)
23	0.97 s	0.99 s	1.00 s	0.99 s	0.99 s	1.04 s
24	0.76 s	0.78 s	0.79 s	0.78 s	0.78 s	0.96 s
25	0.83 s	0.85 s	0.87 s	0.85 s	0.84 s	1.02 s
26	0.99 s	1.02 s	1.04 s	1.02	1.00 s	1.07 s
27	1.03 s	1.08 s	1.12 s	1.08 s	1.05 s	1.15 s
28	3.34 d, 3.80 d (11.1)	4.12 d, 4.54 d (10.8)	4.23 d (11.0), 4.70* m	4.10 d, 4.51 d (11.3)	3.86 d, 4.28 d (10.6)	4.23 d (10.3), 4.67* m
29	4.59 s, 4.69 s	4.74 s, 4.63 s	4.70* m	4.73 s, 4.63 s	4.71 s, 4.61 s	4.67* m, 4.78 s
30	1.69 s	1.72 s	1.74 s	1.72 s	1.70 s	1.76 s

Tabla 4.3 | Datos de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) de los compuestos T24, T30–T32, T35 y T36. Los valores de desplazamiento δ se basan en experimentos de RMN HMBC y HSQC editado. El * indica señales que presentaron el mismo desplazamiento.

Posición	T24	T30	T31	T32	T35	T36
1	38.8 t	38.8 t	38.7 t	38.7 t	38.4 t	38.5 t
2	27.4 t	27.4 t	27.4 t	27.4 t	28.9 t	27.2 t
3	78.9 d	79.0 d	79.1 d	79.0 d	80.6 d	81.7 d
4	38.9 s	38.9 s	38.9 s	38.9 s	37.8 s	38.2 s
5	55.3 d	55.4 d	55.3 d	55.3 d	55.4 d	55.6 d
6	18.3 t	18.3 t	18.3 t	18.3 t	18.2 t	18.2 t
7	34.2 t	34.8 t	34.8 t	34.7 t	34.6 t	34.8 t
8	40.9 s	40.9 s	40.9 s	40.9 s	40.9 s	41.0 s
9	50.4 d	50.4 d	50.4 d	50.4 d	50.3 d	50.4 d
10	37.1 s	37.2 s	37.2 s	37.7 s	37.1 s	37.1 s
11	20.9 t	20.8 t	20.8 t	20.8 t	20.8 t	20.9 t
12	25.2 t	25.2 t	25.3 t	25.2 t	25.2 t	25.2* t
13	37.3 d	37.7 d	37.7 d	37.7 d	37.6 d	37.7 d
14	42.7 s	42.8 s	42.8 s	42.8 s	42.7 s	42.8 s
15	27.1 t	27.2 t	27.2 t	27.1 t	27.1 t	25.2* t
16	29.2 t	29.7 t	29.7 t	29.7 t	29.1 t	29.7 t
17	47.8 s	47.8 d	47.8 d	47.8 d	47.8 d	46.8 d
18	48.7 d	49.0 d	49.0 d	48.9 d	48.9 d	49.0 d
19	47.8 d	46.7 d	46.8 d	46.7 d	46.4 d	47.8 d
20	150.8 s	150.1 s	150.2 s	150.0 s	150.2 s	150.2 s
21	29.7 t	30.0 t	30.1 t	30.0 t	29.7 t	30.1 t
22	34.0 t	34.2 t	34.2 t	34.2 t	34.5 t	34.2 t
23	28.0 c	28.0 c	28.0 c	28.0 c	28.0 c	28.2 c
24	15.3 c	15.4 c	15.4 c	15.3 c	16.5 c	16.9 c
25	16.1 c	16.2 c	16.1 c	16.1 c	16.1 c	16.2 c
26	16.0 c	16.1 c	16.8 c	16.0 c	16.0 c	16.1 c
27	14.9 c	14.8 c	14.8 c	14.8 c	14.7 c	14.8 c
28	60.6 t	63.3 t	63.4 t	63.6 t	62.6 t	63.4 t
29	109.7 t	109.9 t	109.9 t	110.0 t	109.8 t	109.9 t
30	19.1 c	19.2 c	19.2 c	19.2 c	19.1 c	19.2 c

B | Preparación de un bioisótero de silicio

La formación de **bioisósterios por un intercambio carbono-silicio** es una estrategia en Química Médica en la búsqueda de nuevos candidatos a fármacos que amplía el espacio químico y, además, ha sido poco explotada. Aunque hay muchas similitudes entre carbono y silicio, la sustitución de un átomo de carbono por silicio puede modificar las propiedades fisicoquímicas y biológicas en el análogo de silicio. Así, este tipo de bioisósteros tienen una mayor lipofilia, el silicio es más electronegativo y los

enlaces carbono-silicio son más largos. De esta manera, se pueden ver afectados la selectividad, potencia, metabolismo y distribución del bioisómero en el organismo⁶⁰.

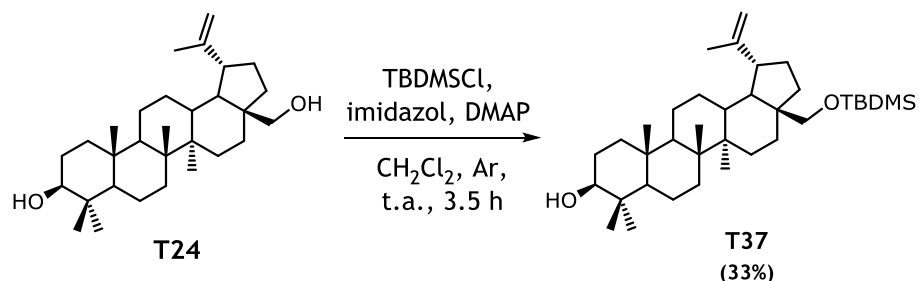


Fig. 4.18 | Síntesis del compuesto T37 a partir de betulina (T24).

Con este objetivo, nos planteamos la formación de un éter con cloruro de *tert*-butildimetilsililo (TBDMS), que, por otra parte, es ampliamente usado como grupo protector en síntesis. Así, se trató una disolución de betulina **T24** en diclorometano seco con cloruro de TBDMS, DMAP y una cantidad catalítica de imidazol a temperatura ambiente y bajo atmósfera de argón (Fig. 4.18). Se agitó durante 3.5 h y el crudo de reacción se purificó mediante cromatografía en capa fina preparativa de gel de sílice, usando como fase móvil una mezcla de hexanos–AcOEt (3:2), obteniéndose 25.8 mg del producto **T37** como sólido amorfo (33% de rendimiento).

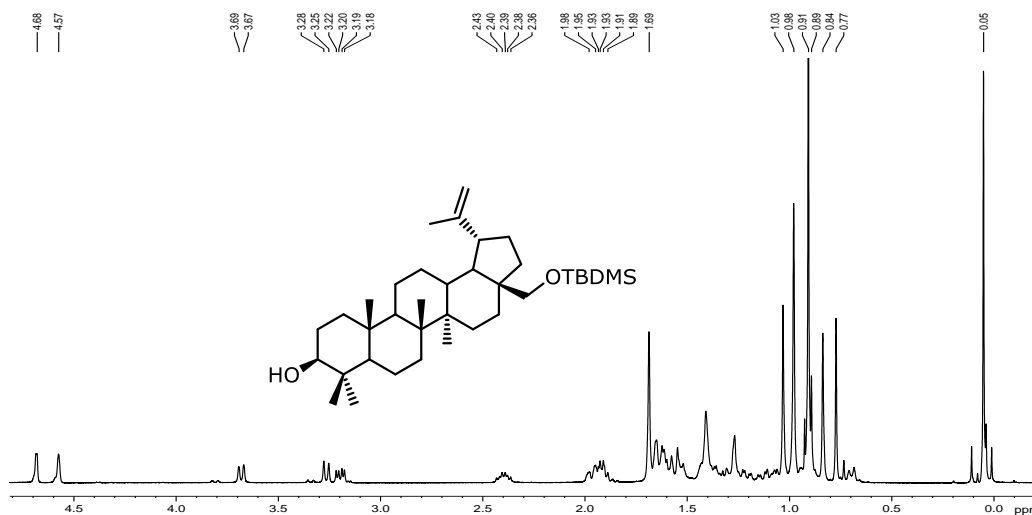


Fig. 4.19 | Espectro de RMN de ¹H del derivado T37 (CDCl₃, 400 MHz).

⁶⁰ SHOWELL, G. A.; MILLS, J. S. (2003). Chemistry challenges in lead optimization: silicon isosteres in drug discovery. *Drug Discov. Today*, 8(12), 551–556.

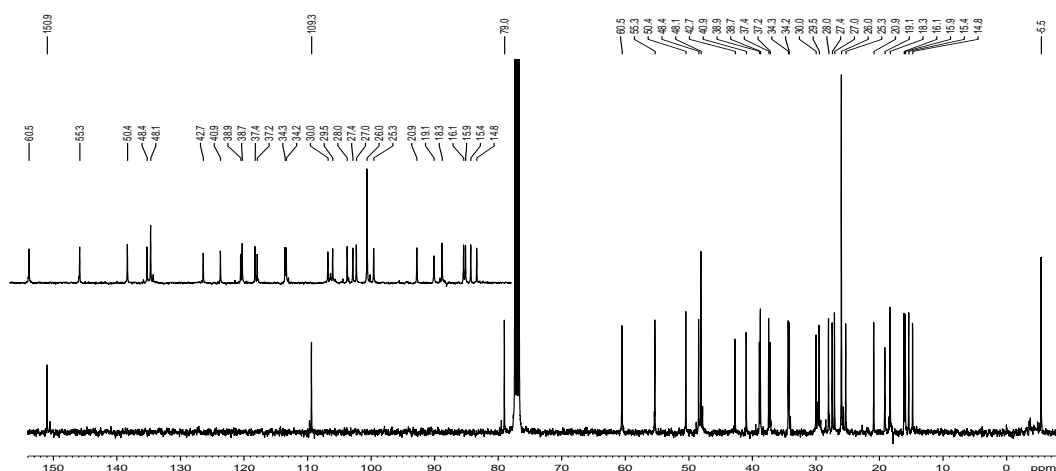


Fig. 4.20 | Espectro de RMN de ^{13}C del derivado **T37** (CDCl_3 , 100 MHz).

La estructura de **T37**, 28-O-(*tert*-butildimetilsilil)-betulina, anteriormente descrito⁶¹, fue determinada de igual manera que el resto de los derivados mediante el estudio de sus datos espectrométricos y espectroscópicos. En esta Memoria de Tesis, se aportan los datos de RMN de ^1H y ^{13}C ya que no se han reportados en la bibliografía química.

Así, en su espectro de RMN de ^1H (Fig. 4.19), se observan dos señales singuletes a δ_{H} -0.04 (6H) y 0.90 (9H) correspondientes a los metilos del TBDMS, así como el desplazamiento a campos más bajos de los protones H₂-28 con respecto al producto de partida. Asimismo, en su espectro de RMN de ^{13}C (Fig. 4.20), se observan el desplazamiento de la señal correspondiente al carbono C-28 a campo más bajo (δ_{C} 60.5, t) y la presencia de señales a δ_{C} -5.5 (2 × c), 18.3 (s) y 26.0 (3 × c), asignables al grupo TBDMS.

C | Oxidación de los grupos hidroxilos

La oxidación de un grupo hidroxilo a su correspondiente carbonilo conlleva cambios en la interacción con una posible diana a través de enlaces de hidrógeno. Con el objetivo de valorar su participación en esta interacción, llevamos a cabo las oxidaciones descritas a continuación.

⁶¹ JIN, T.-S.; TIAN, R.-F.; LIU, L.-B.; ZHAO, Y.; LI, T.-S. (2006). Silica sulfate, an efficient catalyst for the trimethylsilylation of alcohols. *Synth. Comm.*, 36, 1823-1828.

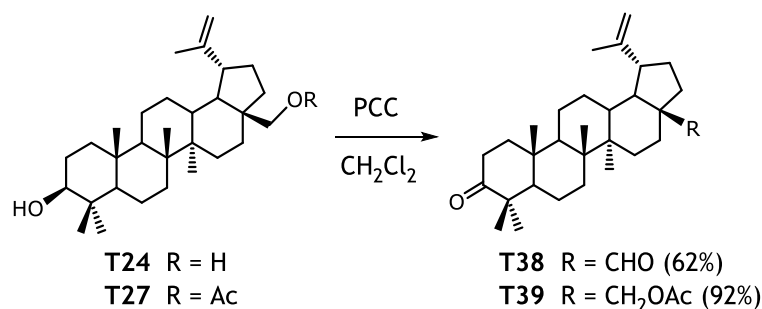


Fig. 4.21 | Síntesis de los compuestos T38 y T39.

La oxidación de betulina (**T24**) y de 28-*O*-acetilbetulina (**T27**) con clorocromato de piridinio (PCC) en diclorometano, condujo a los correspondientes derivados **T38** y **T39** (Fig. 4.21). Sus datos espectroscópicos, espectrométricos y físicos coincidieron con los descritos en la bibliografía para 3-oxo-lup-20(29)-en-28-al (betulonal, **T38**)⁶² y 28-*O*-acetyl-3-oxobetulin (**T39**)⁶³.

Así, comparación de los espectros de RMN de ¹H y ¹³C de los derivados **T38** y **T39** con los de sus productos de partida **T24** y **T27**, mostró como diferencias más destacables la desaparición de la señales correspondientes al grupo hidroximetileno en **T24** (δ_{H} 3.34 y 3.80 y δ_{C} 60.6) así, como de las señales correspondientes al grupo hidroxilo sobre C-3 (δ_{H} 3.19 y δ_{C} 78.9 en **T24** y δ_{H} 3.17 y δ_{C} 78.7 en **T27**). Por otra parte, se observó la presencia de señales singuletes asignables a carbonilo (δ_{C} 218.3 y 217.8 en **T38** y **T39**, respectivamente) y aldehído (δ_{H} 9.68 y δ_{C} 206.0, d) en **T38**. Estos datos están de acuerdo con las estructuras propuestas para **T38** y T39 como 3-oxo-lup-20(29)-en-28-al (betulonal) y 28-*O*-acetyl-3-oxobetulina, respectivamente (Fig. 4.21).

4.2.3 | Modificación de la unidad de isopropenilo

La presencia de un doble enlace confiere la posibilidad de interacciones a través de enlaces Van der Waals entre el compuesto y la molécula diana. Ya que el papel de la unidad de isopropenilo sobre el carbono C-19 en la actividad anti-VIH ha sido poco investigado^{17,64}, nos planteamos la modificación de la misma para ampliar el

⁶² WEI, Y.; MA, C.-M.; HATTORI, M. (2009). Synthesis and evaluation of A-seco type triterpenoids for anti-HIV-1 protease activity. *Eur. J. Med. Chem.*, 44, 4112–4120.

⁶³ KOROVIN, A. V.; TKACHEV, A. V. (2001). Synthesis of quinoxalines fused with triterpenes, ursolic acid and betulin derivatives. *Russ. Chem. Bull.* [Traducción de *Izvestiya Akademii Nauk, Seriya Khimicheskaya*], 50 (2), 304–310.

⁶⁴ HASHIMOTO, F.; KASHIWADA, Y.; COSENTINO, L. M.; CHEN, CH.-H.; GARRETT, P. E.; LEE, K. H. (1997). Anti-AIDS agents. XXVII. Synthesis and anti-HIV activity of betulinic acid and dihydrobetulinic acid derivatives. *Bioorg. Med. Chem.*, 39, 2133–2143.

conocimiento en el SAR de este grupo. De esta manera, se realizaron la dihidroxilación y la epoxidación del doble enlace $\Delta^{20(29)}$ así como la oxidación alílica, obteniéndose los compuesto **T40–T42** (Fig. 4.22).

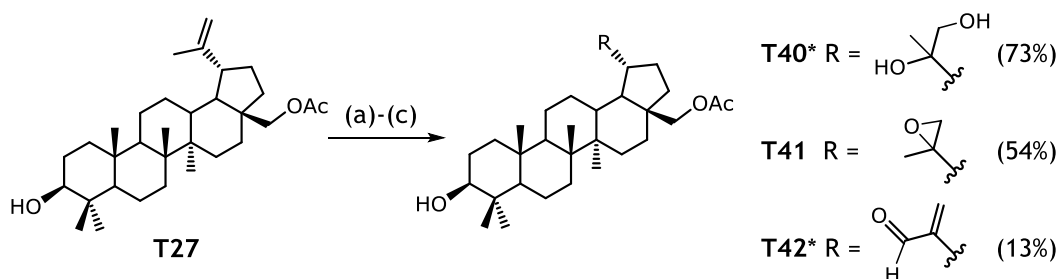


Fig. 4.22 | Síntesis de los compuestos **T40–T42**. Reactivos: (a) NMO, OsO₄, THF/H₂O. (b) AMCPB, NaHCO₃, CH₂Cl₂. (c) SeO₂, EtOH.

Con tal objetivo, la 28-*O*-acetilbetulina (**T27**) nos pareció un sustrato adecuado para llevar a cabo transformaciones en la posición C-3 y en la unidad de isopropenilo sobre C-19, fue sometido a las modificaciones que se presentan en la Fig. 4.22, rindiendo los derivados **T40–T42**. Los compuestos **T40** y **T41** se obtuvieron tras dihidroxilación del doble enlace con OsO₄ y epoxidación con ácido *m*-cloroperoxibenzoico (AMCPB), respectivamente. La oxidación alílica de **T27** con dióxido de selenio en etanol rindió el aldehído **T42** (Fig. 4.22). Comparación de los datos espectroscópicos y espectrométricos de **T41** resultaron coincidentes con los descritos para 28-acetoxi-20*R*,29-epoxi-3β-hidroxi-lupano⁶⁵, mientras que los compuestos **T40** (28-acetiloxi-3β,20*R*,29-trihidroxi-lupano) y **T42** (28-acetiloxi-3β-hidroxi-lup-20(29)-en-30-al), resultaron nuevos en la bibliografía química. A continuación, se describe la preparación y elucidación estructural de estos nuevos compuestos.

I. Dihidroxilación del doble enlace

A una disolución de **T27** y *N*-óxido de *N*-metilmorfolina (NMO) en THF–agua (1:1), se le añadió una cantidad catalítica de OsO₄ (Fig. 4.22). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 54 h y tras purificación del crudo de reacción rindió 12.5 mg del producto dihidroxilado **T40** como un sólido amorfo (73% de rendimiento).

⁶⁵ ASHAVINA, O. Y.; KABALNOVA, N. N.; FLEKHTER, O. B.; SPIRIKHIN, L. V.; GALIN F. Z.; BALTINA, L. A.; STARIKOVA, Z. A.; ANTIPIN, M. Y.; TOLSTIKOV, G. A. (2004). Oxidation of betulin and its acetates with dimethyloxirane. *Mendeleev Commun.*, 221–223.

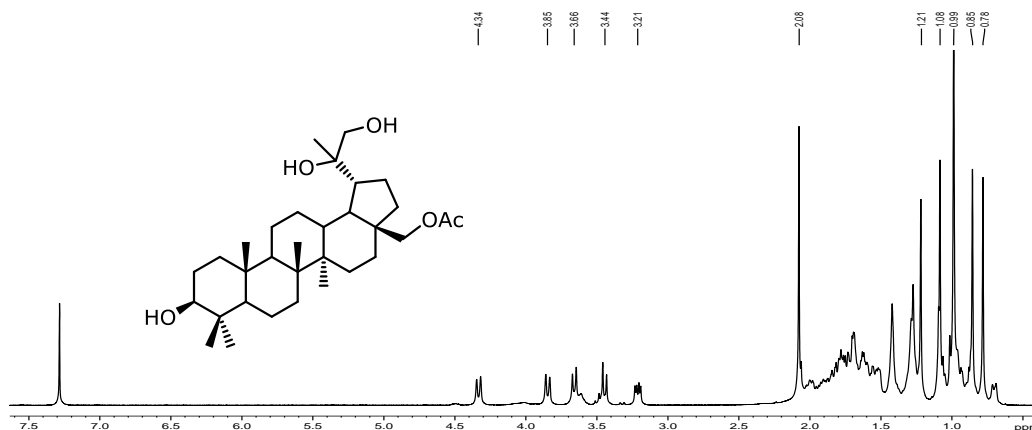


Fig. 4.23 | Espectro de RMN de ^1H del derivado **T40** (CDCl_3 , 400 MHz).

El análisis de sus datos físicos, espectroscópicos y espectrométricos nos mostró una fórmula molecular de $\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{O}_4$ [$\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$], determinada por espectrometría de masas de alta resolución. En sus espectros de RMN de ^1H (Fig. 4.23) y ^{13}C (Fig. 4.24), se observaron, al compararlos con los del producto de partida **T27**, la desaparición de las señales asignados al doble enlace $\Delta^{20(29)}$ (δ_{H} 4.68, s y 4.58, s; δ_{C} 149.9 y 109.6 en **T27**). Asimismo, se observó la presencia de señales asignables a un grupo hidroxilo terciario (74.8 δ_{C}) y un grupo metileno (δ_{H} 3.66 d, $J = 10.7$, 3.44, d, $J = 10.7$ y δ_{C} 66.9). Estos datos nos permitieron establecer la estructura del derivado **T40** como la mostrada.

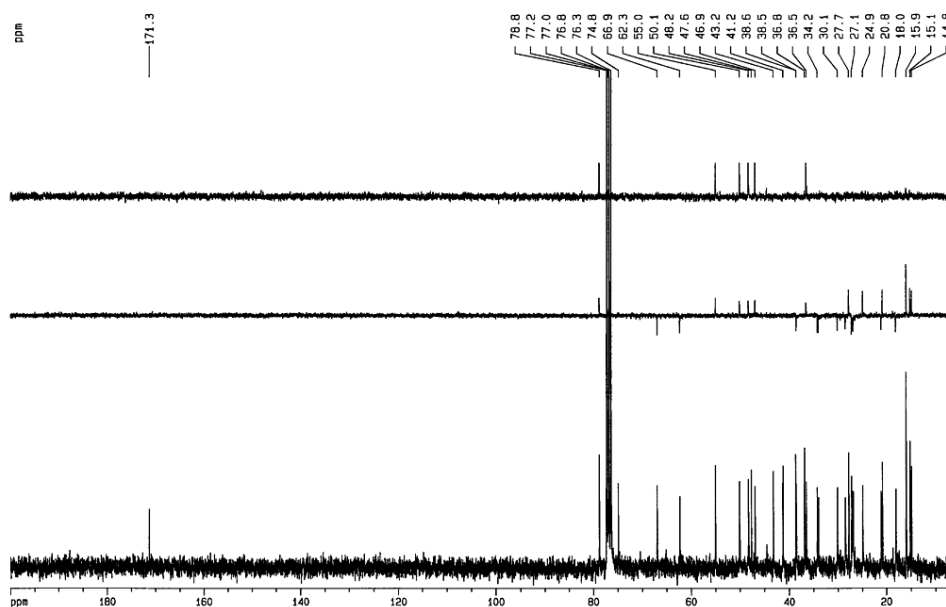


Fig. 4.24 | Espectros de RMN de DEPT90, DEPT135 y ^{13}C del derivado **T40** (CDCl_3 , 100 MHz).

II. Oxidación alílica

Por otra parte, para la oxidación alílica, a una disolución de 28-*O*-acetilbetulina (**T27**) en etanol, se le añadió SeO_2 y se calentó la reacción a reflujo bajo atmósfera de argón durante 32 h. El crudo de reacción fue purificado, rindiendo 9.3 mg de producto **T42** como un sólido amorfo (13% de rendimiento).

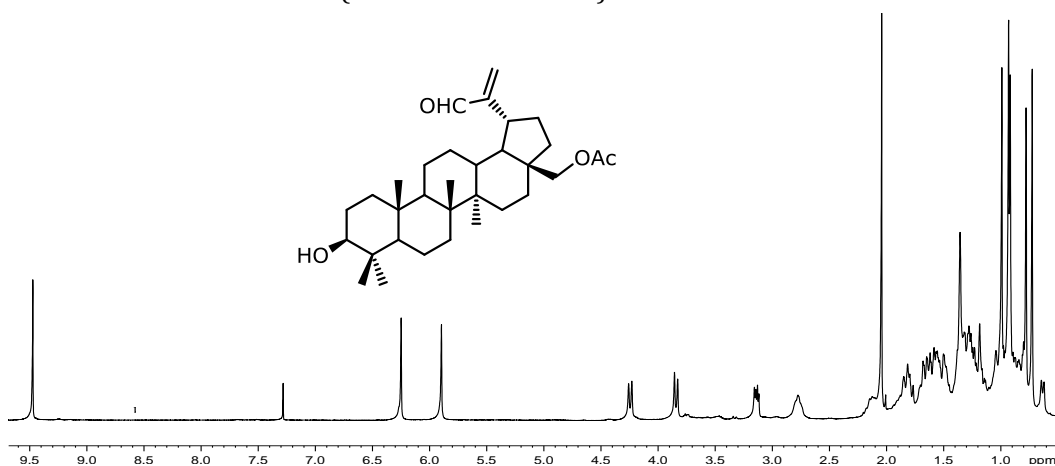


Fig. 4.25 | Espectro de RMN de ^1H del derivado **T42** (CDCl_3 , 400 MHz).

Su espectro de masas de baja resolución presentó un ión molecular a $498\ m/z$ y una fórmula molecular de $\text{C}_{32}\text{H}_{50}\text{O}_4$, determinada por espectrometría de masas de alta resolución. El conjunto de sus datos espectroscópicos, tanto de RMN de ^1H (Fig. 4.25) como de ^{13}C (Fig. 4.26), mostró como diferencias más significantes con respecto al producto de partida **T27**, la desaparición de las señales asignadas al Me-30 (δ_{H} 1.69 y δ_{C} 19.1), la presencia de señales correspondientes a un grupo aldehído (δ_{H} 9.47 y

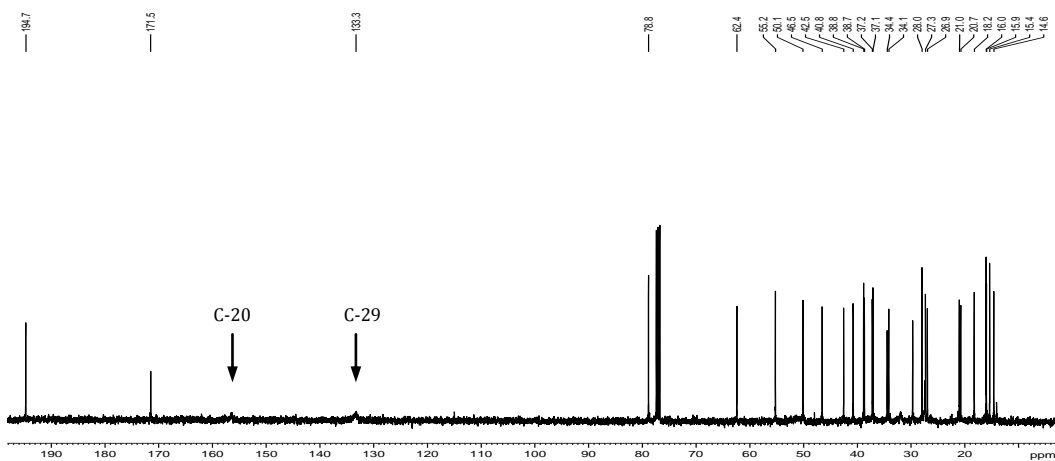


Fig. 4.26 | Espectro de RMN de ^{13}C del derivado **T42** (CDCl_3 , 100 MHz).

δ_C 194.7), así como el desplazamiento de las señales correspondientes a los protones H₂-29 a campos más bajos (de δ_H 4.58 y 4.68 a 5.91 y δ_H 6.24). Estos datos están de acuerdo con la estructura propuesta para el derivado **T42**.

La posición de los grupos funcionales en la molécula y la asignación de los carbonos cuaternarios se estableció mediante un experimento HMBC, en el cual podemos destacar la correlación entre los metilos 23 y 24 a δ_H 0.93 y 0.78, respectivamente, con un carbono secundario unido a oxígeno a δ_C 78.8 (d), lo que sitúa el grupo hidroxilo sobre el carbono C-3. Además, se observó correlación del carbono C-30 a δ_C 194.7 (d) y los protones del metileno H-29 a 5.91 y δ_H 6.24 y el protón H-19 (δ_H 2.77). La correlación entre el grupo carboxílico a δ_C 171.5 (s) con los protones H-28 (δ_H 3.86 y 4.24), sitúa el grupo acetato sobre el carbono C-28 (Fig. 4.27).

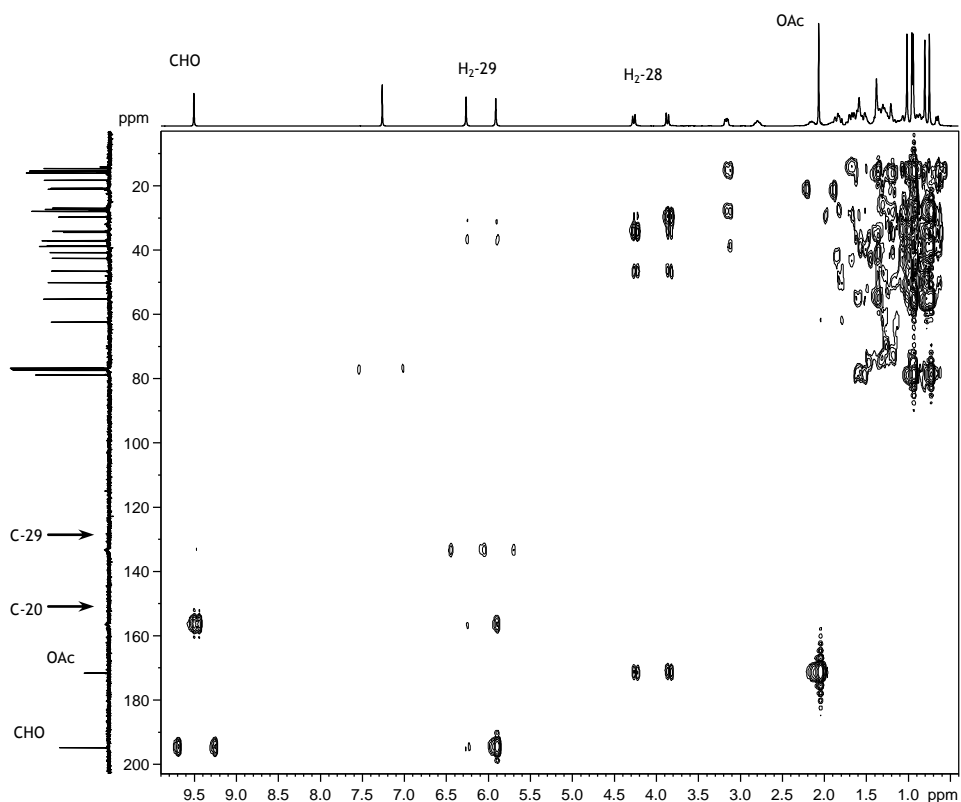


Fig. 4.27 | Experimento HMBC del derivado **T42**.

La estereoquímica del alcohol primario se estableció mediante el estudio de las constantes de acoplamiento y análisis de un experimento ROESY, en el cual se observó correlación espacial del protón H-3 con H-5 y Me-23, así como del protón H-19 con uno de los protones H-28 (Fig. 4.28). Estos datos nos permitieron a establecer la estructura del compuesto **T42** como 28-acetoxi-3 β -hidroxi-lup-20(29)-en-30-al.

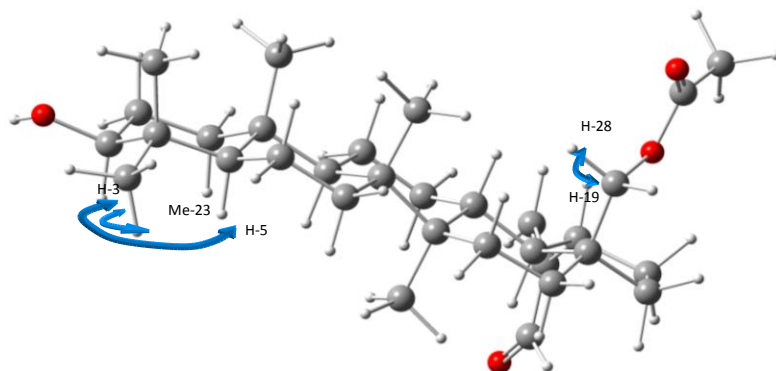


Fig. 4.28 | Correlaciones espaciales más significativas observados en un experimento ROESY en el compuesto **T42** (estructura optimizada con el método semiempírico AM1).

III. Acetilación de los hidroxilos sobre el carbono C-30

Con el objetivo de evaluar la influencia del hidroxilo sobre el carbono C-30, se llevó a cabo la acetilación de los TPLs naturales **T8** y **T18** con anhídrido acético (Fig. 4.29). Así, a una disolución de **T8** o **T18** en diclorometano seco se le añadió una cantidad catalítica de DMAP, Et₃N y anhídrido acético. La mezcla de reacción se agitó durante media hora a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón y, posteriormente, se purificaron los crudos de reacción obteniéndose **T43** (6.7 mg, 70% de rendimiento) y **T44** (5.0 mg, 95% de rendimiento) como sólidos amorfos (Fig. 4.29). Sus datos espectroscópicos y espectrométricos de **T44** fueron idénticos con los reportados para 3 β ,30-diacetoxy-lup-20(29)-eno⁶⁶.

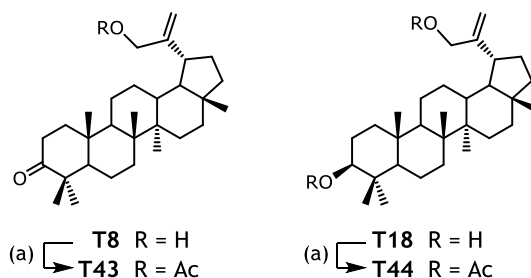


Fig. 4.29 | Síntesis de los compuestos **T43** y **T44**. Condiciones de reacción: (a) Ac₂O, piridina.

Por otra parte, aportamos los datos de RMN de ¹H y ¹³C del derivado 30-acetoxi-3-oxo-lup-20(29)-eno (**T43**) cuya estructura ha sido reportado en la bibliografía química anteriormente⁶⁷ sin indicar sus datos de RMN. El análisis de los espectros de RMN de ¹H

⁶⁶ ULLAH, N.; AHMED, Z.; MUHAMMAD, P.; MALIK, A. (1999). A pentacyclic triterpene from *Daphne oleoides*. *Phytochem.*, 50, 839-841.

⁶⁷ GONZALEZ, A. G.; BAZZOCCHI, I. L.; RAVELO, A. G.; LUIS, J. G.; DOMINGUEZ, X. A.; VAZQUEZ, G.; CANO, G. (1987). Triterpenos y triterpenoquinonas de *Rzedowskia tolantogensis* (Celastraceae). *Rev. Latinoam. Quim.*, 18(2), 83-87.

de los derivados **T43** y **T44**, mostró como principal diferencia con sus correspondientes productos de partida la presencia de las señales singuletes asignables al grupo acetato (δ_H 2.10 y 2.09).

4.2.4 | Introducción de átomos de halógeno

Como se ha comentado en el apartado correspondiente a las transformaciones de los sesquiterpenos, los halógenos confieren una marcada influencia en la actividad biológica de los compuestos orgánicos. Así, uno de cada tres fármacos posee un átomo de halógeno, por lo que su introducción en una molécula resulta una buena estrategia para potenciar la actividad de un cabeza de serie. Por otra parte, ayuda a evaluar el papel de un grupo hidroxilo si éste se sustituye por un halógeno, eliminando de esta manera cualquier tipo de interacción mediante enlaces de hidrógeno.

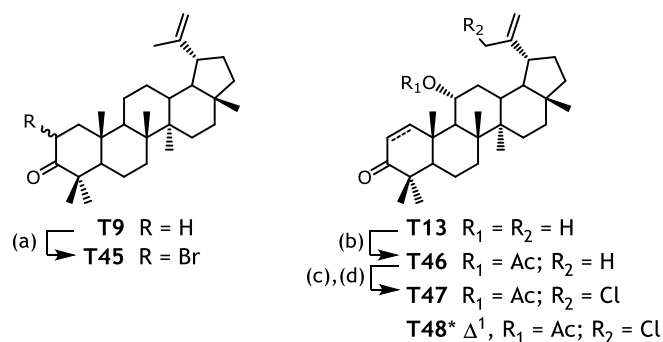


Fig. 4.30 | Síntesis de los compuestos **T45**, **T46**, **T47** y **T48**. Condiciones de reacción: (a) PTAB, THF. (b) Ac₂O, Et₃N, DMAP, CH₂Cl₂ (c) PhSeCl, AcOEt. (d) MCPBA, piridina.

Siguiendo tal estrategia, se preparó el derivado bromado sobre el carbono C-3 (**T45**) a partir del producto natural **T9**. Por otra parte, el producto **T13** se protegió mediante acetilación (**T46**) y, posteriormente, se llevó a cabo la halogenación, obteniéndose los derivados clorados sobre C-30, **T47** y **T48** (Fig. 4.30). La metodología seguida para la preparación de estos derivados se detalla en la parte experimental de esta Memoria de Tesis. El análisis de los datos físicos, espectroscópicos y espectrométricos de los derivados **T45** y **T47** resultaron idénticos con los descritos para 2-bromo-3-oxo-lup-20(29)-eno⁶⁸ y 11α-acetoxi-30-cloro-3-oxo-lup-20(29)-eno⁴⁷, respectivamente, mientras que el compuesto **T48** resultó nuevo en la bibliografía química.

⁶⁸ GONZÁLEZ, A. G.; FRAGA, B. M.; GONZÁLEZ, P.; RAVELO, A. G. (1977). Synthesis of glochidone and 1β,3β-dihydroxylup-20(29)-ene from lupeol. *Anales de Química*, 73(1), 105-107.

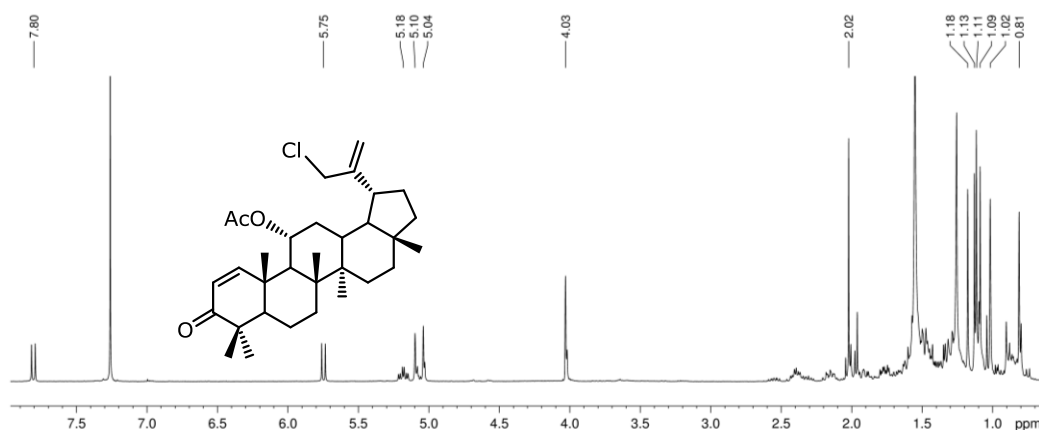


Fig. 4.31 | Espectro de RMN de ^1H del derivado **T48** (400 MHz).

El análisis de los datos físicos, espectroscópicos y espectrométricos del nuevo derivado **T48** nos mostró una fórmula molecular de $\text{C}_{32}\text{H}_{47}\text{ClO}_3$ [M^+], determinada por espectrometría de masas de alta resolución. En su espectro de RMN de ^1H (Fig. 4.31) y ^{13}C se observaron, al compararlos con los de su producto de partida **T46** la presencia de dos protones metínicos (7.80, d, $J = 10.4$ Hz, H-1 y 5.75, d, $J = 10.4$ Hz, H-2) correspondientes a un doble enlace Δ^1 , y una señal singlete a δ_{H} 4.03 (H-30) correspondiente a dos protones metilénicos. Su espectro de RMN de ^{13}C nos mostró la presencia de dos señales dobletes a δ_{C} 163.2 (C-1) y 124.5 (C-2), datos que nos permitieron establecer la estructura del derivado **T48** como 11 α -acetiloxi-30-cloro-3-oxo-lup-2,20(29)-dieno.

Conclusión

La serie de 48 triterpenos, tanto naturales como derivados, basados en el esqueleto de lupano que obtuvimos durante el desarrollo de esta Memoria de Tesis, no sólo están sustituidos en las posiciones C-3 y/o C-28 como en la mayoría de los TPLs reportados en la bibliografía, sino que aportan nuevas sustituciones en las posiciones C-1, C-2, C-11, C-25, C-29 o C-30. Así, nuestro estudio incluye por primera vez una serie de análogos con un patrón de sustitución adicional, lo que permite evaluar la importancia de dichas posiciones en la actividad anti-VIH, y, de esta manera, abrir un abanico de posibilidades en el desarrollo de nuevos agentes anti-VIH basados en el esqueleto de triterpeno lupano.

4.3 | PARTE EXPERIMENTAL:

Preparación de una quimioteca de TPLs

Se prepararon una serie de 22 análogos, que hemos denominado del **T27** al **T48** (Fig. 4.32), con el objetivo de modular la actividad biológica como inhibidores de la replicación de VIH. Los derivados **T30–32**, **T35**, **T36**, **T40**, **T42** y **T48**, que se indican en la figura con un asterisco, resultaron nuevos en la bibliografía química.

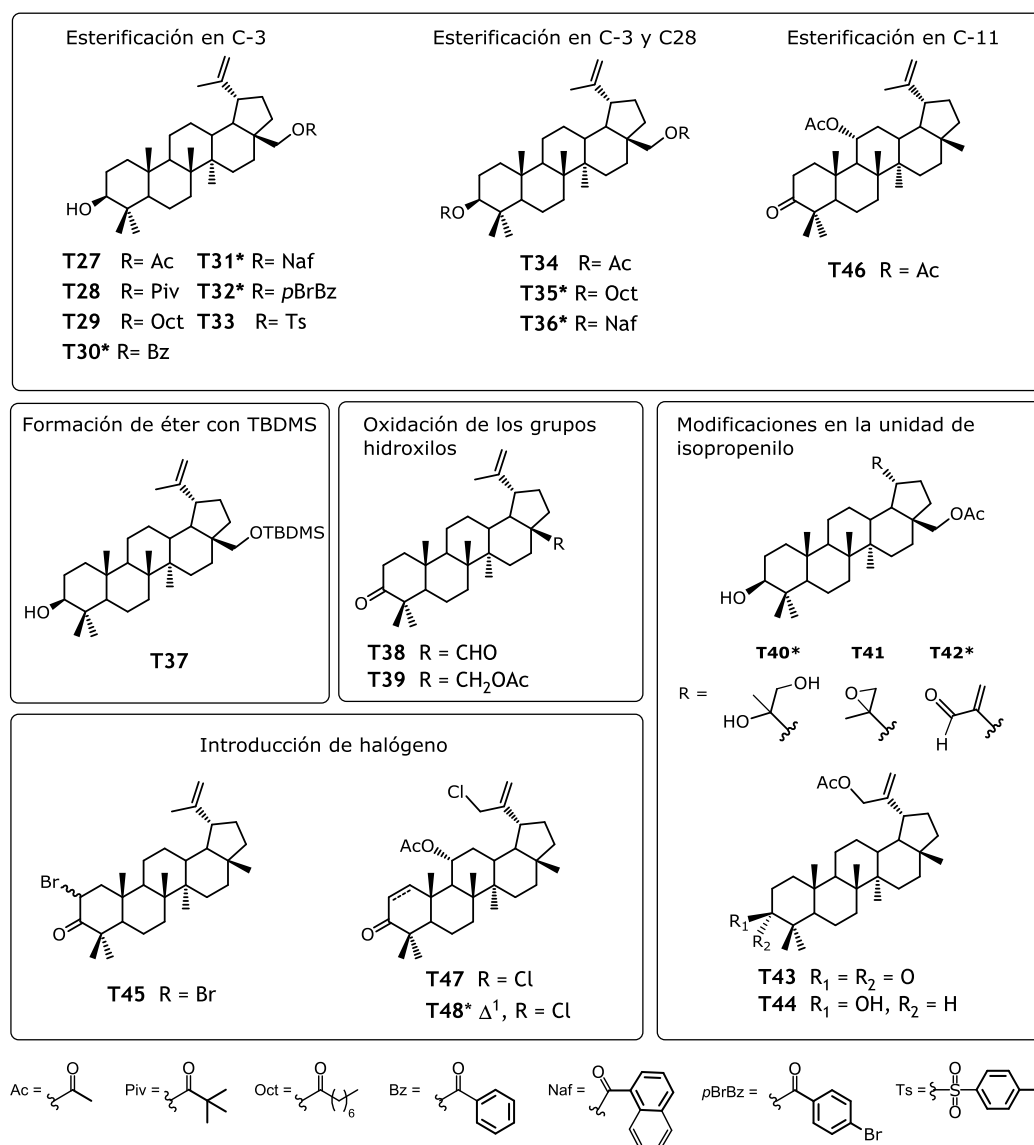
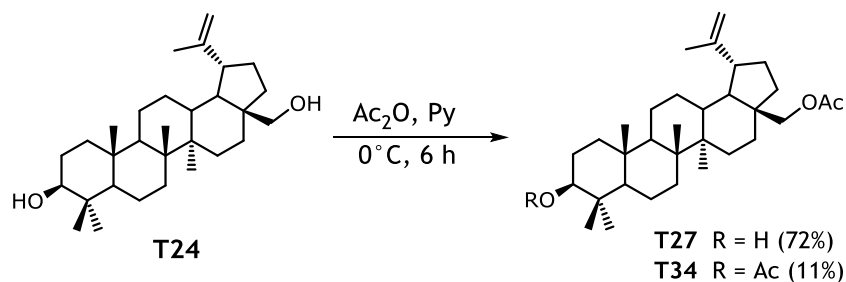


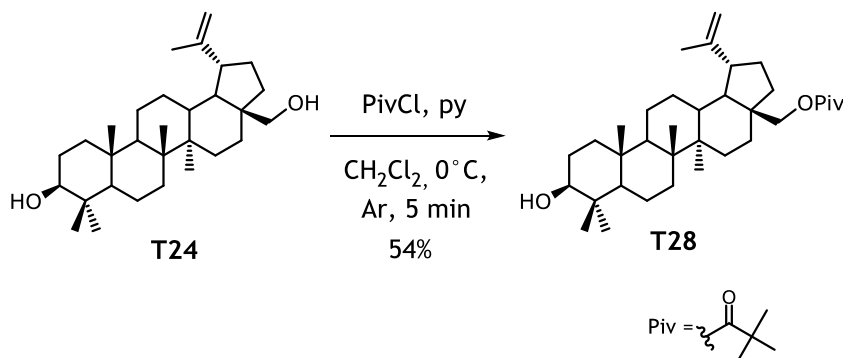
Fig. 4.32 | Derivados preparados a partir de los TPLs naturales T8, T9, T13, T18 y T24.

Preparación de T27 y T34:



A una disolución de 445.5 mg (1.0 mmol) de betulina (**T24**) en 4 mL de piridina, se le añadió 0.1 mL de anhídrido acético (1.1 mmol). La reacción se agitó durante 6 h a 0 °C, tras lo cual se adicionó etanol y se llevó a sequedad en el rotavapor. El residuo obtenido fue purificado por cromatografía en columna *flash*, usando como eluyente hexanos-acetato de etilo (AcOEt) en un gradiente de polaridad creciente (5–30%), obteniéndose 352.2 mg del derivado monoacetilado **T27** (72% de rendimiento) y 57.9 mg del derivado diacetilado **T34** (11% de rendimiento) como sólidos amorfos. Sus datos físicos y espectroscópicos fueron idénticos con los datos reportados anteriormente para las estructuras de 28-*O*-acetilbetulina y 3,28-di-*O*-acetilbetulina, respectivamente.

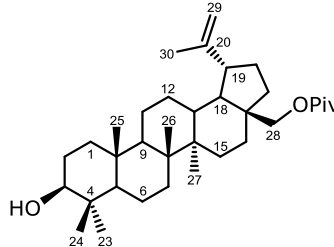
Preparación de T28:



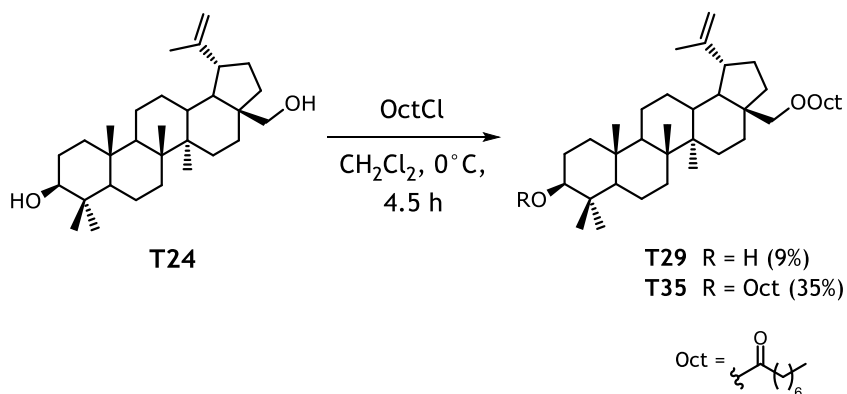
A una disolución de 22.7 mg de betulina (**T24**, 0.05 mmol) en 2 mL de CH_2Cl_2 seco y 0.5 mL de piridina seca, se le añadió cloruro de pivaloilo (0.04 mL, 0.32 mmol). La reacción se agitó durante 5 min a 0°C en atmósfera de argón, hasta que se observó por cromatografía de capa fina en gel de sílice (hexanos-AcOEt, 9:1) la conversión completa del producto de partida. A continuación, se adicionó 1 mL de etanol, se agitó a temperatura ambiente durante 30 min, se adicionó agua y se extrajo con diclorometano tres veces. La capa orgánica se lavó con disolución de sulfato de cobre al 5% y, a continuación, con disolución saturada de cloruro sódico. Se secó sobre sulfato magnésico anhidro y se llevó a sequedad. El crudo de reacción se fraccionó mediante cromatografía en columna *flash*, usando como eluyente un gradiente de hexanos-acetato de etilo de 0–30%, obteniéndose 14.6 mg de producto monoesterificado **T28** (54% de rendimiento) como un sólido amorfo. Su estructura fue idéntica con la para 28-*O*-pivaloilbetulina [28-pivaloiloxi-lup-20(29)-eno] descrita anteriormente. Sin embargo, se aportan sus datos espectroscópicos y espectrométricos, ya que éstos no han sido reportados hasta la fecha.

Derivado T28

28-Pivaloiloxi-lup-20(29)-eno

Datos físicos y espectroscópicos	<p>$[\alpha]_D^{20}$: +3.6° (c 1.45, CHCl₃).</p> <p>IR ν_{\max} (película): 3335, 2942, 2870, 1726, 1640, 1464, 1285, 1156, 757 cm⁻¹.</p>	
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN-¹H δ: (CDCl₃, 400 MHz)</p> <p>0.79 (3H, s, H-24), 0.84 (3H, s, H-25), 0.98 (3H, s, H-23), 0.99 (3H, s, H-26), 1.05 (3H, s, H-27), 1.70 (3H, s, H-30), 2.47 (1H, dt, <i>J</i> = 10.9, 5.8 Hz, H-19), 3.20 (1H, dd, <i>J</i> = 11.4, 6.7 Hz, H-3), 3.82 (1H, d, <i>J</i> = 10.5 Hz, H-28), 4.28 (1H, d, <i>J</i> = 10.4 Hz, H-28), 4.61 (1H, s, H-29), 4.71 (1H, s, H-29), OPiv [1.22 (9H, s, H-3', H-4', H-5')].</p> <p>RMN-¹³C δ: (CDCl₃, 100 MHz)</p> <p>14.5 (c, C-27), 15.1 (c, C-24), 15.8 (2 × c, C-26, C-25), 18.0 (t, C-6), 19.0 (c, C-30), 20.0 (t, C-11), 25.0 (t, C-12), 26.8 (t, C-15), 27.2 (t, C-2), 27.7 (c, C-23), 29.4 (t, C-16), 29.6 (t, C-21), 34.1 (t, C-22), 34.5 (t, C-7), 36.9 (s, C-10), 37.3 (d, C-13), 38.5 (t, C-1), 38.6 (s, C-4), 40.6 (s, C-8), 42.5 (s, C-14), 46.4 (s, C-17), 47.5 (d, C-19), 48.6 (d, C-18), 50.1 (d, C-9), 55.1 (d, C-5), 62.3 (t, C-28), 78.7 (d, C-3), 109.5 (t, C-29), 150.0 (s, C-20), OPiv [27.0 (3 × c, C-3', C-4', C-5'), 38.6 (s, C-2'), 178.0 (s, C-1')].</p>	
Espectrometría de masas	<p>EM (IE) <i>m/z</i> (%): 527 (5) [M + 1]⁺, 526 [M⁺] (14), 508 (47), 493 (3), 465 (7), 424 (27), 411 (26), 363 (2), 318 (2), 229 (9), 207 (46), 189 (80), 147 (26), 135 (52), 95 (48).</p> <p>EMAR (IE) <i>m/z</i>:: Calculado para C₃₅H₅₈O₃ [M⁺]: 526.4386. Observado 526.4398.</p>	

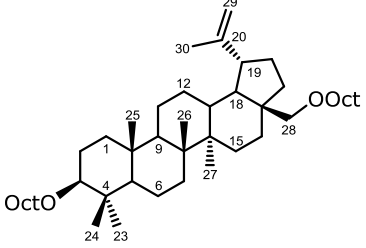
Preparación de T29 y T35:



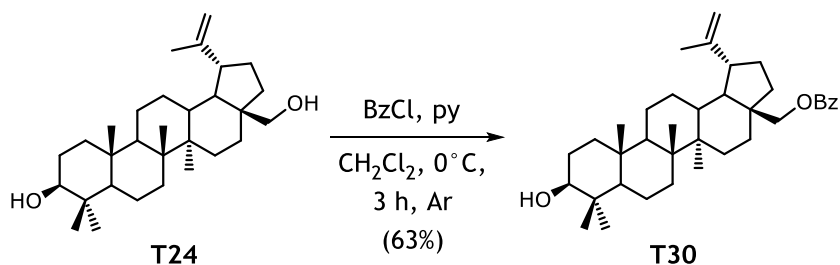
A una disolución de 41.0 mg de betulina (**T24**, 0.09 mmol) se añadieron 0.4 mL de una disolución, previamente preparada, que contenía 0.1 mL de cloruro de octanoílo (0.6 mmol) en 2 mL de diclorometano. La reacción se llevó a cabo a 0 °C durante 4.5 h. Una vez finalizada la reacción, el crudo se purificó por cromatografía en capa fina preparativa, usando como fase móvil hexanos-acetato de etilo (4:1). Se obtuvieron 4.5 mg del monoéster de octanoílo **T29** (9% de rendimiento) y 22.5 mg del diéster **T35** (35% de rendimiento) como sólidos amorfos. Los datos espectrométricos y espectroscópicos de **T29** fueron coincidentes con los de 28-*O*-octanoilbetulina, mientras que el compuesto **T35** resultó nuevo en la bibliografía química.

Derivado T35:

3 β ,28-Dioctanoiloxi-lup-20(29)-eno

Datos físicos y espectroscópicos	<p>$[\alpha]_D^{20}$: +0.7° (c 2.24, CHCl₃).</p> <p>IR ν_{\max} (película): 2928, 2858, 1733, 1461, 1257, 1168, 978 cm⁻¹.</p> 
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN-¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ: 0.78 (3H, s, H-24), 0.84 (3H, s, H-25), 0.99 (3H, s, H-23), 1.00 (3H, s, H-26), 1.05 (3H, s, H-27), 1.70 (3H, s, H-30), 2.47 (1H, dt, <i>J</i> = 11.2, 6.8 Hz, H-19), 3.20 (1H, dd, <i>J</i> = 11.6, 6.8 Hz, H-3), 3.86 (1H, d, <i>J</i> = 10.6 Hz, H-28), 4.28 (1H, d, <i>J</i> = 10.6 Hz, H-28), 4.61 (1H, s, H-29), 4.71 (1H, s, H-29), 2 × OOct [0.90 (6H, t, <i>J</i> = 6.6 Hz, H-8', H-8''), 1.26 (16H, m, H-4', H-4'', H-5', H-5'', H-6', H-6'', H-7', H-7''), 1.69 (4H, m, H-3', H-3''), 2.34 (4H, t, <i>J</i> = 7.7 Hz, H-2', H-2'')].</p> <p>RMN-¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ: 14.7 (c, C-27), 16.0 (c, C-26), 16.1 (c, C-25), 16.5 (c, C-24), 18.2 (t, C-6), 19.1 (c, C-30), 20.8 (t, C-11), 25.2 (t, C-12), 27.1 (t, C-15), 28.0 (c, C-23), 28.9 (t, C-2), 29.1 (t, C-16), 29.7 (t, C-21), 34.5 (t, C-22), 34.6 (t, C-7), 37.1 (s, C-10), 37.6 (d, C-13), 37.8 (s, C-4), 38.4 (t, C-1), 40.9 (s, C-8), 42.7 (s, C-14), 46.4 (d, C-19), 47.8 (d, C-17), 48.9 (d, C-18), 50.3 (d, C-9), 55.4 (d, C-5), 62.6 (t, C-28), 80.6 (d, C-3), 109.8 (t, C-29), 150.2 (s, C-20), 2 × OOct [14.0 (c, C-8'), 15.0 (c, C-8''), 22.6 (2 × t, C-7', C-7''), 23.7 (2 × t, C-6', C-6''), 25.1 (2 × t, C-5', C-5''), 29.6 (t, C-4'), 29.8 (t, C-4''), 31.7 (2 × t, C-3', C-3''), 34.9 (2 × t, C-2', C-2''), 173.8 (s, C-1''), 174.4 (s, C-1')].</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IE) <i>m/z</i> (%): 694 [M⁺] (3), 550 (100), 507 (23), 407 (9), 393 (9), 333 (4), 229 (8), 203 (43), 189 (88), 135 (41), 95 (34).</p> <p>EMAR (IE) <i>m/z</i>: Calculado para C₄₆H₇₈O₄ [M⁺]: 694.5900. Observado 694.5935.</p>

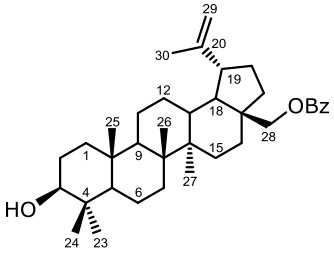
Preparación de T30



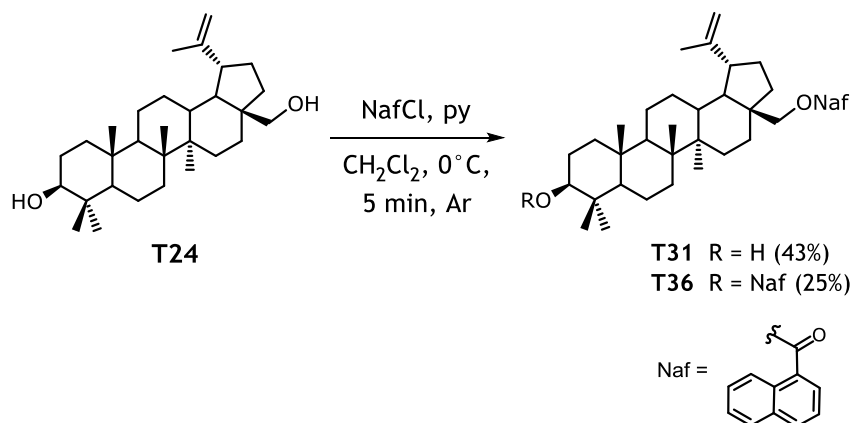
Seguindo el procedimiento general descrito para la obtención del éster de pivaloilo (compuesto **T28**), se esterificaron 40.6 mg de betulina (**T24**, 0.09 mmol) con cloruro de benzoilo (0.1 mL, 0.8 mmol) en diclorometano (2 mL). Se agitó durante 3 h a temperatura ambiente en atmósfera de argón, obteniéndose 31.8 mg (63% de rendimiento) del producto monoesterificado **T30** como un sólido amorfo.

Derivado T30:

28-Benzoiloxi-3 β -hidroxi-lup-20(29)-eno

Datos físicos y espectroscópicos	<p>$[\alpha]_D^{20}$: +1.1° (c 3.16, CHCl₃).</p> <p>UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ): 201 (3.6), 229 (3.4), 276 (2.0) nm.</p> <p>IR ν_{\max} (película): 3516, 2945, 2870, 1715, 1454, 1274, 1115, 757, 712 cm⁻¹.</p>	
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN-¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ: 0.78 (3H, s, H-24), 0.85 (3H, s, H-25), 0.99 (3H, s, H-23), 1.02 (3H, s, H-26), 1.08 (3H, s, H-27), 1.72 (3H, s, H-30), 2.54 (1H, dt, $J = 11.2, 5.7$ Hz, H-19), 3.21 (1H, dd, $J = 11.2, 5.1$ Hz, H-3), 4.12 (1H, d, $J = 10.8$ Hz, H-28), 4.54 (1H, d, $J = 10.8$ Hz, H-28), 4.63 (1H, s, H-29), 4.74 (1H, s, H-29), OBz [7.46 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, H-3', H-5'), 7.58 (1H, m, H-4'), 8.08 (2H, dd, $J = 8.4, 1.1$ Hz, H-2', H-6')].</p> <p>RMN-¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ: 14.8 (c, C-27), 15.4 (c, C-24), 16.1 (c, C-26), 16.2 (c, C-25), 18.3 (t, C-6), 19.2 (c, C-30), 20.8 (t, C-11), 25.2 (t, C-12), 27.2 (t, C-15), 27.4 (t, C-2), 28.0 (c, C-23), 29.7 (t, C-16), 30.0 (t, C-21), 34.2 (t, C-22), 34.8 (t, C-7), 37.2 (s, C-10), 37.7 (d, C-13), 38.8 (t, C-1), 38.9 (s, C-4), 40.9 (s, C-8), 42.8 (s, C-14), 46.7 (d, C-19), 47.8 (d, C-17), 49.0 (d, C-18), 50.4 (d, C-9), 55.4 (d, C-5), 63.3 (t, C-28), 79.0 (d, C-3), 109.9 (t, C-29), 150.1 (s, C-20), OBz [128.3 (2 × d, C-3', C-5'), 129.6 (2 × d, C-2', C-6'), 130.5 (s, C-1'), 132.9 (d, C-4'), 166.9 (s, -COO-)].</p>	
Espectrometría de masas	<p>EM (IE) m/z (%): 546 [M⁺] (16), 528 (33), 513 (5), 485 (7), 424 (25), 411 (20), 409 (5), 381 (4), 220 (10), 216 (19), 207 (35), 189 (60), 135 (40), 105 (100), 81 (40).</p> <p>EMAR (EI) m/z: Calculado para C₃₇H₅₄O₃ [M⁺]: 546.4073. Observado 546.4064.</p>	

Preparación de T31 y T36



Se disolvió betulina (**T24**, 16.5 mg, 0.04 mmol) en CH_2Cl_2 seco (2 mL) y piridina seca (0.5 mL) y se le añadió una disolución de cloruro de 1-naftoilo (0.1 mL, a 0.7 mmol) en CH_2Cl_2 (2 mL) a 0°C en atmósfera de argón y se agitó durante 5 min. Posteriormente, la mezcla se purificó mediante cromatografía de capa fina preparativa. El residuo se disolvió en éter etílico (5 mL), se le añadió fluoruro potásico (128 mg, 2.2 mmol), dejando agitar durante 3 h a temperatura ambiente, y se filtró sobre celita. Así, se obtuvieron 9.5 mg del derivado monoesterificado **T31** (43% de rendimiento) y 7.0 mg del producto diesterificado **T36** (25% de rendimiento) como sólidos amorfos.

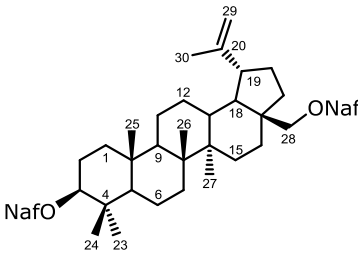
Derivado T31:

3 β -Hidroxi-28-(1-naftoiloxi)-lup-20(29)-eno

Datos físicos y espectroscópicos	<p>$[\alpha]_D^{20}$: +0.9° (c 0.95, CHCl₃).</p> <p>UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ): 211 (4.4), 221 (4.5), 237 (4.1), 294 (3.7), 325 (3.0) nm.</p> <p>IR ν_{\max} (película): 3438, 2933, 2872, 1715, 1463, 1284, 1247, 1201, 1140, 787 cm⁻¹.</p>	
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN-¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ: 0.77 (3H, s, H-24), 0.85 (3H, s, H-25), 0.97 (3H, s, H-23), 1.02 (3H, s, H-26), 1.10 (3H, s, H-27), 1.72 (3H, s, H-30), 2.56 (1H, dt, $J = 10.8, 5.7$, H-19), 3.19 (1H, dd, $J = 11.3, 5.0$ Hz, H-3), 4.20 (1H, d, H-28, $J = 12.4$ Hz), 4.61 (1H, d, H-28, $J = 12.4$ Hz), 4.63 (1H, s, H-29), 4.74 (1H, s, H-29), ONaf [7.51 (1H, t, $J = 7.8$ Hz, H-3'), 7.54 (1H, t, $J = 7.6$ Hz, H-6'), 7.62 (1H, t, $J = 7.9$ Hz, H-7'), 7.89 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-5'), 8.03 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-4'), 8.19 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-2'), 8.95 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-8')].</p> <p>RMN-¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ: 14.8 (c, C-27), 15.4 (c, C-24), 16.1 (2 \times c, C-25, C-26), 18.3 (t, C-6), 19.2 (c, C-30), 20.8 (t, C-11), 25.3 (t, C-12), 27.2 (t, C-15), 27.4 (t, C-2), 28.0 (c, C-23), 29.7 (t, C-16), 30.1 (t, C-21), 34.2 (t, C-22), 34.8 (t, C-7), 37.2 (s, C-10), 37.7 (d, C-13), 38.7 (t, C-1), 38.9 (s, C-4), 40.9 (s, C-8), 42.8 (s, C-14), 46.7 (d, C-19), 47.8 (d, C-17), 49.0 (d, C-18), 50.4 (d, C-9), 55.3 (d, C-5), 63.3 (t, C-28), 79.0 (d, C-3), 109.9 (t, C-29), 150.2 (s, C-20), ONaf [124.5 (d, C-3'), 125.9 (d, C-8'), 126.2 (d, C-6'), 127.7 (d, C-7'), 128.1 (s, C-1'), 128.5 (d, C-5'), 130.1 (d, C-2'), 131.4 (s, C-8a'), 133.3 (d, C-4'), 133.9 (s, C-4a'), 168.0 (s, COO')].</p>	
Espectrometría de masas	<p>EM (IE) m/z (%): 596 [M⁺] (17), 578 (22), 535 (5), 424 (30), 409 (4), 393 (2), 270 (2), 216 (15), 203 (17), 189 (28), 172 (12), 155 (100), 127 (21), 95 (15), 81 (15).</p> <p>EMAR (EI) m/z: Calculado para C₄₁H₅₆O₃ [M⁺]: 596.4229. Observado 596.4251.</p>	

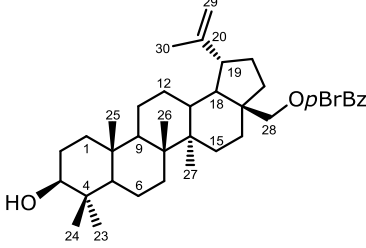
Derivado T36:

3 β ,28-Di-(1-naftoiloxi)-lup-20(29)-eno

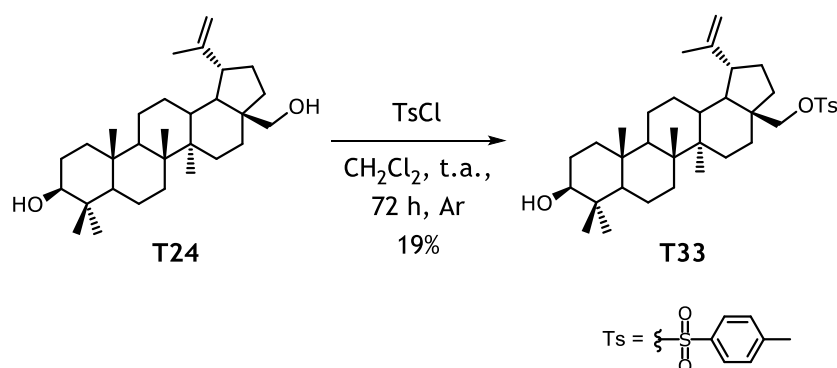
Datos físicos y espectroscópicos	<p>$[\alpha]_D^{20}$: -0.7° (c 0.70, CHCl₃).</p> <p>UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ): 203 (3.8), 219 (3.8), 233 (3.6), 294 (3.0) nm.</p> <p>IR ν_{\max} (película): 2927, 2868, 1711, 1241, 1134, 1011, 781 cm⁻¹.</p>	
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN-¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ:</p> <p>1.00 (3H, s, H-25), 0.94 (3H, s, H-24), 1.05 (3H, s, H-26), 1.01 (3H, s, H-23), 1.74 (3H, s, H-30), 1.13 (3H, s, H-27), 2.58 (1H, dt, J = 11.0, 5.8 Hz, H-19), 4.20 (1H, d, J = 11.0 Hz, H-28), 4.75 (1H, s, H-29), 4.65 (2H, m, H-29, H-28), 4.85 (1H, dd, J = 11.6 Hz, 4.9 Hz, H-3), 2 \times ONaf [7.52 (4H, m, H-3', H-3'', H-6', H-6''), 7.61 (2H, m, H-7', H-7''), 7.88 (1H, d, J = 7.6 Hz, H-5''), 7.89 (1H, d, J = 7.7 Hz, H-5'), 8.01 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-4''), 8.03 (1H, d, J = 8.1 Hz, H-4'), 8.17 (1H, dd, J = 7.2, 1.3 Hz, H-2''), 8.20 (1H, dd, J = 7.4, 1.3 Hz, H-2'), 8.95 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-8''), 8.96 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-8')].</p> <p>RMN-¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ:</p> <p>14.8 (c, C-27), 16.1 (c, C-26), 16.2 (c, C-25), 17.0 (c, C-24), 18.3 (t, C-6), 19.2 (c, C-30), 20.9 (t, C-11), 23.9 (t, C-2), 25.2 (t, C-12), 27.2 (t, C-15), 28.2 (c, C-23), 29.7 (t, C-16), 30.1 (t, C-21), 34.2 (t, C-22), 34.8 (t, C-7), 37.2 (s, C-10), 37.7 (d, C-13), 38.2 (s, C-4), 38.5 (t, C-1), 41.0 (s, C-8), 42.8 (s, C-14), 46.8 (d, C-19), 47.8 (d, C-17), 49.0 (d, C-18), 50.4 (d, C-9), 55.6 (d, C-5), 63.4 (t, C-28), 81.7 (d, C-3), 110.0 (t, C-29), 150.4 (s, C-20), 2 \times ONaf [167.3 (2 \times s, COO', COO''), 133.9 (2 \times s, C-4a', C-4a''), 133.3 (d, C-4'), 133.1 (d, C-4''), 131.4 (2 \times s, C-8a', C-8a''), 130.1 (d, C-2'), 129.8 (d, C-2''), 128.6 (d, C-5'), 128.5 (d, C-5''), 128.0 (s, C-1'), 127.7 (d, C-7'), 127.6 (d, C-7''), 127.4 (s, C-1''), 126.2 (d, C-6'), 126.1 (d, C-6''), 125.9 (d, C-8'), 125.8 (d, C-8''), 124.5 (2 \times d, C-3', C-3'')].</p>	
Espectrometría de masas	<p>EM (IE) m/z (%): 750 [M⁺] (2), 578 (18), 565 (2), 535 (4), 423 (2), 406 (3), 393 (2), 269 (1), 216 (4), 189 (16), 155 (100), 127 (17).</p> <p>EMAR (EI) m/z: Calculado para C₅₂H₆₂O₄ [M⁺]: 750.4648. Observado 750.4617.</p>	

Derivado T32:

28-(4-Bromobenzoiloxi)-3 β -hidroxi-lup-20(29)-eno

Datos físicos y espectroscópicos	<p>$[\alpha]_D^{20}$: +3.1° (c 0.34, CHCl₃).</p> <p>UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ): 202 (4.5), 244 (4.3) nm.</p> <p>IR ν_{\max} (película): 3432, 2927, 2868, 1721, 1591, 1459, 1270, 1104, 756 cm⁻¹.</p>	
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN-¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ: 0.78 (3H, s, H-24), 0.85 (3H, s, H-25), 0.99 (3H, s, H-23), 1.02 (3H, s, H-26), 1.08 (3H, s, H-27), 1.72 (3H, s, H-30), 2.53 (1H, dt, J = 11.0, 6.0 Hz, H-19), 3.21 (1H, dd, J = 11.0, 6.0 Hz, H-3), 4.10 (1H, d, J = 11.3 Hz, H-28), 4.51 (1H, d, J = 11.3 Hz, H-28), 4.63 (1H, s, H-29), 4.73 (1H, s, H-29), OpBrBz [7.61 (2H, d, J = 8.5 Hz, H-3', H-5'), 7.92 (2H, d, J = 8.5 Hz, H-2', H-6')].</p> <p>RMN-¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ: 14.8 (c, C-27), 15.3 (c, C-24), 16.0 (c, C-26), 16.1 (c, C-25), 18.3 (t, C-6), 19.2 (c, C-30), 20.8 (t, C-11), 25.2 (t, C-12), 27.1 (t, C-15), 27.4 (t, C-2), 28.0 (c, C-23), 29.7 (t, C-16), 30.0 (t, C-21), 34.2 (t, C-22), 34.7 (t, C-7), 37.7 (d, C-13, s, C-10), 38.7 (t, C-1), 38.9 (s, C-4), 40.9 (s, C-8), 42.8 (s, C-14), 46.7 (d, C-19), 47.8 (d, C-17), 48.9 (d, C-18), 50.4 (d, C-9), 55.3 (d, C-5), 63.6 (t, C-28), 79.0 (d, C-3), 110.0 (t, C-29), 150.0 (s, C-20), OpBrBz [128.0 (s, C-4'), 129.4 (s, C-1'), 131.1 (2 × d, C-2', C-6'), 131.8 (2 × d, C-3', C-5'), 165.6 (s, -COO-)].</p>	
Espectrometría de masas	<p>EM (IE) m/z (%): 627 [M^+] (4), 626 (12), 624 (12), 608 (24), 425 (9), 424 (26), 411 (32), 393 (7), 257 (8), 216 (26), 207 (62), 189 (100), 184 (54), 135 (64), 95 (54).</p> <p>EMAR (IE) m/z: Calculado para C₃₇H₅₄BrO₃ [M^+]: 627.3236. Observado 627.3190.</p>	

Preparación de T33:



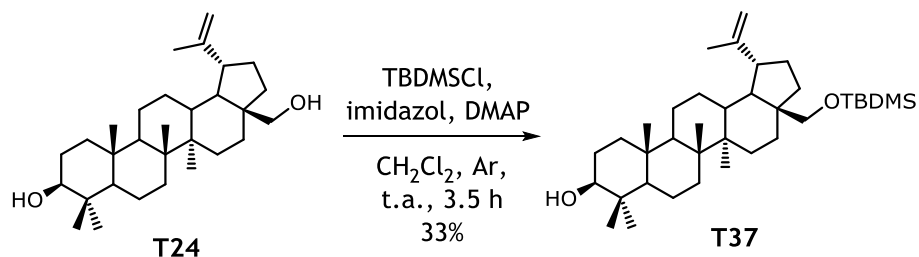
A una disolución de 54.9 mg de betulina (**T24**, 0.12 mmol) en 4 mL de CH_2Cl_2 seco, se le añadieron cloruro de *p*-toluensulfónico (70.0 mg, 0.37 mmol) y una cantidad catalítica de DMAP en atmósfera de argón. La mezcla de reacción se agitó durante 72 h a temperatura ambiente, se lavó con disolución saturada de NaHCO_3 y se extrajo repetidas veces con CH_2Cl_2 . La fase orgánica se secó sobre MgSO_4 anhidro, se llevó a sequedad a presión reducida y se purificó mediante cromatografía en gel de sílice y cromatografía en capa fina preparativa usando una mezcla de hexanos–AcOEt (7.5:2.5) como eluyente. Se obtuvieron 13.6 mg del derivado **T33** (19% de rendimiento), cuyos datos espectroscópicos y espectrométricos permitieron establecer su estructura como 28-*O*-tosilbetulina [3β -hidroxi-28-tosiloxi-lup-20(29)-eno], derivado descrito en la bibliografía, pero cuyos datos no se habían aportado con anterioridad.

Derivado T33:

3β-Hidroxi-28-tosiloxi-lup-20(29)-eno

Datos físicos y espectroscópicos	<p>$[\alpha]_D^{20}$: +8.7° (c 1.08, CHCl₃).</p> <p>UV: $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ (log ϵ): 261 (2.9), 224 (4.1) nm.</p> <p>IR ν_{\max} (película): 3559, 2944, 2871, 1458, 1362, 1177, 960, 757, 668, 555 cm⁻¹.</p>	
Resonancia magnética nuclear	<p>¹H NMR</p> <p>(CDCl₃, 400 MHz) δ: 0.76 (3H, s, H-24), 0.77 (3H, s, H-25), 0.79 (3H, s, H-23), 0.90 (3H, s, H-26), 0.96 (3H, s, H-27), 1.63 (3H, s, H-30), 2.28 (1H, dt, $J = 10.8, 5.6$ Hz, H19), 3.17 (1H, dd, $J = 11.0, 4.7$ Hz, H-3), 3.75 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-28), 4.06 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-28), 4.56 (1H, s, H-29), 4.64 (1H, s, H-29), OTs [2.46 (3H, s, Me), 7.36 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3', H-5'), 7.81 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2', H-6')].</p> <p>¹³C NMR</p> <p>(CDCl₃, 100 MHz) δ: 14.7 (c, C-27), 15.3 (c, C-24), 15.8 (c, C-26), 16.0 (c, C-25), 18.2 (t, C-6), 19.0 (c, C-30), 20.6 (t, C-11), 25.0 (t, C-12), 26.5 (t, C-15), 27.3 (t, C-2), 27.8 (c, C-23), 29.1 (t, C-16), 29.3 (t, C-21), 34.1 (2 × t, C-7, C-22), 37.1 (s, C-10), 37.8 (d, C-13), 38.7 (t, C-1), 38.8 (s, C-4), 40.8 (s, C-8), 42.6 (s, C-14), 46.9 (d, C-19), 47.6 (d, C-17), 48.9 (d, C-18), 50.2 (d, C-9), 55.2 (d, C-5), 69.3 (t, C-28), 78.9 (d, C-3), 110.1 (t, C-29), 149.7 (s, C-20), OTs [21.6 (c, Me), 128.1 (2 × d, C-2', C-6'), 129.9 (2 × d, C-3', C-5'), 132.9 (s, C-1'), 144.7 (s, C-4')].</p>	
Espectrometría de masas	<p>EM (IE) m/z (%): 596 [M⁺] (25), 578 (30), 535 (18), 424 (70), 406 (82), 391 (32), 363 (61), 271 (6), 216 (34), 207 (69), 203 (62), 189 (75), 172 (58), 135 (64), 107 (61), 91 (100), 81 (42).</p> <p>EMAR (IE) m/z: Calculado para C₃₇H₅₆O₄S [M⁺]: 596.3899, observado 596.3879</p>	

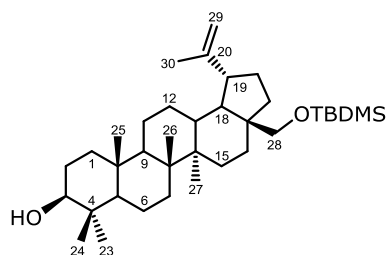
Preparación de T37:



A una disolución de betulina (**T24**, 39.2 mg, 0.09 mmol) en 2 mL de CH₂Cl₂ seco, se le añadió imidazol (6.7 mg, 0.10 mmol), DMAP (11.3 mg, 0.09 mmol) y cloruro de *tert*-butil-dimetilsililo (TBDMSCl, 28.7 mg, 0.19 mmol) a 0 ° bajo atmósfera de argón. Se agitó durante 3.5 h hasta que se observó por CCF la conversión completa del producto de partida. La reacción se diluyó con agua (10 mL) y se extrajo varias veces con CH₂Cl₂. La fase orgánica se secó sobre MgSO₄ anhidro, se filtró y se llevó a sequedad a vacío. El residuo se purificó mediante CCF en gel de sílice preparativa usando como fase móvil hexanos–AcOEt (3:2), rindiendo 25.8 mg del producto **T37** como un sólido amorfo (33% de rendimiento). Se aportan sus datos de RMN de ¹H y de ¹³C, ya que éstas no han sido reportadas anteriormente.

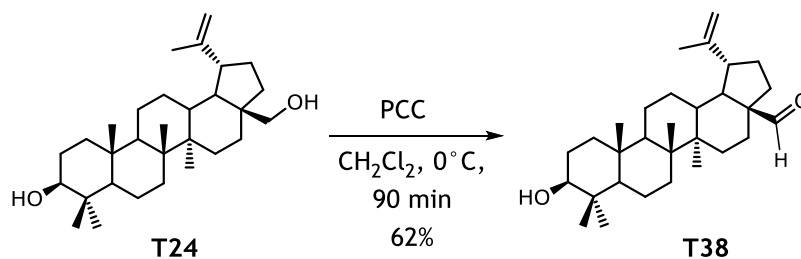
Derivado T37:

3 β -Hidroxi-28-terc-butildimetilsililoxi-lup-20(29)-eno



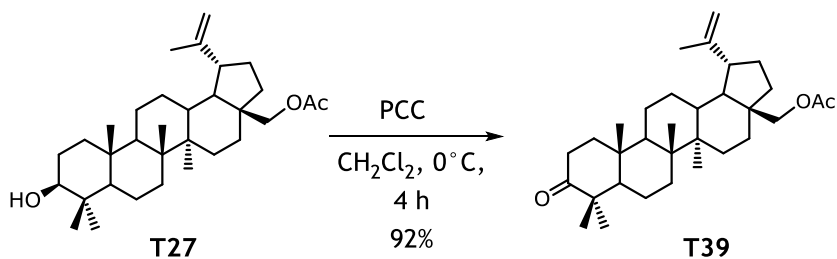
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ: 0.76 (3H, s, Me-24), 0.83 (3H, s, Me-25), 0.97 (6H, s, Me-23, Me-26), 1.02 (3H, s, Me-27), 1.68 (3H, s, Me-30), 2.39 (1H, dt, J = 6.0, 10.9 Hz, H-19), 3.19 (1H, dd, J = 5.0, 11.3 Hz, H-3), 3.26 (1H, d, J = 9.8 Hz, H-28), 3.67 (1H, d, J = 9.8 Hz, H-28), 4.56 (1H, tA, J = 1.6 Hz, H-29), 4.67 (1H, d, J = 2.2 Hz, H-29), TBDMS [-0.04 (6H, s), 0.90 (9H, s)].</p> <p>RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ: 14.8 (c, C-27), 15.4 (c, C-24), 15.9 (c, C-26), 16.1 (c, C-25), 18.3 (t, C-6), 19.1 (c, C-30), 20.9 (t, C-11), 25.3 (t, C-12), 27.0 (t, C-15), 27.4 (t, C-2), 28.0 (c, C-23), 29.5 (t, C-16), 30.0 (t, C-21), 34.2 (t, C-22), 34.3 (t, C-7), 37.2 (s, C-10), 37.4 (d, C-13), 38.7 (t, C-1), 38.9 (s, C-4), 40.9 (s, C-8), 42.7 (s, C-14), 48.1 (s, d, C-17, C-19), 48.4 (d, C-18), 50.4 (d, C-9), 55.3 (d, C-5), 60.5 (t, C-28), 79.0 (d, C-3), 109.3 (t, C-29), 150.9 (s, C-20), TBDMS [-5.5 (2 \times c), 18.3 (s), 26.0 (3 \times c)].</p>
Espectrometría de masas	<p>EM (IE) m/z (%): 556 (6), 538 (5), 499 (100), 481 (12), 424 (80), 411 (37), 363 (4), 299 (9), 244 (10), 189 (33), 135 (29), 75 (58).</p> <p>EMAR (IE) m/z: Calculado para C₃₆H₆₄O₂Si [M⁺]: 556.4676, observado 556.4689.</p>

Preparación de T38:



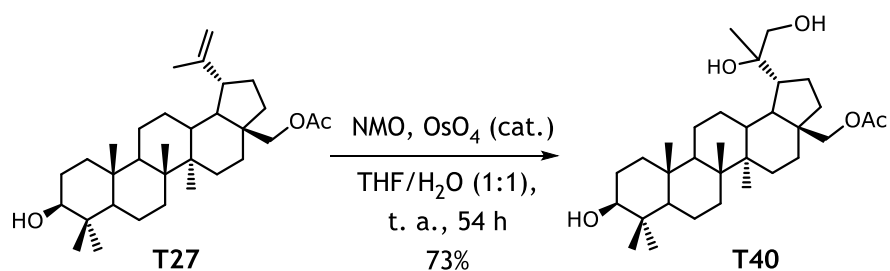
A una disolución de betulina (**T24**, 11 mg, 0.02 mmol) en 2 mL de CH_2Cl_2 seco, se le añadió clorocromato de piridinio (PCC, 17.3 mg, 0.08 mmol) a 0°C . La mezcla se agitó durante 90 min, hasta que se observó por cromatografía de capa fina la completa conversión del producto de partida. La mezcla se filtró mediante Florisil y se concentró en el rotavapor. El crudo se fraccionó en una columna cromatográfica *flash*, usando como eluyente CH_2Cl_2 y AcOEt en un gradiente de polaridad creciente (10–50%), eliminando posteriormente el disolvente en el rotavapor. El residuo fue purificado por CCF de gel de sílice preparativa, usando como eluyente hexanos–acetato de etilo (15:3). Así, se obtuvieron 6.7 mg de derivado **T38** como un sólido amorfo (62% de rendimiento). Sus datos espectroscópicos y espectrométricos fueron idénticos con los reportados anteriormente para 3-oxo-lup-20(29)-en-28-al (betulonal).

Preparación de T39:



A una disolución del monoacetato de betulina (**T27**, 17.7 mg, 0.04 mmol) en CH₂Cl₂ (5 mL), se le añadió clorocromato de piridínio (PCC, 25.4 mg, 0.11 mmol) a 0 °C. La mezcla se agitó durante 4 h hasta observar por CCF la conversión completa del producto de partida. La mezcla se filtró por Florisil y se concentró a vacío. El crudo se fraccionó por cromatografía en columna *flash*, usando como eluyente una mezcla de hexanos y acetato de etilo en un gradiente de polaridad de 10–50%, eliminando, posteriormente, el disolvente a vacío. Se obtuvieron 17.7 mg de derivado **T39** como un sólido amorfo (92% de rendimiento). El análisis de sus datos espectroscópicos y espectrométricos permitieron determinar el compuesto como 28-*O*-acetil-3-oxobetulina reportado anteriormente.

Preparación de T40:



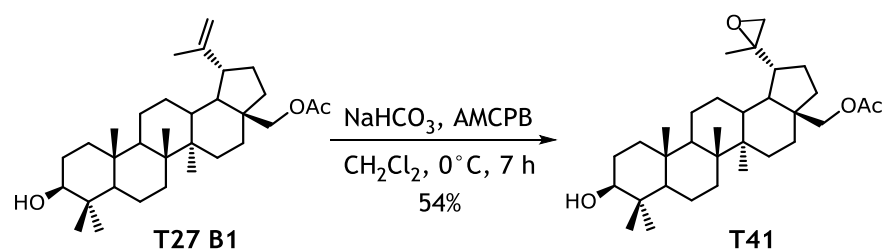
A una disolución del monoacetato de betulina (**T27**, 16 mg, 0.03 mmol) en una mezcla de tetrahidrofurano (THF) y agua (1:1, 2 mL), se le añadió *N*-óxido de *N*-metilmorfolina (NMO, 11.6 mg, 0.1 mmol) y una cantidad catalítica de Os₄O. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 54 h hasta observar por cromatografía en capa fina la completa conversión del producto de partida. Se le añadió NaHSO₃ y se extrajo con AcOEt repetidas veces. A continuación, la mezcla de reacción se lavó con disolución saturada de NaCl, la fase orgánica se secó sobre MgSO₄ anhidro, se filtró y se llevó a sequedad en el rotavapor. El crudo de reacción se purificó mediante cromatografía *flash*, usando como eluyente una mezcla de hexanos–AcOEt (6:4), rindiendo 12.5 mg de derivado **T40** como un sólido amorfo (73% de rendimiento).

Derivado T40:

28-Acetiloxi-lupan-3 β ,20,29-triol

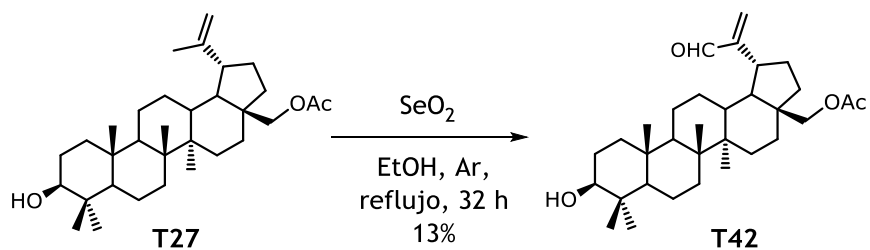
Datos físicos y espectroscópicos	<p>$[\alpha]_D^{20}$: -6.8° (<i>c</i> 1.24, CHCl₃).</p> <p>IR ν_{\max} (película): 3416, 2940, 2873, 1730, 1459, 1387, 1245, 1032, 756 cm⁻¹.</p>	
Resonancia magnética nuclear	<p>RMN-¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ: 0.78 (3H, s, H-24), 0.85 (3H, s, H-25), 0.99 (6H, s, H-23, H-26), 1.08 (3H, s, H-27), 1.21 (3H, s, H-30), 3.21 (1H, dd, <i>J</i> = 11.1 Hz, 4.5 Hz, H-3), 3.44 (1H, d, <i>J</i> = 10.7, H-29), 3.66 (1H, d, <i>J</i> = 10.7, H-29), 3.85 (1H, d, <i>J</i> = 11.1 Hz, H-28), 4.34 (1H, d, <i>J</i> = 11.1 Hz, H-28), OAc [2.08 (3H, s, H-2')].</p> <p>RMN-¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ: 14.8 (c, C-27), 15.1 (c, C-26), 15.9 (2 × c, C-24, C-25), 18.0 (t, C-6), 21.1 (t, C-11), 24.9 (c, C-30), 26.8 (t, C-12), 26.9 (t, C-2), 27.1 (t, C-15), 27.7 (c, C-23), 28.8 (t, C-16), 30.1 (t, C-21), 34.2 (t, C-22), 34.6 (t, C-7), 36.5 (d, C-13), 36.8 (s, C-10), 38.5 (s, C-4), 38.6 (t, C-1), 41.2 (s, C-8), 43.2 (s, C-14), 46.9 (d, C-19), 47.6 (s, C-17), 48.2 (d, C-18), 50.1 (d, C-9), 55.0 (d, C-5), 62.3 (t, C-28), 66.9 (t, C-29), 74.8 (s, C-20), 78.8 (d, C-3), OAc [20.8 (c, C-2'), 171.3 (s, C-1')].</p>	
Espectrometría de masas	<p>EM (IE) <i>m/z</i> (%): 500 [M-H₂O]⁺ (12), 482 (21), 469 (14), 427 (31), 409 (26), 371 (14), 353 (7), 273 (5), 245 (8), 219 (15), 207 (90), 189 (100), 135 (80), 95 (65), 81 (61).</p> <p>EMAR (IE) <i>m/z</i>: Calculado para C₃₂H₅₂O₄ [M⁺ - H₂O]: 500.3866. Observado 500.3848.</p>	

Preparación de T41:



A una disolución del monoacetato de betulina (**T27**, 15.5 mg, 0.04 mmol) en de CH₂Cl₂ seco (2 mL), se le añadió una suspensión, previamente preparada de NaHCO₃ (130 mg, 1.55 mmol) y 10 mg de ácido *m*-cloroperoxibenzoico (AMCPB, 10.0 mg, 0.06 mmol) en CH₂Cl₂ (2 mL). La mezcla de reacción se agitó durante 7 h a 0 °C bajo atmósfera de argón hasta observar por CCF la completa conversión del producto de partida, visualizado por cromatografía de capa fina. A continuación, se diluyó con éter etílico (10 mL), se añadió KF (30 mg, 0.52 mmol) y se agitó durante 60 h a temperatura ambiente. Se filtró sobre celita y se extrajo varias veces con CH₂Cl₂. Se secó sobre MgSO₄ anhidro y se llevó a sequedad en el rotavapor, obteniéndose el derivado **T41** (9.5 mg, 54% de rendimiento) como un sólido amorfo. Sus datos espectroscópicos y espectrométricos fueron coincidentes con los dados para 28-acetoxi-20*R*,29-epoxi-3β-hidroxi-lupano.

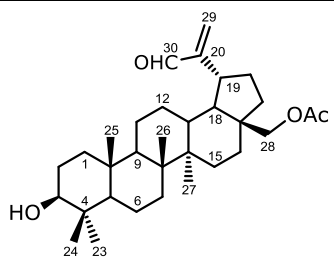
Preparación de T42:



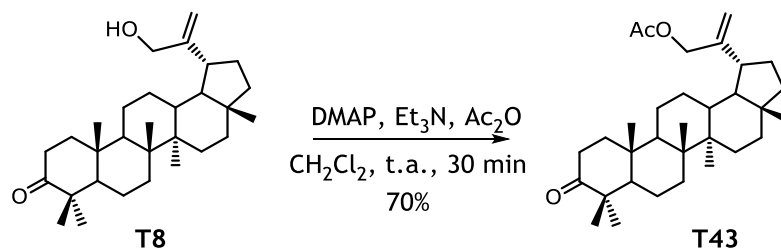
A una disolución del monoacetato de betulina (**T27**, 70 mg, 16 mmol) en etanol (6 mL), se le añadió dióxido de selenio (18 mg, 16 mmol) bajo atmósfera de argón. La mezcla de reacción se agitó durante 32 h calentando a reflujo. A continuación, se diluyó con agua y se extrajo con acetato de etilo (3 x 20 mL). El disolvente se eliminó a vacío y el residuo se purificó mediante cromatografía de columna *flash*, usando como eluyente hexanos y acetato de etilo en un gradiente de polaridad (0–50%). Así, se obtuvieron 9.3 mg de producto **T42** como un sólido amorfo (13% de rendimiento).

Derivado T42:

28-Acetiloxi-3 β -hidroxi-lup-20(29)-en-30-al

Datos físicos y espectroscópicos	$[\alpha]_D^{20}$: -1.9° (<i>c</i> 0.93, CHCl ₃). UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ): 226 (3.4), 307 (2.4) nm. IR ν_{\max} (película): 3441, 2943, 2871, 1733, 1691, 1459, 1388, 1367, 1240, 1034, 756 cm ⁻¹ .	
Resonancia magnética nuclear	RMN-¹H (CDCl ₃ , 400 MHz) δ : 0.78 (3H, s, H-24), 0.92 (3H, s, H-25), 0.93 (3H, s, H-23), 0.99 (3H, s, H-26), 1.36 (3H, s, H-27), 2.77 (1H, dt, <i>J</i> = 11.6, 5.4, H-19), 3.16 (1H, dd, <i>J</i> = 11.0, 5.2 Hz, H-3), 3.86 (1H, d, <i>J</i> = 10.9 Hz, H-28), 4.24 (1H, d, <i>J</i> = 10.9 Hz, H-28), 5.91 (1H, s, H-29), 6.24 (1H, s, H-29), 9.47 (1H, s, H-30), OAc [2.04 (3H, s, H-2')]. RMN-¹³C (CDCl ₃ , 100 MHz) δ : 14.6 (c, C-27), 15.4 (c, C-26), 15.9 (c, C-25), 16.0 (c, C-24), 18.2 (t, C-6), 27.0 (t, C-12), 27.3 (2 \times t, C-2, C-15), 27.9 (c, C-23), 28.7 (t, C-11), 29.7 (t, C-16), 31.9 (t, C-21), 34.2 (t, C-22), 34.4 (t, C-7), 37.2 (s, C-10, d, C-13), 38.7 (s, C-4, t, C-1), 40.7 (s, C-8), 42.7 (s, C-14), 46.6 (s, C-17), 50.1 (d, C-9), 50.9 (d, C-18), 52.7 (d, C-19), 55.2 (d, C-5), 62.4 (t, C-28), 78.8 (d, C-3), 133.2 (t, C-29), 156.3 (s, C-20), 194.7 (d, C-30), OAc [20.7 (c, C-2'), 171.5 (s, C-1')].	
Espectrometría de masas	EM (IE) <i>m/z</i> (%) : 498 [M ⁺] (35), 480 (51), 465 (16), 438 (29), 425 (25), 407 (19), 285 (3), 281 (5), 271 (6), 261 (11), 215 (21), 207 (64), 190 (83), 189 (100), 135 (52), 95 (52), 81 (53). EMAR (IE) <i>m/z</i> : Calculado para C ₃₂ H ₅₀ O ₄ [M ⁺]: 498.3709. Observado 498.3713.	

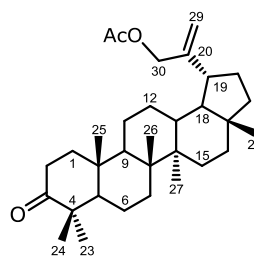
Preparación de T43:



A una disolución de **T8** (7.4 mg, 0.02 mmol) en CH₂Cl₂ (2 mL), se le añadió Et₃N (0.1 mL, 0.7 mmol) y anhídrido acético (0.1 mL, 1.0 mmol). Se agitó durante 30 min a temperatura ambiente, tras lo cual se le añadió etanol (1 mL) con agitación durante 30 min. La mezcla se llevó a sequedad y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna *flash* usando como eluyente un sistema de hexanos y AcOEt en un gradiente de polaridad de 20–40%, eliminando, posteriormente, el disolvente, rindió 6.7 mg del derivado **T43** como un sólido amorfo (70% de rendimiento). Se aportan los datos de RMN de ¹H y ¹³C del compuesto anteriormente descrito, ya que éstos no han sido reportados anteriormente.

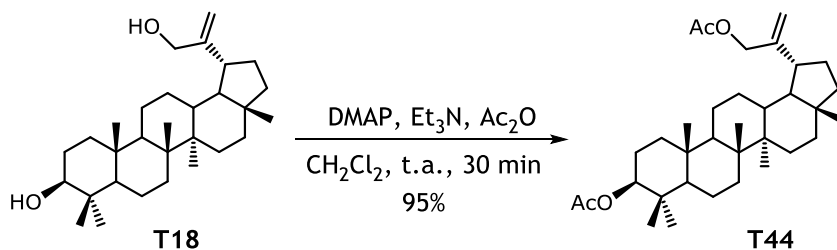
Derivado T43:

30-Acetiloxi-3-oxo-lup-20(29)-eno



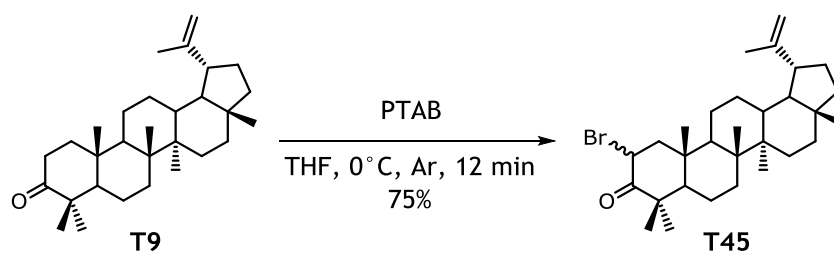
Resonancia magnética nuclear	<p>¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ:</p> <p>0.82 (3H, s, Me-28), 0.96 (3H, s, Me-25), 0.98 (3H, s, Me-27), 1.05 (3H, s, Me-24), 1.09 (3H, s, Me-26), 1.10 (3H, s, Me-23), 1.92 (1H, ddd, <i>J</i> = 4.5, 7.6, 13.3 Hz, H-1), 2.08 (1H, m, H-21), 2.13 (3H, s, OAc), 2.35 (1H, dt, <i>J</i> = 5.4, 11.4 Hz, H-19), 2.43 (1H, ddd, <i>J</i> = 4.4, 12.2, 15.7 Hz, H-2), 2.51 (1H, ddd, <i>J</i> = 7.5, 9.8, 15.7 Hz, H-2), 4.57 (1H, d, <i>J</i> = 14.2 Hz, H-30), 4.60 (1H, d, <i>J</i> = 14.2 Hz, H-30), 4.95 (1H, dd, <i>J</i> = 1.3, 2.7 Hz, H-29), 4.98 (1H, s_A, H-29).</p> <p>¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ:</p> <p>14.5 (c, C-27), 15.8 (c, C-26), 16.0 (c, C-25), 17.7 (c, C-28), 19.6 (t, C-6), 21.0 (c, C-24), 21.1 (c, OAc), 21.5 (t, C-11), 26.4 (t, C-12), 26.6 (c, C-23), 27.3 (t, C-15), 31.2 (t, C-21), 33.5 (t, C-7), 34.1 (t, C-2), 35.3 (t, C-16), 36.8 (s, C-10), 38.1 (d, C-13), 39.6 (t, C-1), 39.8 (t, C-22), 40.8 (s, C-8), 42.8 (s, C-14), 43.0 (s, C-17), 44.3 (d, C-19), 47.3 (s, C-4), 48.8 (d, C-18), 49.7 (d, C-9), 54.8 (d, C-5), 65.9 (t, C-30), 110.0 (t, C-29), 149.1 (s, C-20), 170.8 (s, OAc), 218.3 (s, C-3).</p>
------------------------------	---

Preparación de T44:



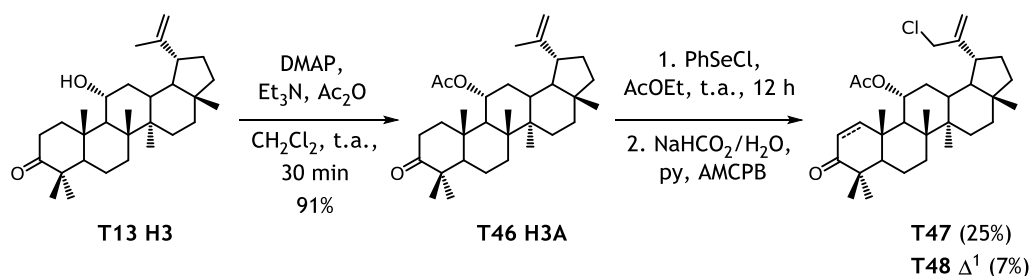
Siguiendo el mismo procedimiento descrito para la preparación del derivado **T43**, se trató **T18** (7.4 mg, 0.02 mmol) en CH₂Cl₂ (2 mL) con Et₃N (0.1 mL, 0.7 mmol) y anhídrido acético (0.1 mL, 1.0 mmol). Así, se obtuvieron 5.0 mg del derivado **T44** como un sólido amorfo (95% de rendimiento). Comparación de sus datos espectroscópicos y espectrométricos indicó que los datos de **T44** son idénticos con los descritos para 3β,30-diacetoxi-lup-20(29)-eno.

Preparación de T45:



A una disolución de **T9** (22.0 mg, 0.05 mmol) en THF seco (2 mL), se le añadió perbromuro de feniltrimetilamonio (PTAB, 21.0 mg, 0.06 mmol) a 0 °C y bajo atmósfera de argón. La mezcla de reacción se agitó durante 12 min, tras lo cual se diluyó con agua (10 mL). La fase acuosa se extrajo varias veces con AcOEt. La fase orgánica se secó sobre MgSO₄ anhidro, se filtró y se concentró a vacío. El crudo se purificó mediante cromatografía en columna *flash* usando como eluyente una fase móvil de hexanos–AcOEt (9:1). Así, se obtuvieron 19.0 mg del derivado **T45** (75% de rendimiento) como un sólido amorfo, cuyos datos de EM y RMN fueron idénticos con los descritos para 2-bromo-3-oxo-lup-20(29)-eno.

Preparación de T46–T48:

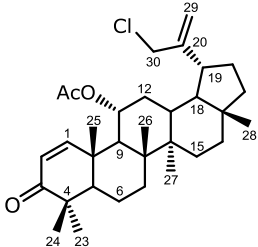


A una disolución de **T13** (81.1 mg, 0.18 mmol) en CH₂Cl₂ (3 mL), se le añadió DMAP, Et₃N (0.1 mL, 0.7 mmol) y anhídrido acético (0.1 mL, 1.0 mmol). Se agitó durante 30 min a temperatura ambiente, tras lo cual se añadió EtOH (1 mL) con agitación durante 30 min. La mezcla se concentró y se purificó mediante cromatografía en columna *flash* (hexanos–AcOEt en polaridad creciente de 20–40%), rindiendo el derivado **T46** como un sólido amorfo (80.7 mg, 91% de rendimiento). Sus datos espectroscópicos y espectrométricos fueron coincidentes con los reportados para el acetoxi-rigidenol⁴⁷.

A una disolución de **T46** (76.0 mg, 0.16 mmol) en AcOEt (30 mL), se le añadió cloruro de fenilselenio (PhSeCl, 76.0 mg, 0.4 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 12 h. Posteriormente, se le añadió disolución saturada de NaHCO₃. A la fase orgánica, se le añadió piridina (0.15 mL, 0.4 mmol) y AMCPB (284.0 mg, 0.4 mmol). La mezcla se lavó con disolución saturada de NaOH al 5% (3 × 10 mL), disolución saturada de NH₄Cl y disolución saturada de NaCl. La fase orgánica se secó sobre MgSO₄ anhidro, se filtró y se llevó a sequedad a presión reducida. El residuo fue purificado mediante cromatografía en columna *flash* usando una mezcla de hexanos y AcOEt a polaridad creciente (40–70%), rindiendo 21.8 mg de **T47** (25% de rendimiento) y 8.2 mg de **T48** (7% de rendimiento) como sólidos amorfos. Comparación de los datos de EM y RMN del derivado **T47** indicó que éstos fueron coincidentes con los descritos para el 11 α -acetilox-30-cloro-3-oxo-lup-20(29)-eno mientras que el derivado **T48** resultó nuevo en la bibliografía química.

Derivado T48:

11 α -Acetiloxi-30-cloro-3-oxo-lup-2,20(29)-dieno

Datos físicos y espectroscópicos	$[\alpha]_D^{20}$: +44.7° (<i>c</i> 0.41, CHCl ₃). IR ν_{\max} (película): 2927, 2856, 1735, 1673, 1459, 1380, 1242, 1021, 903, 751 cm ⁻¹ .	
Resonancia magnética nuclear	¹H NMR (CDCl ₃ , 400 MHz) δ : 0.81 (3H, s, H-28), 1.02 (3H, s, H-27), 1.09 (3H, s, H-26), 1.11 (3H, s, H-24), 1.13 (3H, s, H-23), 1.18 (3H, s, H-25), 4.03 (2H, s, H-30), 5.04 (1H, s _A , H-29), 5.10 (1H, s _A , H-29), 5.18 (1H, dt, <i>J</i> = 11.2, 4.8, H-11), 5.75 (1H, d, <i>J</i> = 10.4 Hz, H-2), 7.80 (1H, d, <i>J</i> = 10.4 Hz, H-1), OAc [2.02 (3H, s)]. ¹³C NMR (CDCl ₃ , 100 MHz) δ : 14.3 (c, C-27), 17.4 (c, C-26), 17.9 (c, C-28), 18.9 (t, C-6), 20.2 (c, C-25), 21.4 (c, C-24), 22.7 (t, C-12), 27.1 (t, C-15), 28.8 (c, C-23), 29.4 (t, C-21), 34.4 (t, C-7), 35.2 (t, C-16), 36.9 (d, C-13), 39.6 (t, C-22), 39.8 (s, C-10), 42.7 (s, C-8), 43.1 (d, C-9, s, C-17), 43.3 (s, C-14), 45.2 (s, C-4), 46.6 (d, C-19), 48.2 (t, C-30), 49.1 (d, C-18), 52.7 (d, C-5), 73.4 (d, C-11), 112.9 (t, C-29), 124.5 (d, C-2), 150.4 (s, C-20), 163.2 (d, C-1), 205.2 (s, C-3), OAc [21.7 (c), 169.8 (s)].	
Espectrometría de masas	EM (IE) <i>m/z</i> (%): 514 [M ⁺] (1), 472 (3), 454 (48), 420 (16), 318 (14), 218 (19), 203 (28), 137 (100), 95 (64). EMAR (FAB) <i>m/z</i> : Calculado para C ₃₂ H ₄₇ ClO ₃ [M ⁺]: 514.3214. Observado 514.3206.	

4.4 | ACTIVIDAD ANTI-VIH DE LOS TPLS

4.4.1 | Introducción

El **SIDA (Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida)** es una enfermedad viral causada por el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) que afecta al sistema inmunitario resultando en una grave inmunodepresión. La consecuencia son infecciones por patógenos oportunistas que conllevan una mortalidad elevada debido a la imposibilidad de defensa del propio organismo.

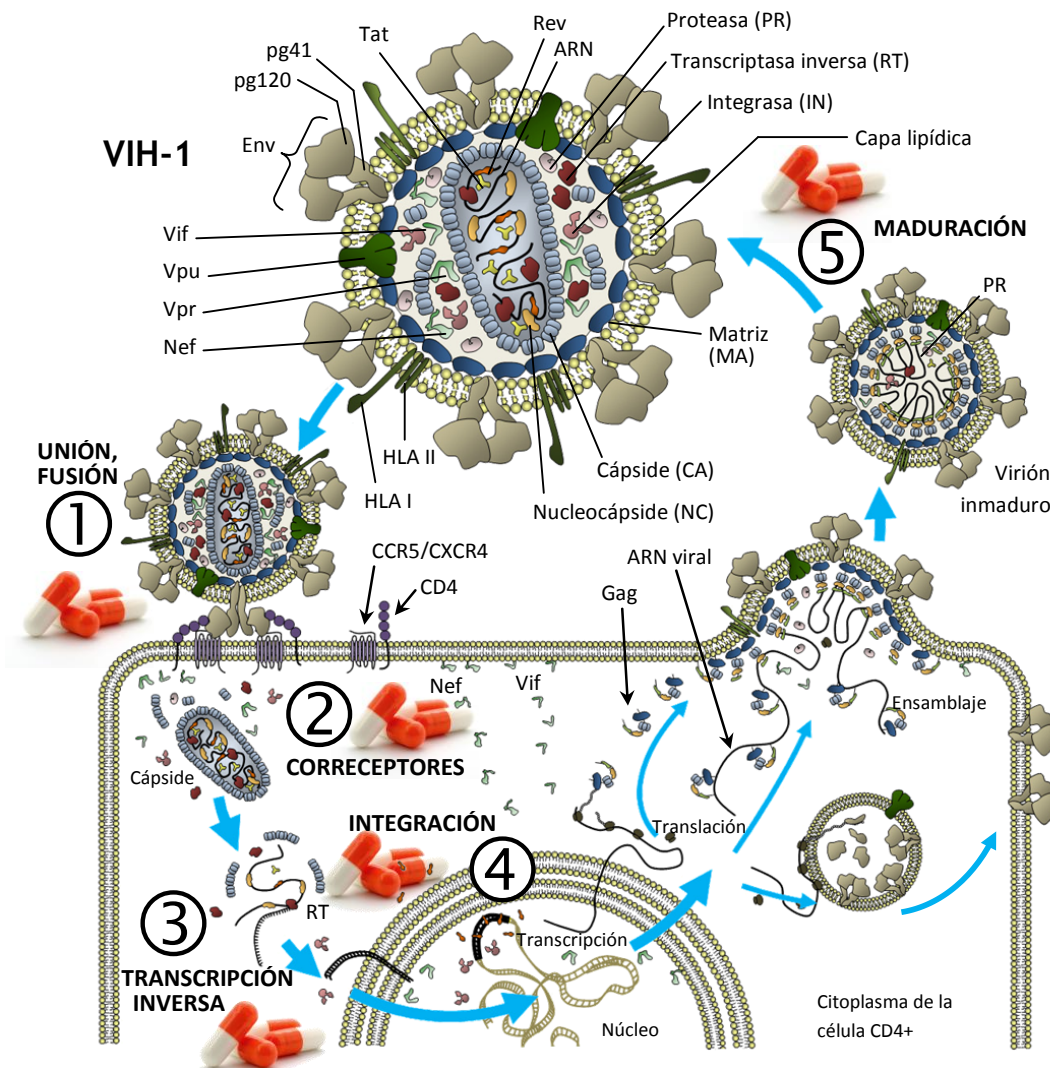


Fig. 4.32 | Estructura, ciclo replicativo y dianas terapéuticas del VIH-1. Env: envoltura con subdominios gp120 y gp41; proteínas accesorias: Vif, Vpr, Nef, Tat, Rev, Vpu. HLA: antígeno leucocitario humano.

El **VIH** (virus de la inmunodeficiencia humana) es una partícula esférica de un diámetro de 120 nm perteneciente al género *Lentivirus* (familia retrovirus). Su genoma está constituido por dos copias de ARN de carga positiva con nueve marcos de lectura, tres de los cuales (*gag*, *pol* y *env*) codifican poliproteínas para dar lugar a un total de 15 proteínas virales necesarias en el ciclo de vida del virus (Fig. 4.32)^{69,70,71}. Sin embargo, para una infección y reproducción exitosa, el virus, además, depende de más de 250 factores del huésped requeridos por el virus para la infección (*HIV-dependency factors*)⁷².

En el ciclo reproductivo del virus, se pueden destacar las siguientes etapas (Fig. 4.32):

- entrada viral (anclaje al receptor CD4 y a los co-receptores CXCR4 y/o CCR5) y fusión con la membrana celular,
- inhibición de la defensa antiviral del huésped,
- transcripción inversa,
- integración del ADN proviral al genoma de la célula,
- transcripción, translación, transporte y ensamblaje de las proteínas
- formación, liberación y maduración del virus⁶⁹.

Fármacos anti-VIH y dianas terapéuticas

Desde la primera aparición del VIH en el mundo occidental han pasado más de 30 años y aún sigue siendo uno de los retos más importantes en Salud Pública a nivel mundial. De hecho, actualmente, hay unos 35 millones de infectados en todo el mundo, pero sólo 10 millones de ellos reciben tratamiento⁷³.

⁶⁹ a) NANDA, H.; DATTA, S. A. K.; HEINRICH, F.; LÖSCHE, M.; REIN, A.; KRUEGER, S.; CURTIS, J. E. (2010). Electrostatic interactions and binding orientation of HIV-1 matrix, studied by neutron reflectivity. *Biophys. J.*, 99 (8), 2516–2524. b) GODSELL, D. S. *An illustration of the structure of HIV, with identified proteins labeled*. [en línea]. RCSB Protein Data Bank. [Fecha de consulta: 22 de marzo de 2014]. Disponible en internet: <http://www.pdb.org> c) MAO, Y.; WANG, L.; GU, C.; HERSCHHORN, A.; XIANG, S.-H.; HAIM, H.; YANG, X.; SODROSKI, J. (2012). Subunit organization of the membrane-bound HIV-1 envelope glycoprotein trimer. *Nature Struct. Mol. Biol.* 19, 893–899.

⁷⁰ GHANAM, R. H.; SAMAL, A. B.; FERNANDEZ, T. F.; SAAD, J. S. (2012). Role of the HIV-1 matrix protein in Gag intracellular trafficking and targeting to the plasma membrane for virus assembly. *Front. Microbiol.* doi: 10.3389/fmicb.2012.00055, 3 (55), 1–14.

⁷¹ TAVASSOLI, A. (2008). Targeting the protein-protein interactions of the HIV lifecycle. *Chem. Soc. Rev.*, 40, 1337–1346.

⁷² BRASS, A. L.; DYKXHOORN, D. M.; BENITA, Y.; YAN, N.; ENGELMAN, A.; XAVIER, R. J.; LIEBERMAN, J.; ELLEDGE, S. J. (2008). Identification of host proteins required for HIV infection through a functional genomic screen. *Science*, 319, 921–926

⁷³ *AIDS by the numbers*. UNAIDS. [en línea]. WHO 2013. [Fecha de consulta: 25 de noviembre de 2013]. Disponible en internet: <http://www.unaids.org>

Hoy en día, se encuentran en uso clínico más de 20 fármacos, que inhiben la replicación de VIH y, de esta manera, evitan el desarrollo de SIDA. Estos fármacos se pueden clasificar en

- inhibidores de fusión (FIs),
- inhibidores de co-receptores (CRIs),
- inhibidores de transcriptasa inversa [nucleosídicos (NRTIs), nucleotídicos (NtRTIs) y no análogos de nucleósidos (NNRTIs)],
- inhibidores de integrasa (INIs),
- inhibidores de proteasa (PIs),
- inhibidores de la maduración (MIs).

Estos fármacos se administran en tratamientos que combinan hasta tres o más principios activos, terapia que se conoce como terapia antirretroviral altamente activa (TARAA)⁷⁴. Esta terapia moderna suprime el virus a niveles indetectables, bajando de esta manera la infectividad en los pacientes a casi cero, lo que se traduce en una buena calidad de vida y un índice de mortalidad muy bajo.

Sin embargo, los aspectos negativos del tratamiento son aparentes: numerosos efectos secundarios, tales como somnolencia, mareo, pesadillas, daño hepático, enfermedades cardiovasculares, o un elevado riesgo de cáncer, por nombrar sólo algunos. Por otra parte, la terapia antirretroviral no es capaz de erradicar el virus del organismo y, una vez que se deja el tratamiento, éste se vuelve a replicar, por lo que hay que continuar el tratamiento de por vida. Otros aspectos a considerar son los elevados costes, así como los posibles efectos acumulativos en estos tratamientos a largo plazo⁷⁵. Por otra parte, la aparición y transmisión de resistencia a los fármacos actualmente en uso es desarrollada por el 7–15% de los pacientes que empiezan con la terapia antirretroviral, lo que representa uno de los problemas más acuciantes en la terapia actual⁷⁶.

En el futuro, el desarrollo de una vacuna eficaz sería una de las soluciones más prometedoras en la lucha contra el virus⁷⁷. Sin embargo, aunque se han reportado resultados prometedores en la obtención de una vacuna profiláctica, aún estamos lejos

⁷⁴ MEHELLOU, Y.; DE CLERCQ, E. (2010). Twenty-six years of anti-HIV drug discovery: Where do we stand and where do we go? *J. Med. Chem.*, 53, 521–538

⁷⁵ RICHMAN, D. D.; MARGOLIS, D. M., DELANEY, M.; GREENE, W. C.; HAZUDA, D.; POMERANTZ, R. J. (2009). The challenge of finding a cure for HIV infection. *Science*, 323, 1304–1307.

⁷⁶ CORTEZ, K. J.; MALDARELLI, F. (2011). Clinical management of HIV drug resistance. *Viruses*, 3 (4), 347–378.

⁷⁷ HOXIE, J. A. (2010). Toward an Antibody-Based HIV-1 Vaccine. *Annu. Rev. Med.* 61, 135–152

de disponer de la misma en clínica. Por ello, el tratamiento hoy día y de las próximas décadas se basará en la quimioterapia⁷⁸. Estos argumentos ponen de manifiesto la necesidad de fármacos con menos efectos secundarios, que sean menos tóxicos y que actúen sobre nuevas dianas terapéuticas para asegurar un tratamiento antirretroviral eficaz en el futuro.

Para minimizar los efectos secundarios, en el diseño y desarrollo de fármacos, la industria farmacéutica ha estado dirigida al descubrimiento a fármacos altamente selectivos frente a una única diana. Sin embargo, cada vez son más fármacos los que no superan las últimas fases de los ensayos clínicos, por lo que resulta imperativo el desarrollo de nuevas estrategias en la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos⁷⁹. En los últimos años, el paradigma de *una patología - una diana* se está sustituyendo por el desarrollo de compuestos promiscuos, fenómeno que está relacionado con el comportamiento polifarmacológico de un fármaco⁸⁰. Se han desarrollado estrategias, incluyendo métodos computacionales (*network modeling*)⁸¹ o la Resonancia Magnética Nuclear⁸², para entender las bases moleculares de la promiscuidad de un fármaco. Por otra parte, los fármacos con múltiples dianas (*multitarget drugs*) han demostrado ser efectivos para reducir la probabilidad de la aparición de resistencia. De esta manera, son capaces de reducir problemas de dosificaciones complejas, interacciones fármaco-fármaco y toxicidad, así como facilitar al paciente el tratamiento⁸³. No cabe duda que estos *fármacos promiscuos* presentan ventajas especialmente en el tratamiento de enfermedades complejas, ya que son capaces de modular más de una única diana⁸⁴. Por lo tanto, la búsqueda de agentes que actúen sobre diversas dianas del VIH, resulta extremadamente alentador en el desarrollo de la próxima generación de agentes antirretrovirales⁸⁵.

⁷⁸ GAMBLE, L. J.; MATTHEWS, Q. L. (2011). Current progress in the development of a prophylactic vaccine for HIV-1. *Drug Des. Devel. Ther.*, 5, 9-26.

⁷⁹ HOPKINS, A. L. (2008). Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery. *Nat. Chem. Biol.*, 4, 682-690.

⁸⁰ MORPHY, R.; RANKOVIC, Z. (2005). Designed multiple ligands. An emerging drug discovery paradigm. *J. Med. Chem.*, 48, 6523-6543.

⁸¹ STURM, N.; DESAPHY, J.; QUINN, R. J.; ROGNAN, D.; KELLENBERGER, E. (2012). Structural insights into the molecular basis of the ligand promiscuity. *J. Chem. Inf. Model.*, 52, 2410-2421.

⁸² LAPLANTE, S. R.; AUBRY, N.; BOLGER, G.; BONNEAU, P.; CARSON, R.; COULOMBE, R.; STURINO, C.; BEAULIEU, P. L. (2013). Monitoring drug self-aggregation and potential for promiscuity in off-target in vitro pharmacology screens by a practical NMR strategy. *J. Med. Chem.*, 56, 7073-7083.

⁸³ BOLOGNESI, M. L. (2013). Polypharmacology in a single drug: multitarget drugs. *Curr. Med. Chem.*, 20, 1639-1645.

⁸⁴ BORAN, A. D. W.; IYENGAR, R. (2010). Systems approaches to polypharmacology and drug discovery. *Curr Opin Drug Discov Devel.*, 13 (3), 297-309.

⁸⁵ ZHAN, P.; LIU, X. (2009). Designed multiple ligands: an emerging anti-HIV drug discovery paradigm. *Curr. Pharm. Des.*, 15, 1893-1917.

Un punto de partida prometedor en la búsqueda de nuevos agentes antirretrovirales son los productos naturales, ya que representan unidades químicas únicas que han sido perfeccionadas por la evolución por la efectividad en las actividades biológicas que desarrollan⁸⁶. En este contexto, cabe destacar que muchos compuestos naturales son candidatos a fármacos para la inhibición del VIH⁸⁷. Ejemplos recientes son alcaloides de origen vegetal como el (+)-tembamide, aislado de *Zanthoxylum ailantoides* (EC₅₀ de 0.1 μM), flavonoides, como la quercetina, con un EC₅₀ de 60 μM, el calanolide A, cumarina aislada de *Calophyllum lanigerum* (EC₅₀ de 0.10–0.17 μM) o la curcumina (EC₅₀ de 40 μM), aislado de *Curcuma longa* y usada como especie y colorante alimentario. Estos últimos dos compuestos representan candidatos a fármacos muy prometedores y se encuentran en ensayos clínicos⁸⁷.

Triterpenos pentacíclicos con actividad anti-VIH

Los compuestos naturales que más se han estudiado en los últimos años son, seguramente, los triterpenos pentacíclicos de la serie del lupano (TPL)⁸⁸. Esta clase de compuestos se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas y exhiben un amplio rango de bioactividades. En particular, representan una fuente natural de agentes antirretrovirales con una plataforma estructural muy versátil para el descubrimiento de nuevos compuestos bioactivos y, por lo tanto, se pueden considerar *estructuras privilegiadas*^{49,50}. Por otra parte, se han reportado TPLs, como lupeol, betulina y ácido betulínico, con propiedades biológicas que incluyen insecticida, antiviral, anticancerígena o antiinflamatoria⁸⁹ y, por lo tanto, estos compuestos se pueden considerar agentes polifarmacológicos.

El ejemplo más destacado de los TPLs es, sin lugar a duda, el ácido betulínico, triterpeno lupano que se encuentra en abundancia en muchas especies vegetales. En los últimos años, muchos de sus análogos en las posiciones C-3 y/o C-28 han sido reportados por su inhibición de la replicación de VIH^{90,91,92,93}. El derivado más estudiado

⁸⁶ CASSELS, B. K.; ASENCIO, M. (2010). Anti-HIV activity of natural triterpenoids and hemisynthetic derivatives 2004–2009. *Pytochem. Rev.* 10, 545–564.

⁸⁷ SINGH, I. P.; BODIWALA, H. S. (2010). Recent advances in anti-HIV natural products. *Nat. Prod. Rep.*, 27, 1781–1800.

⁸⁸ VASILEVSKY, S. F.; GOVDI, A. I.; SOROKINA, I. V.; TOLSTIKOVA, T. G.; BAEV, D. S.; TOLSTIKOV, G. A.; MAMATUYK, V. I.; ALABUGIN, I. V. (2011). Rapid access to new bioconjugates of betulonic acid via click chemistry. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 21, 62–65.

⁸⁹ TOLSTIKOVA, T. G.; SOROKINA, I. V.; TOLSTIKOV, A. G.; FLEKHTER, O. B. (2006). *Russ. J. Bioorg. Chem.*, 32(1), 37–49.

⁹⁰ HUANG, L.; HO, P.; LEE, K. H.; CHEN, C. H. (2006). Synthesis and anti-HIV activity of bi-functional betulonic acid derivatives. *Bioorg. Med. Chem.*, 14, 2279–2289.

⁹¹ SUN, I. C.; WANG, H.-K.; KASHIWADA, Y.; SHEN, J. K.; COSENTINO, L. M.; CHEN, C. H.; YANG, L. M.; LEE, K. H. (1998). Anti-AIDS agents. 34. Synthesis and structure-activity relationships of betulin derivatives as anti-HIV agents. *J. Med. Chem.*, 41, 4648–4657.

es el bevirimat, desarrollado por Panacos Pharmaceutical Inc.⁹⁴ y que finalizó los ensayos de fase clínica IIB. Fue el primer ejemplo de fármaco que actúa a nivel de la maduración del virus con un mecanismo de acción diferente a los inhibidores de maduración conocidos hasta entonces^{95,96}. Sin embargo, los estudios clínicos con éste fármaco se abandonaron dado que se observó una resistencia intrínseca en ciertos pacientes debido a un polimorfismo en el gen *gag* que afecta a los sitios de unión de bevirimat⁹⁷. Recientemente, se han descrito análogos con una mayor hidrosolubilidad, capaces de superar la resistencia⁹⁸ con un mejor perfil antiviral⁹⁹ aportando información sobre el mecanismo de acción de los inhibidores de la maduración del VIH¹⁰⁰.

La excelente actividad antiviral mostrada por estos análogos de TPLs, unido a que algunos de ellos resultan productos mayoritarios en ciertas especies vegetales y su baja toxicidad hace de este grupo de metabolitos secundarios un extraordinario punto de partida en la búsqueda de nuevos agentes anti-VIH¹⁰¹.

En nuestro grupo de trabajo hemos abordado una línea de investigación que tiene como objetivo la búsqueda de nuevos agentes anti-VIH de especies vegetales. En esta

⁹² QIAN, K.; YU, D.; CHEN, C. H.; HUANG, L.; MORRIS-NATSCHKE, S. L.; NITZ, T. J.; SALZWEDEL, K.; REDDICK, M.; ALLAWAY, G. P.; LEE, K. H. (2009). Anti-AIDS agents. 78. Design, synthesis, metabolic stability assessment, and antiviral evaluation of novel betulinic acid derivatives as potent anti-Human Immunodeficiency Virus (HIV) agents. *J. Med. Chem.*, 52, 3248–3258.

⁹³ QIAN, K.; BORI, I. D.; CHEN, C. H.; HUANG, L.; LEE, K. H. (2012). Anti-AIDS agents 90. Novel C-28 modified bevirimat analogues as potent HIV maturation inhibitors. *J. Med. Chem.*, 55, 8128–8136.

⁹⁴ SMITH, P.F.; OGUNDELE, A.; FORREST, A.; WILTON, J.; SALZWEDEL, K.; DOTO, J.; ALLAWAY, G. P.; MARTIN, D. E. (2007). Phase I and II study of the safety, virologic effect, and pharmacokinetics/pharmacodynamics of single-dose 3-O-(3',3'-dimethylsuccinyl)betulinic acid (bevirimat) against human immunodeficiency virus infection. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 51, 3574–3581.

⁹⁵ QIAN, K.; KUO, R.-Y.; CHEN, C.-H.; HUANG, L.; MORRIS-NATSCHKE, S.L.; LEE, K.-H. (2010). Anti-AIDS agents 81. Design, synthesis, and structure-activity relationship study of betulinic acid and moronic acid derivatives as potent HIV maturation inhibitors. *J. Med. Chem.* 53, 3133–3141.

⁹⁶ KASHIWADA, Y.; SEKIYA, M.; IKESHIRO, Y.; FUJIOKA, T.; KILGORE, N. R.; WILD, C. T.; ALLAWAY, G. P.; LEE, K.-H. (2004). 3-O-Glutaryl-dihydrobetulin and related monoacyl derivatives as potent anti-HIV agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 14 (23), 5851–5853.

⁹⁷ LU, W.; SALZWEDEL, K.; WANG, D.; CHAKRAVARTY, S.; FREED, E. O.; WILD, C. T.; LI, F. (2011). A single polymorphism in HIV-1 subtype C SP1 is sufficient to confer natural resistance to the maturation inhibitor bevirimat. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55 (7), 3324–3329.

⁹⁸ CORIC, P.; TURCAUD, S.; SOUQUET, F.; BRIANT, L.; GAY, B.; ROYER, J.; CHAZAL, N.; BOUAZIZ, S. (2013). Synthesis and biological evaluation of a new derivative of bevirimat that targets the Gag CA-SP1 cleavage site. *Eur. J. Med. Chem.*, 62, 453–465.

⁹⁹ DANG, Z.; HO, P.; ZHU, L.; QIAN, K.; LEE, K. H.; HUANG, L.; CHEN, C. H. (2013). New betulinic acid derivatives for bevirimat-resistant Human Immunodeficiency Virus type-1. *J. Med. Chem.*, 56, 2029–2037.

¹⁰⁰ WAKI, K.; DURELL, S. R.; SOHEILIAN, F.; NAGASHIMA, K.; BUTLER, S. L.; FREED, E. O. (2012). Structural and functional insights into the HIV-1 maturation inhibitor binding pocket. *PLoS Pathogens*, 8(11), e1002997, doi: 10.1371/journal.ppat.1002997.

¹⁰¹ SCHEFFLER, A. (2002). Verfahren zur Gewinnung von Triterpenen aus Pflanzen sowie deren Verwendung. Aplicación de patente, DE10056902 A1.

línea y como resultados de trabajos anteriores, hemos estudiado triterpenos pentacíclicos de la serie del oleano, aislados de especies de la familia Celastraceae, que han mostrado una potente actividad anti-VIH¹⁰².

Continuando en la búsqueda de nuevos agentes antirretrovirales de fuentes naturales y con particular interés en los TPLs, se preparó una quimioteca de compuestos análogos basándonos en la estructura de estos metabolitos. Con la colaboración del grupo del Dr. José Alcamí de la Unidad de Inmunopatología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, se han evaluado una serie de triterpenos lupanos, tanto naturales como la quimioteca anteriormente comentada, como compuestos clave en la inhibición del VIH, ya que presentan una disposición de sustituyentes sobre el esqueleto triterpénico poco habitual. Así, estos metabolitos proporcionan una gran variedad estructural que nos permiten conocer los requerimientos estructurales relacionados con su actividad biológica y comprender su mecanismo de acción.

4.4.2 | Resultados y discusión

La evaluación del potencial inhibidor del virus de la inmunodeficiencia humana 1 (VIH-1) de una serie de 48 TPLs fue realizada por los miembros del equipo de investigación del Dr. José Alcamí, el Dr. Luis M. Bedoya, la Dra. Patricia Obregón Calderón y el Lic. Alejandro Muñoz, en la Unidad de Inmunopatología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III. La metodología empleada para dicha evaluación está recogida en diversas publicaciones¹⁰³ de este grupo de investigación.

Los TPLs de origen natural ofrecen un amplio patrón de sustitución, lo que permite ampliar la diversidad estructural y proporcionar un mayor conocimiento de las características estructurales que le confieren actividad biológica a este prometedor grupo de metabolitos. Además, proporcionan información sobre el mecanismo por el cual estos ejercen su acción.

¹⁰² OSORIO, A. A.; MUÑOZ, A.; TORRES-ROMERO, D.; BEDOYA, L. M.; PERESTELO, N. R.; JIMÉNEZ, I. A.; ALCAMÍ, J.; BAZZOCCHI, I. L. (2012). Olean-18-ene triterpenoids from Celastraceae species inhibit HIV replication targeting NF- κ B and Sp1 dependent transcription. *Eur. J. Med. Chem.*, 52, 295–303.

¹⁰³ a) ADACHI, A.; GENDELMAN, H. E.; KOENIG, S.; FOLKS, T.; WILLEY, R.; RABSON, A.; MARTIN, M. A. (1986). *J. Virol.*, 59, 284–291. b) BRUMMELKAMP, T. R.; BERNARDS, R.; AGAMI, R. SCIENCE. 2002, 296, 550–553. c) COLLMAN, R.; BALLIET, J. W.; GREGORY, S. A.; FRIEDMAN, H.; KOLSON, D. L.; NATHANSON, N.; SRINIVASAN, A. (1992). *J. Virol.*, 66, 7517–7521. d) CONNOR, R. I.; CHEN, B. K.; CHOE, S.; LANDAU, N. R. (1995). *Virology*, 206, 935–944. e) GONZÁLEZ, N.; PÉREZ-OLMEDA, M.; MATEOS, E.; CASCAJERO, A.; ALVAREZ, A.; SPIJKERS, S.; GARCÍA-PÉREZ, J.; SÁNCHEZ-PALOMINO, S.; RUIZ-MATEOS, E.; LEAL, M. ALCAMI, J. (2010). *J. Antimicrob. Chemother.*, 65, 2493–2501. f) KOYANAGI, Y.; MILES, S.; MITSUYASU, R. T.; MERRILL, J. E.; VINTERS, H. V.; CHEN, I. S. (1987). *Science.*, 236, 819–822. g) OBERLIN, E.; AMARA, A.; BACHELERIE, F.; BESSIA, C.; VIRELIZIER, J. L.; ARENZANA-SEISDEDOS, F.; SCHWARTZ, O.; HEARD, J. M.; CLARK-LEWIS, I.; LEGLER, D. F.; LOETSCHER, M.; BAGGIOLINI, M.; MOSER, B. (1996). *Nature*, 382, 833–835.

Con esta idea en mente y a fin de ampliar el espectro de sustituciones sobre el esqueleto de TPL, se evaluaron una serie de 26 metabolitos naturales (**T1-T26**), aislados de *Maytenus cuzcoina* y *Cassine xylocarpa*, dos especies de la familia Celastraceae, en trabajos anteriores de nuestro grupo de investigación^{53,104} (Fig. 4.32), así como una serie de 22 análogos (**T27-T48**), preparados durante el desarrollo de este trabajo de Tesis Doctoral (Fig. 4.34).

Si bien las propiedades anti-VIH de los compuestos naturales **T9**⁶² y **T24**^{91,105} así como la de los derivados **T27**¹⁰⁶, **T34**¹⁰⁵ y **T38**⁶² ya se habían descrito previamente, se han incluido en nuestro estudio, dado que el procedimiento usado anteriormente para su evaluación fue diferente al empleado en el presente trabajo y ello nos permite ampliar el análisis de la relación estructura-actividad.

La metodología general empleado en los estudios de la actividad antirretroviral de los TPLs ha sido la siguiente:

- Determinación de la inhibición de la replicación del VIH-1 en células MT-2
- Determinación de los valores de CI₅₀ de los compuestos más activos [porcentaje de unidades relativas de luz (% URL) mayor del 50%] en células MT-2 utilizando dos tipos de VIH-1 recombinantes.
- Determinación de la concentración citotóxica (CC₅₀) de los compuestos.
- Comparación de los resultados para determinar si los TPLs actúan a nivel de la entrada del virus.
- Determinación de la inhibición de la transcripción de los TPLs seleccionados en ensayos anteriores.
- Determinación de la actividad inhibidora de los 3 compuestos más activos en la maduración del VIH-1
- Determinación de la inhibición de proteasa en una cepa sensible y en una resistente a nelfinavir, inhibidor de proteasa usado en clínica.
- Estudios preliminares del efecto de los TPLs sobre los precursores de p24.

¹⁰⁴ TORRES-ROMERO, D. F. (2008). *Metabolitos secundarios bioactivos aislados de Celastrus vulcanicola y Cassine xylocarpa*. (Tesis Doctoral). Departamento de Química Orgánica. Universidad de La Laguna.

¹⁰⁵ SUN, I. CH.; SHEN, J. K.; WANG, H. K.; COSENTINO, L. M.; LEE, K. H. (1998). Anti-AIDS agents. 32. Synthesis and anti-HIV activity of betulin derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 8, 1267-1272.

¹⁰⁶ SAXENA, B. B.; RATHNAM, P.; BOMSHTYEN, A. (2005). Anti-HIV-1 activity of betulinol derivatives. Aplicación de patente, PCT/US2005/017429, WO/2005112929-A2.

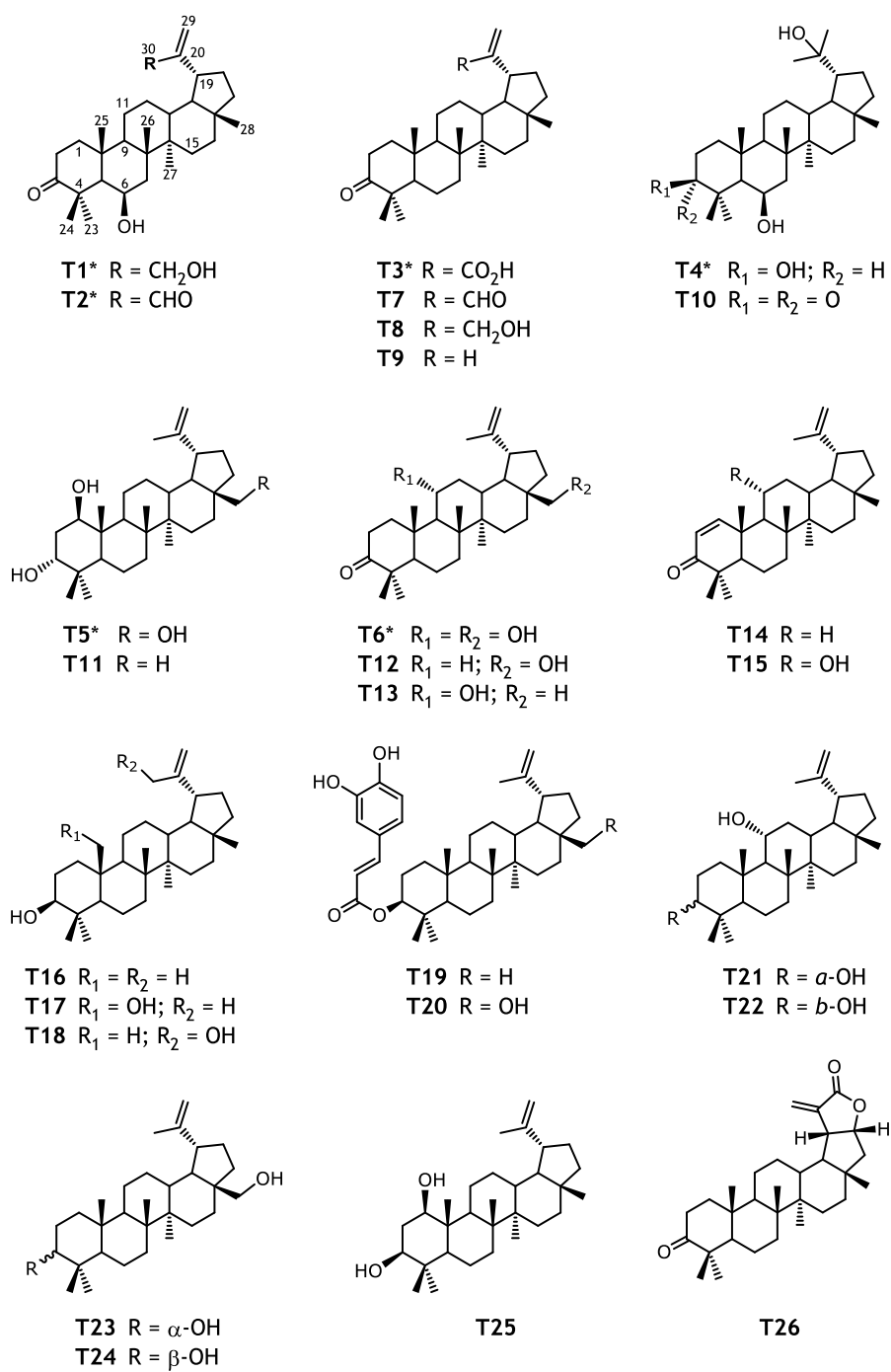


Fig. 4.33 | TPLs naturales evaluados como agentes anti-VIH.

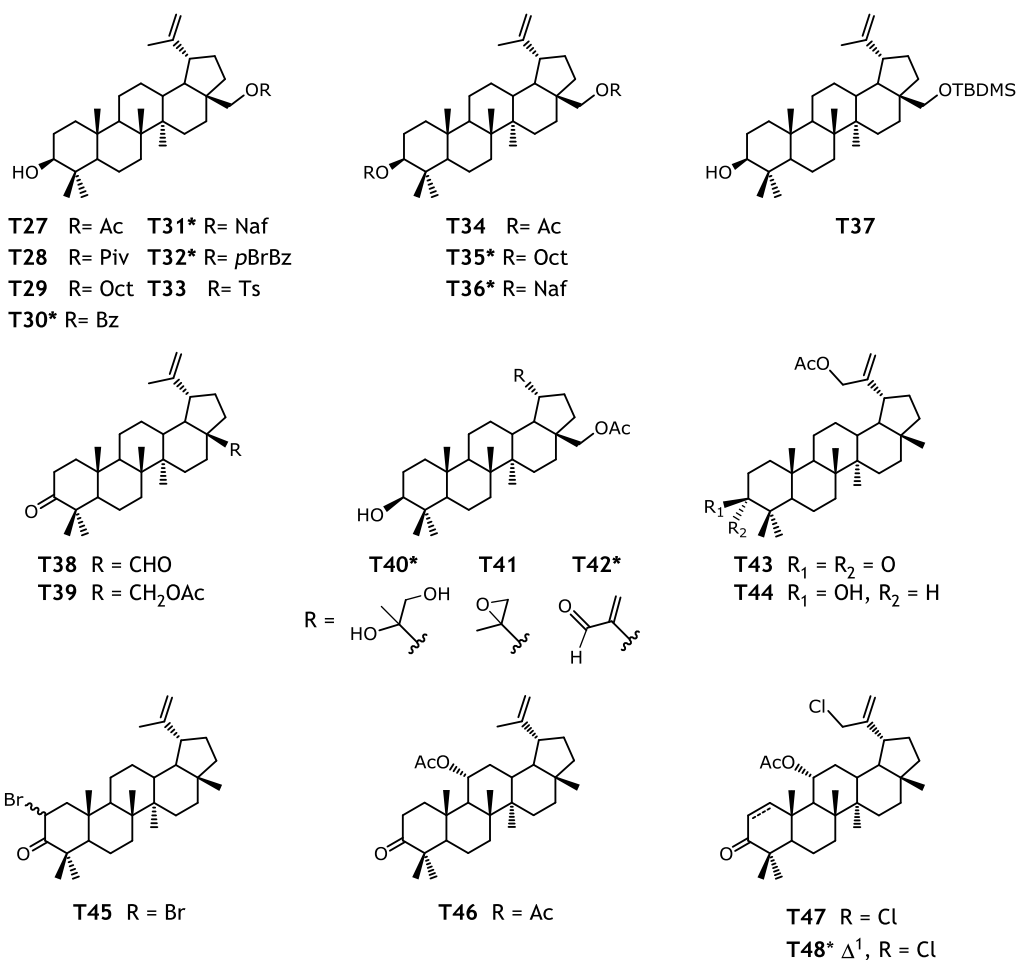


Fig. 4.34 | Derivados de TPLs evaluados como agentes anti-VIH.

Inhibición de la replicación del VIH-1

En un análisis preliminar de los 48 TPLs, estos metabolitos se evaluaron por su efecto inhibitor de la replicación del VIH-1. Los ensayos se realizaron infectando una línea celular linfocida (MT-2)¹⁰⁷ con una cepa X4-trópica de VIH-1 recombinante (NL4.3-Ren) con el plásmido pNL4.3-Renilla¹⁰⁸ producida por células 293t^{109,110}, en presencia de los compuestos a evaluar a una concentración de 10 μM.

¹⁰⁷ HARADA, S.; KOYANAGI, Y.; YAMAMOTO, N. (1985). Infection of HTLV-III/LAV in HTLV-I-carrying cells MT-2 and MT-4 and application in a plaque assay. *Science*, 229(4713), 563–566

¹⁰⁸ DUBRIDGE, R. B.; TANG, P.; HSIA, H. C.; LEONG, P. M.; MILLER, J. H.; CALOS, M. P. (1987). Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol. Cell Biol.*, 7(1), 379–387.

¹⁰⁹ PEAR, W. S.; NOLAN, G. P.; SCOTT, M. L.; BALTIMORE, D. (1993). Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 90(18), 8392–8396.

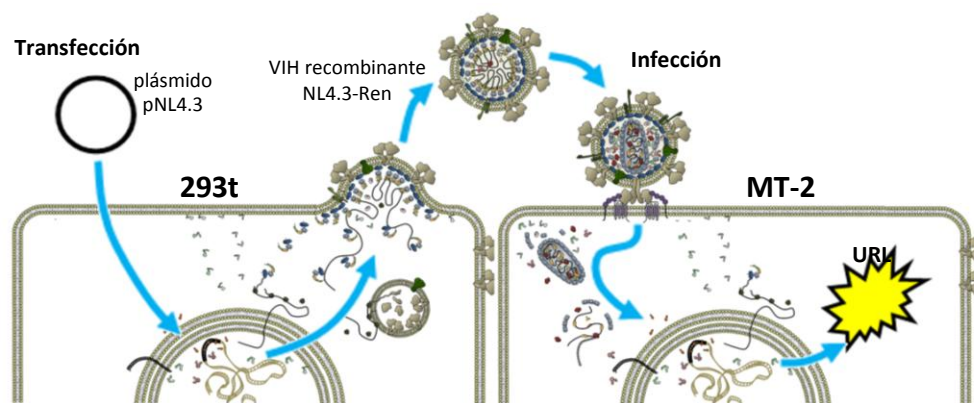


Fig. 4.35 | Metodología empleada para la evaluación de inhibición del ciclo reproductivo del VIH-1.

Los resultados se presentan como % URL en comparación con un control sin tratar (100%), indicando que 16 de los compuestos muestran un URL menor del 50%, 20 de los compuestos muestran un URL (unidades relativas de luz) entre 50–100% y 12 compuestos no afectaron a la replicación del virus (URL > 100%, Tabla 4.4Tabla 4. y Fig. 4.36).

Tabla 4.4 | Replicación del VIH-1 recombinante en presencia de los TPLs. Evaluación de los compuestos T1–T48 como inhibidores de la replicación del VIH-1. Los ensayos se realizaron por triplicado y se indica el promedio de los valores obtenidos como porcentaje de URL en comparación con un control sin tratar (100±42% de URL). DE: desviación estándar.

TPL	% URL ± DE	TPL	% URL ± DE	TPL	% URL ± DE
T1	22% ± 8%	T17	18% ± 10%	T33	66% ± 13%
T2	5% ± 5%	T18	122% ± 49%	T34	69% ± 9%
T3	17% ± 7%	T19	84% ± 17%	T35	94% ± 16%
T4	77% ± 24%	T20	61% ± 5%	T36	74% ± 18%
T5	114% ± 26%	T21	54% ± 4%	T37	58% ± 15%
T6	81% ± 7%	T22	21% ± 6%	T38	26% ± 7%
T7	0% ± 0%	T23	22% ± 3%	T39	31% ± 11%
T8	67% ± 8%	T24	64% ± 26%	T40	64% ± 28%
T9	131% ± 9%	T25	56% ± 15%	T41	59% ± 1%
T10	31% ± 12%	T26	16% ± 10%	T42	0% ± 0%
T11	34% ± 1%	T27	86% ± 23%	T43	46% ± 1%
T12	27% ± 10%	T28	112% ± 5%	T44	127% ± 44%
T13	171% ± 51%	T29	91% ± 25%	T45	183% ± 103%
T14	209% ± 65%	T30	126% ± 24%	T46	97% ± 7%
T15	32% ± 9%	T31	64% ± 14%	T47	115% ± 45%
T16	104% ± 31%	T32	171% ± 71%	T48	70% ± 8%

¹¹⁰ GARCÍA-PÉREZ, J.; SÁNCHEZ-PALOMINO, S.; PÉREZ-OLMEDA, M.; FERNÁNDEZ, B.; ALCAMÍ, J. (2007). A new strategy based on recombinant viruses as a tool for assessing drug susceptibility of human immunodeficiency virus type 1. *J. Med. Virol.*, 79(2), 127–137.

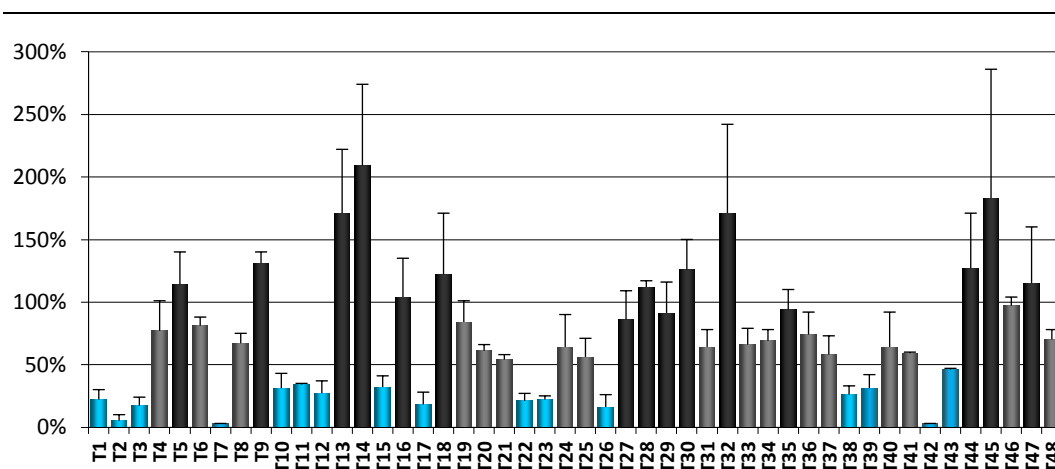


Fig. 4.36 | Representación gráfica de barras los datos obtenidos en los ensayos de inhibición del ciclo reproductivo del VIH-1 recombinante. Azul: compuestos seleccionados como más activos. C: control.

Estudios del mecanismo de acción de los TPLs

Efecto sobre la entrada del virus: Determinación de CI_{50} en la replicación del VIH-1 y VSV-pseudotipado VIH-1

Según los resultados del ensayo anterior, se seleccionaron aquellos compuestos que mostraron un % de replicación del VIH-1 menor del 50% de URL (**T1–T3, T7, T10–T12, T15, T17, T22, T23, T26, T38, T39, T42 y T43**, Fig. 4.36, en azul) para llevar a cabo estudios posteriores. Así, se determinó su valor de CI_{50} (concentración que inhibe la replicación viral en un 50%) en la replicación de VIH-1 y de VSV-Luc, así como su viabilidad (CC_{50} , concentración citotóxica media) en células MT-2. Esto nos permitiría evaluar la potencia de los TPLs y profundizar en el estudio de su modo de acción y, por otro lado, descartar que la actividad se deba a un efecto citotóxico del compuesto.

Estos ensayos se realizaron infectando la línea celular MT-2 con dos cepas diferentes de VIH-1: una línea viral X4-trópica recombinante (NL4.3-Ren) y un pseudotipo de VIH-1 (NL4.3-Denv-VSV-Luc)¹¹¹ con envoltura del virus de la estomatitis vesicular (VSV), cuya característica es la ausencia de los receptores virales correspondientes para unirse a los receptores celulares CD4, CCR5 y/o CXCR4, lo que permite explorar si nuestros compuestos actúan a nivel de la entrada del virus. Los ensayos se llevaron a cabo a seis

¹¹¹ OBERLIN, E.; AMARA, A.; BACHELERIE, F.; BESSIA, C.; VIRELIZIER, J. L.; ARENZANA-SEISDEDOS, F.; SCHWARTZ, O.; HEARD, J. M.; CLARK-LEWIS, I.; LEGLER, D. F.; LOETSCHER, M.; BAGGIOLINI, M.; MOSER, B. (1996). The CX chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature*, 382(6594), 833–835.

concentraciones (100, 20, 4, 0.8, 0.16 y 0.032 μM) de cada uno de los productos. La viabilidad celular se evaluó usando las mismas condiciones, pero añadiendo un medio de cultivo celular (RPMI) en lugar del sobrenadante viral. En todos los ensayos se usó bevirimat como control positivo. Los datos obtenidos en estos ensayos se muestran en la Tabla 4.5 y en las Fig. 4.37 y Fig. 4.38.

Tabla 4.5 | Cálculo de CI_{50} y CC_{50} basados en curvas de concentración-respuesta de los TPLs seleccionados (<50% de URL de replicación). Se muestra la concentración de compuesto que inhibe el 50% de la replicación viral (CI_{50}) del VIH-1 recombinante (NL4.3-Ren) y el pseudotipo VSV (VSV-Luc) del VIH-1 recombinante. La viabilidad (CC_{50}) se expresa como la concentración de compuesto que produce el 50% de mortalidad en la línea celular MT-2. Las CI_{50} y CC_{50} se expresan en μM y fueron calculadas con el programa GrapPad Prism. Los datos son la media de al menos 3 experimentos independientes. DE: Desviación estándar. SI: índice de especificidad ($\text{CC}_{50}/\text{CI}_{50}$).

TPLs	$\text{CI}_{50} \pm \text{DE } \mu\text{M}$ VIH	$\text{CI}_{50} \pm \text{DE } \mu\text{M}$ VSV-Luc	$\text{CC}_{50} \pm \text{DE } \mu\text{M}$	SI VIH	SI VSV-Luc
T1	9.54 \pm 2.63	4.11 \pm 0.81	>20<100	>2.10<10.48	>4.87<24.33
T2	7.91 \pm 2.56	4.38 \pm 0.07	10.35	1.31	2.36
T3	\approx 100	\approx 100	>100	—	—
T7	1.35 \pm 0.23	1.72 \pm 0.33	5.69 \pm 3.93	4.23	3.31
T10	6.98 \pm 3.29	6.41 \pm 0.53	>100	>14.33	>15.60
T11	13.90 \pm 3.22	13.74 \pm 1.98	>20<100	>1.44<7.19	>1.46<7.28
T12	4.08 \pm 1.83	3.91 \pm 2.93	>100	>24.51	>25.58
T15	8.72 \pm 1.94	11.56 \pm 0.34	>20<100	6.92	5.22
T17	6.93 \pm 1.88	6.64 \pm 0.53	>20<100	>2.89<14.43	>3.01<15.06
T22	10.38 \pm 5.02	8.45 \pm 4.16	>20<100	>1.93<9.63	>2.37<11.83
T23	8.79 \pm 0.53	16.50 \pm 7.81	>20<100	>2.28<11.38	>1.21<6.06
T26	39.01 \pm 2.84	61.17 \pm 4.64	>100	>2.56	>1.63
T38	4.18 \pm 0.00	8.27 \pm 3.94	>20<100	>4.78<23.92	>2.42<12.09
T39	13.42 \pm 2.01	17.12 \pm 1.00	>20<100	>1.49<7.45	>1.17<5.84
T42	1.70 \pm 0.19	3.03 \pm 2.10	14.21 \pm 2.41	8.24	4.68
T43	13.05 \pm 2.92	11.75 \pm 1.55	>20<100	2.78	3.08
Bevirimat	0.01 \pm 0.00	—	>10	>1000	—

La comparación de los valores de CI_{50} en ambos tipos de VIH de este ensayo nos permite determinar si el compuesto actúa a nivel de la entrada del virus a la célula, en cuyo caso el compuesto inhibiría en mayor grado el VIH que el VSV-Luc, ya que este último, como hemos comentado, no contiene las proteínas necesarias para su entrada a la célula.

El análisis de los datos obtenidos indicaron que los compuestos **T7** y **T42** son los que presentan mayor potencia frente a ambos tipos de virus, con una CI_{50} entre 1.3 y 3.0 μM . Los compuestos **T12** y **T38** mostraron valores de CI_{50} entorno a 4 μM , seguidos por los compuestos **T10** y **T17**, con valores de CI_{50} por debajo de 7 μM .

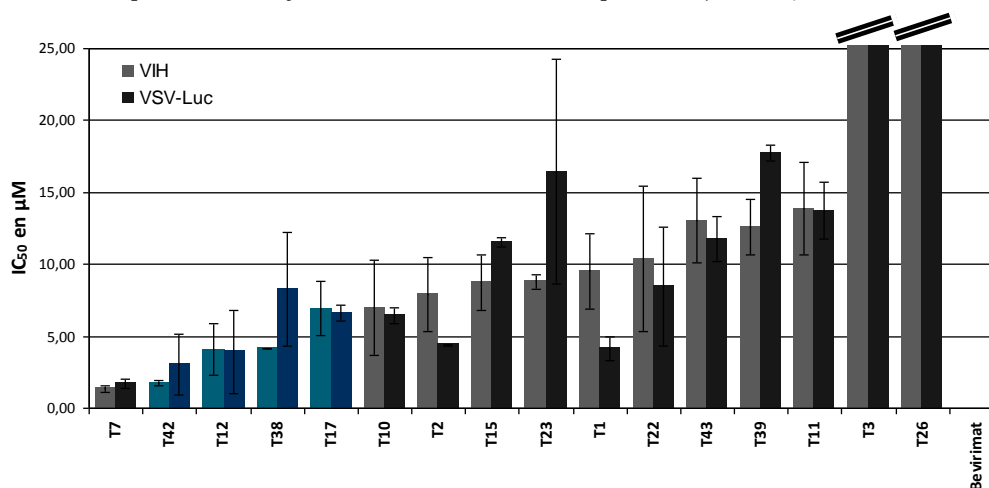


Fig. 4.37 | Representación gráfica de los valores de CI_{50} de los 16 TPLs seleccionados (<50% de URL de replicación). Se muestra la concentración de compuesto que inhibe el 50% de la replicación viral (CI_{50}) del VIH-1 recombinante (NL4.3-Ren) y del pseudotipo VSV-Luc. En azul se indican aquellos compuestos que se seleccionaron para la posterior evaluación de su mecanismo de acción.

Por otra parte, se observa que los compuestos **T23**, **T38**, **T39** y **T42** mostraron valores de CI_{50} más altos para el VSV-Luc que para el VIH. Estos resultados sugieren una cierta dependencia de la envoltura del virus en la actividad de los compuestos a nivel de la entrada, siendo la diferencia entre ambos valores de CI_{50} inferior a un factor de dos, lo que indica que la inhibición de la entrada del virus a la célula no debe ser la principal diana de esta serie de TPLs. Por otra parte, en el resto de los compuestos no se observó especificidad, ya que los valores de CI_{50} en ambas líneas virales fueron similares.

Al analizar la citotoxicidad de los compuestos evaluados (valores de CC_{50}) y el correspondiente índice de selectividad (IS, calculado como CC_{50}/CI_{50}), se puede concluir que la selectividad fue aceptable para los compuestos **T12** (IS > 24.51) y **T10** (IS > 14.33) y moderada para el compuesto **T42** (IS = 8.24). El compuesto **T38**, uno de los más potentes ($CI_{50} = 4.18 \mu\text{M}$), mostró un IS en un rango de 4.78–23.9, mientras que la selectividad fue baja para los demás compuestos. El compuesto **T7** que resultó ser el más potente de la serie (CI_{50} de 1.35 μM) fue excluido de los ensayos posteriores debido a su alto grado de citotoxicidad (CC_{50} de 5.69 μM , IS = 4.23). De acuerdo a los resultados obtenidos, se seleccionaron los diez compuestos más potentes y menos citotóxicos para determinar su efecto sobre la transcripción viral.

Determinación del efecto sobre dianas de post-integración

Los TPLs que en los ensayos anteriores resultaron más potentes y menos tóxicos (**T10-T12, T17, T22, T23, T38, T42 y T43**), fueron sometidos a ensayos para evaluar su mecanismo de acción sobre dianas de post-integración, incluyendo la transcripción o maduración del virus, usando bevirimat como control.

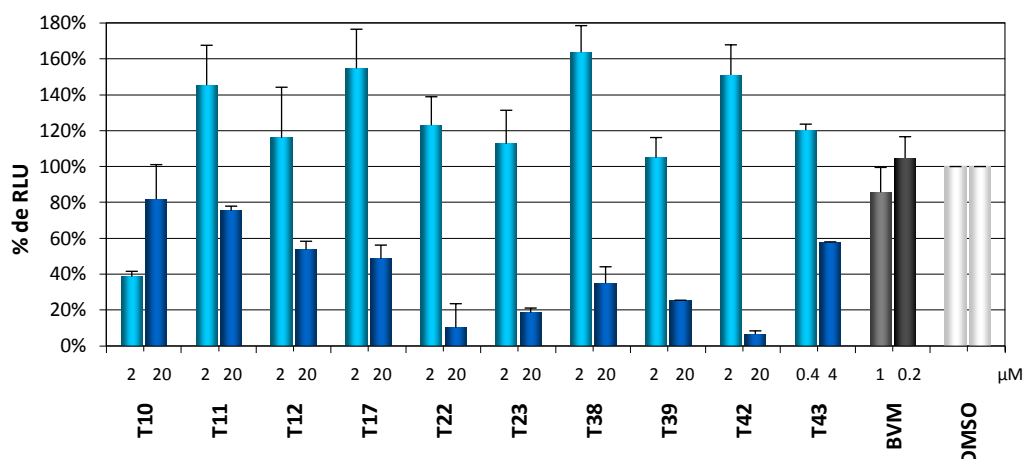


Fig. 4.38 | Actividad transcripcional de VIH-1 en presencia de los seleccionados TPLs en células MT-2. Éstas fueron transfectadas con un plásmido de luciferasa bajo el control del genoma del VIH-1 entero y en presencia de diferentes concentraciones de los TPLs y el control positivo bevirimat (BVM). Los datos se presentan como % URL en comparación con un control sin tratar (DMSO, 100%).

Para ello, el genoma completo de VIH-1 (NL4.3-Luc) fue transfectado tanto en la línea celular MT-2 como en la línea 293t, usada para producir los sobrenadantes virales, en presencia o ausencia de la concentración efectiva de los compuestos. De esta forma, se descartan los pasos previos a la transcripción viral y es posible evaluar el efecto de los compuestos sobre los pasos de post-integración. Estos ensayos se llevaron a cabo a dos concentraciones diferentes según los valores de CC_{50} y CI_{50} de cada compuesto (Fig. 4.38).

De acuerdo a los resultados obtenidos, se seleccionaron los tres compuestos más potentes y menos citotóxicos (**T12, T38 y T42**) para calcular su potencia (IC_{50}) y profundizar en el estudio de sus mecanismos de acción. Así, con el objetivo de evaluar el efecto que tienen estos compuestos en el proceso de generación de nuevas partículas virales y estudiar específicamente los pasos de post-integración, se utilizó el plásmido NL4.3-Luc para transfectar células 293t. Aquellos compuestos afectarán a los sobrenadantes virales obtenidos tras la transfección únicamente si, en el ciclo replicativo del virus, actúan a nivel de la post-integración. La transcripción también se puede evaluar midiendo la actividad de luciferasa en el sedimento de las células 293t

transfectadas. Así, las URL en el sedimento de 293t indicarán el efecto inhibitor de la transcripción del VIH del correspondiente compuesto, mientras que la infectividad del sobrenadante indicará su actividad sobre los pasos post-transcripcionales incluyendo el transporte de ARN viral mediado por la proteína Rev, la actividad proteasa y/o la maduración.

El análisis de los resultados obtenidos mostró que el compuesto **T38**, a una concentración de 20 μM , es capaz de reducir la actividad transcripcional del VIH-1 hasta un 40% URL. Sus valores de CI_{50} (4.18 μM para la replicación de VIH-1) y CC_{50} (entre 20 y 100 μM en células MT-2) indican que, en el ciclo de replicación del VIH, podría actuar sobre la transcripción aunque no se descartan otras dianas. El derivado **T42**, a una concentración de 4 μM , inhibió la transcripción casi completamente y, por ello, ésta debe ser su principal diana. En comparación, el derivado **T12** mostró una actividad transcripcional de 54% URL, valor que indica una baja actividad inhibitora de la transcripción del virus para un compuesto considerablemente potente (CI_{50} de 4.05 μM). El control bevirimat no afecta a la transcripción ya que presentó valores superiores al 95% URL.

El siguiente paso fue la **determinación de la potencia inhibitora (CI_{50}) sobre la transcripción viral**. Así, se determinó el efecto de los TPLs seleccionados frente a células MT-2 y 293t transfectadas con un plásmido de luciferasa bajo el control del genoma completo del VIH-1 (NL4.3-Luc). El ensayo se realizó en presencia o ausencia de cuatro concentraciones diferentes de compuesto (100, 20, 4 y 0.8 μM) para calcular los correspondientes valores de CI_{50} (Fig. 4.39).

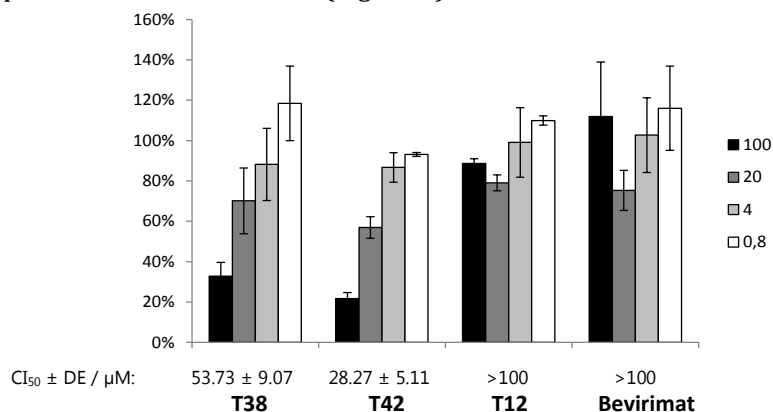


Fig. 4.39 | Actividad transcripcional de VIH-1 de los TPLs seleccionados en células 293t. Las células fueron transfectadas con un plásmido de luciferasa bajo el control del genoma entero de VIH-1 en presencia de diferentes concentraciones de compuesto y bevirimat. Los datos de representan como % de URL en comparación con un control sin tratar (100%). Las concentraciones se indican en μM . Los valores de CI_{50} fueron calculados con el programa informático *GraphPad Prism*. DE: desviación estándar.

Los resultados obtenidos confirman que los compuestos **T38** y **T42** fueron capaces de inhibir la actividad transcripcional del VIH, aunque sus valores de CI_{50} resultaron próximos a los de su citotoxicidad (CC_{50} entre 20 y 100 μM para **T38** y 14.21 μM para **T42**), por lo que buscamos otras posibles dianas para estos compuestos.

Especificidad de los TPLs sobre el gen indicador *luc*

Para evaluar si los compuestos inhiben inespecíficamente la transcripción o traducción del gen indicador, se llevaron a cabo unos ensayos preliminares. Por ello, se utilizó la línea celular HeLa Tet-On Luc, en la cual la actividad de luciferasa se produce de manera independiente.

Los resultados a tres concentraciones de los compuestos **T12**, **T38** y **T42** que se muestran en la Fig. 4.40, indican que los TPLs **T12** y **T38**, muestran una inhibición baja a la menor concentración usada, mientras que el compuesto **T42** no mostró inhibición. Por lo tanto, la actividad antirretroviral de los tres compuestos no depende de la dosis, lo que descarta un efecto no específico sobre el gen indicador o sus productos genéticos.

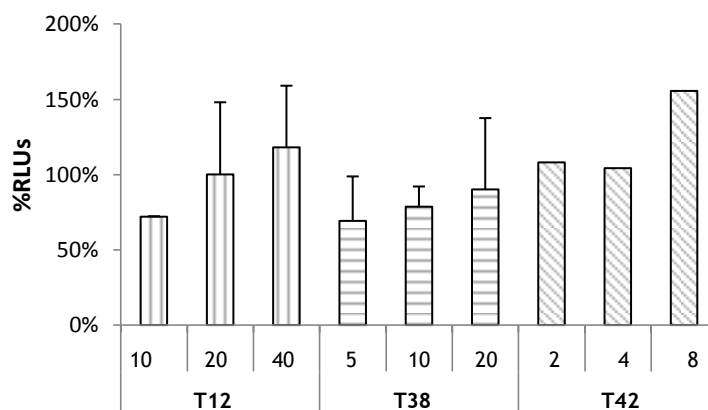


Fig. 4.40 | El efecto de TPLs sobre el gen *luc* en la línea celular HeLa Tet On Luc y sus productos de transcripción evaluado a diferentes concentraciones de TPL.

Efecto sobre dianas de post-transcripción

Efecto sobre la maduración

Los sobrenadantes virales (NL4.3-Luc) obtenidos a partir de las células 293t se recolectaron después de su transfección y se usaron para infectar células MT-2 en presencia o ausencia de TPL para evaluar su efecto post-transcripcional.

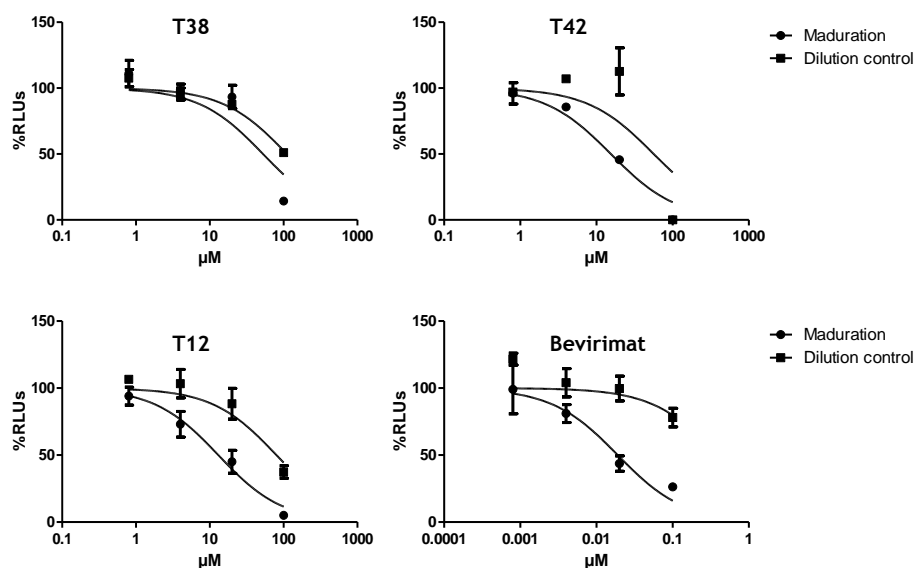


Fig. 4.41 | Actividad post-transcripcional de los TPLs y bevirimat en células 293t. Las células fueron transfectadas en presencia de diferentes concentraciones de los compuestos **T38**, **T42**, **T12** y bevirimat con el plásmido NL4.3-Luc que codifica el genoma entero de VIH-1 recombinante. Los sobrenadantes fueron recolectados y se usaron para infectar células MT-2. Un control de dilución fue usado para evaluar la actividad residual de los TPLs en el sobrenadante de 293t. Los resultados se expresan en μM .

Los resultados obtenidos (Fig. 4.41 y Tabla 4.5) indican que el derivado **T12**, al igual que el bevirimat, mostró un claro efecto sobre la maduración del virus, mientras que los derivados **T38** y **T42** presentaron CI_{50} de maduración similares a las concentraciones citotóxicas correspondientes (CC_{50} entre 20 y 100 μM y 14.21 μM , respectivamente). Sin embargo, a pesar del efecto sobre la maduración de **T12**, la CI_{50} sobre la replicación del virus fue menor que sobre la maduración, lo que indica que esta no debe ser su única diana.

Tabla 4.6 | Valores de CI_{50} de la actividad post-transcripcional de los TPLs y bevirimat en células 293t. Los valores se calcularon basándose en las curvas de la Fig. 4.41 con el programa informático *GraphPad Prism*.

	Maduration $\text{CI}_{50} \pm \text{DE} / \mu\text{M}$	Control de dilución $\text{CI}_{50} \pm \text{DE} / \mu\text{M}$
T38	35.440 \pm 0.38	162.065 \pm 106.26
T42	16.045 \pm 3.40	30.105 \pm 2.54
T12	18.900 \pm 7.25	45.405 \pm 5.18
Bevirimat	0.01799 \pm 0.00402	>0.1

Por otra parte, el análisis de los datos obtenidos con el inhibidor de maduración bevirimat, demuestra que tiene valores de CI_{50} de maduración muy próximos a los CI_{50} de infección de MT-2, mostrando su efecto sobre la maduración y descartando otras dianas alternativas. Estos resultados se confirmaron, además, por la inhibición total de la replicación del VIH-1 mostrado para el derivado **T12** en los experimentos de infección de células MT-2, ya que una única diana post-transcripcional dejaría una ronda de transcripción del VIH-1 no-inhibido y, por ello, una ronda del gen de *renilla* transcrito.

Efecto sobre la proteasa: inhibición de la cepa VIH-1 resistente a nelfinavir

A continuación, se estudió el efecto de **T12**, **T38** y **T42** frente a una cepa de VIH-1, NL4.3-2169-Ren, resistente a nelfinavir, un inhibidor de proteasa usado en clínica¹¹².

Tabla 4.7 | Evaluación de la inhibición de la cepa VIH-1 resistente a nelfinavir (NL4.3-2169-Ren) y de la cepa salvaje recombinante (NL4.3-Ren).

	$CI_{50} \pm DE / \mu M$ NL4.3-Ren	$CI_{50} \pm DE / \mu M$ NL4.3-2169-Ren	factor de resistencia
T12	17.17 \pm 5.79	13.48 \pm 8.73	0.79
T38	16.29 \pm 4.04	12.78 \pm 1.76	0.78
T42	22.84 \pm 1.01	42.13 \pm 6.19	1.84
Nelfinavir	4.46 \pm 1.37	7.56 \pm 2.71	1.70

Los resultados (Tabla 4.7) indicaron que la actividad inhibidora de los compuestos **T12** y **T38** es similar en ambas cepas virales, con factores de resistencia con 0.79 y 0.78, respectivamente. Comentar que en este ensayo se confirmó los resultados anteriores en los cuales el derivado **T38** resultó ser un inhibidor de la transcripción del VIH-1 y, por ello, su actividad no se debería ver afectada por una mutación en proteasa. Asimismo, el compuesto **T12**, ya que se supone que su diana podría ser sobre la proteasa pero con un sitio de unión diferente al nelfinavir, o bien su actividad inhibidora se debe a un comportamiento similar al bevirimat, actuando a nivel de la maduración del virus. Por otra parte, el compuesto **T42** mostró un valor de CI_{50} mayor en la cepa VIH-1 resistente que en la salvaje, lo que sugiere susceptibilidad a las mutaciones de la proteasa que le confieren resistencia al nelfinavir.

¹¹² CHOW, W. A., JIANG, C., GUAN, M. (2009). Anti-HIV drugs for cancer therapeutics: back to the future? *Lancet Oncol.* 10(1), 61–71.

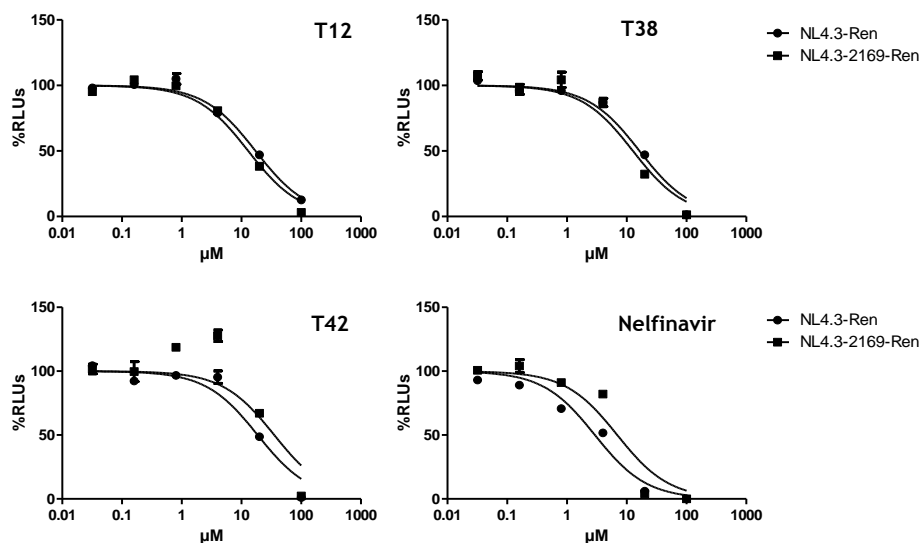


Fig. 4.42 | El efecto de TPLs como inhibidor de la infección de células MT-2 en VIH-1 tipo salvaje recombinante (NL4.3-Ren) en comparación con el virus salvaje recombinante NL4.3-Ren resistente al inhibidor de proteasa nelfinavir. Los resultados se expresan en μM . Los CI_{50} se determinaron con el programa informático *GraphPad Prism*.

Efecto de los TPLs sobre el procesamiento de la proteína p24

El genoma del VIH-1 codifica la poliproteína p55 (Gag) que incluye todos los elementos necesarios para el ensamblaje del virus y, además, es capaz de formar partículas similares a virus *in vitro* en ausencia de otros factores celulares o virales. Durante la gemación del virus, situado en la membrana celular, la proteasa corta la proteína Gag en cinco posiciones diferentes generando las proteínas p17 (MA), p24 (CA), p7 (NC), p6 y los péptidos espaciadores SP1 y SP2, las cuales se reorganizan para formar viriones maduros e infecciosos^{70,100,113}.

La unión de Gag a la membrana citoplasmática está mediada por el ácido mirístico y su falta resulta en una reducción drástica de virus⁷⁰. El TPL bevirimat inhibe el paso del péptido precursor p25 (CA-SP1) a la proteína madura p24 (CA). El compuesto PF-46396, estructuralmente diferente a los TPLs, se ha reportado que actúa sobre la ruptura de CA—SP1 actuando de manera diferente al bevirimat¹⁰⁰.

¹¹³ WRIGHT, E. R.; SCHOOLER, J. B.; DING, H. J.; KIEFFER, C.; FILLMORE, C.; SUNDQUIST, W. I.; JENSEN, G. J. (2007). Electron cryotomography of immature HIV-1 virions reveals the structure of the CA and SP1 Gag shells. *Eur. Mol. Biol. Org. J.* 26(8), 2218–2226.

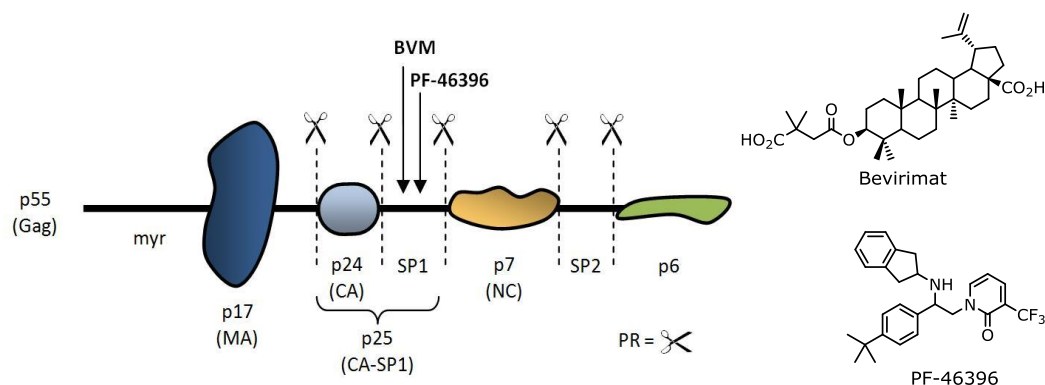


Fig. 4.43 | Estructura de la poliproteína p55 (Gag), incluyendo las proteínas p17 [matriz MA, miristoilada (myr) en el extremo *N*-terminal], p24 (cápside, CA), proteína p7 (nucleocápside, NC), p6 y los espaciadores SP1 y SP2. Las tijeras indican los sitios de acción de la proteasa viral (PR) en el procesamiento de Gag. Las flechas indican el sitio de acción de los inhibidores de maduración del VIH-1, bevirimat (BVM) y PF-46396.

Para determinar si nuestros TPLs inhiben el procesamiento de la proteína p55, se realizó un ensayo preliminar de transfección del VIH en presencia del compuesto **T12**. El *Western Blot* fue realizado usando el anticuerpo anti-p24, que permite detectar la proteína p24 (CA) y su precursor p25 (CA-SP1) en presencia de tres concentraciones (3, 20 y 40 μM) de **T12**. Como controles se utilizaron bevirimat (0.1 μM) y nelfinavir (0.1 μM).

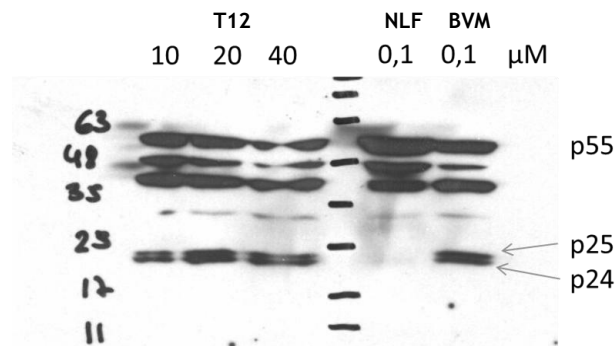


Fig. 4.44 | Western Blot del procesamiento de la poliproteína Gag del efecto de T12. El anticuerpo anti-p24 permite detectar a la proteína p24 (CA) y su precursor p25 (CA-SP1). Se observa la presencia de ambas proteínas a todas las concentraciones de **T12** y bevirimat, mientras que nelfinavir dio negativo para las mismas.

El análisis de los resultados (Fig. 4.44), aunque preliminares, demuestra que en presencia del compuesto **T12**, a todas las concentraciones, se detecta la proteína p24, así como su precursor p25. Si el compuesto actuara inhibiendo la proteasa, no se detectaría la proteína p24 ni su precursor p25. Por lo tanto, la presencia del precursor p25 sugiere

que **T12** presenta un patrón de inhibición semejante al bevirimat actuando sobre la maduración sin inhibir la proteasa como es el caso del nelfinavir.

Conclusiones

La evaluación de una serie de 26 TPLs naturales (**T1–T26**) y 22 análogos (**T27–T48**) como potenciales agentes anti-VIH nos permitió obtener las conclusiones que se comentan a continuación:

- En la evaluación de la actividad inhibidora del ciclo de replicación del VIH-1, 16 compuestos mostraron un porcentaje de replicación menor del 50% (**T1–T3, T7, T10–T12, T15, T17, T22, T23, T26, T38, T39, T42 y T43**).
- El análisis de la citotoxicidad (CC_{50}) y el correspondiente índice de selectividad (IS) de los 16 TPLs seleccionados, fue aceptable para **T10, T12, T38**, moderada para **T12** y baja para el resto de los compuestos. El compuesto **T7**, aunque muy potente, mostró una citotoxicidad elevada.
- Comparación de los valores del IC_{50} frente a VIH-1 y VSV-Luc indica que los compuestos **T23, T38, T39 y T42** presentan una cierta selectividad frente a VSV-Luc, y, por consiguiente, efecto sobre la entrada del virus, aunque sus valores indican que ésta no debe ser su diana principal.
- Los ensayos de la inhibición transcripción del VIH-1 indica que es la diana principal del compuesto **T42**, mientras que **T38** mostró un reducido efecto sobre la transcripción viral y **T12** debe actuar sobre otra diana.
- Los TPLs **T12, T38 y T42** no actúan sobre el gen indicador *luc* y sus productos y, por lo tanto, actúan directamente sobre el virus.
- La evaluación de frente a una cepa resistente a nelfinavir, inhibidor de la proteasa, indicaron que **T38**, actúa como inhibidor de la transcripción del VIH-1, **T12** podría tener una diana diferente a nelfinavir en la maduración del virus, el compuesto **T42** no actúa a nivel de la maduración.
- La evaluación del efecto de **T12** sobre el procesamiento de Gag indica que inhibe la ruptura de CA—SP1 y así, es posible que actúa sobre la proteína SP1 en un mecanismo parecido a bevirimat o PF-46396.

En resumen, la transcripción (**T42**) y maduración (**T12**), aparentemente, están implicados en el mecanismo de acción de los TPLs más activos, mientras que **T38** presenta un perfil polifarmacológico afectando, en cierto grado, la entrada y la transcripción del VIH-1 sin afectar a la maduración

4.4.3 | Estudio de relación estructura-actividad

A fin de profundizar en las características moleculares responsables de la actividad antiretroviral de esta serie de TPLs, analizamos la influencia de los sustituyentes y la regiosustitución en el esqueleto triterpénico sobre la inhibición de la replicación del VIH-1 a una concentración de 10 μ M (Tabla 4.). Así, un cuidadoso análisis de la relación estructura-actividad nos permitió obtener las conclusiones que se describen a continuación.

- Se observa que los compuestos con dos posiciones oxigenadas experimentan un incremento de la actividad al compararla con la del correspondiente análogo mono-oxigenado (**T17**, **T22**, **T24** y **T25** vs. **T16** o **T15** vs. **T14**).
- Sin embargo, la introducción de un tercer grado de oxidación en el esqueleto conlleva una pérdida en la actividad (**T7**, **T8**, **T11**, **T12**, y **T13** vs. **T2**, **T1**, **T5** y **T6**).
- Por otra parte, al sustituir un grupo hidroxilo en la posición C-3 o C-28 por un grupo carbonilo (cetona o aldehído) se incrementa la actividad [**T27** (86% URL) vs. **T39** (31% URL) o **T24** (64% URL) vs **T38** (26% URL)], lo que sugiere que esta funcionalidad puede actuar como aceptor de enlaces de hidrógeno con el receptor.
- Centrándonos en el grupo carbonilo, examinamos el efecto de los derivados acilados, comparando la actividad de los monoésteres (**T19** vs. **T16**; **T20** vs. **T24**; **T43** vs. **T8**; **T46** vs. **T13** y **T27–T32** vs. **T24**) y diésteres (**T44** vs. **T18**, **T34–T36** vs. **T24**) con sus correspondientes precursores, concluyendo que la esterificación no mejora la actividad en esta serie de TPLs.
- De igual forma, la sustitución del grupo hidroxilo C-28 por un grupo tosilo (**T33**) o sililo (**T37**) en términos de propiedades electrónicas y estéricas no produce cambios significativos en la actividad con respecto al producto de partida, la betulina (**T24**).
- Tampoco fue posible sacar conclusiones en cuanto al efecto de la estereoquímica relativa del grupo hidroxilo en C-3 sobre la potencia (**T11** vs. **T25**; **T21** vs. **T22**; **T23** vs. **T24**), lo que nos sugiere que la relevancia de la estereoquímica en la actividad está fuertemente condicionada por el resto de los motivos estructurales sobre el esqueleto del TPLs.

- La importancia de la cadena en C-19 fue evidente, ya que cambios en este dominio generó análogos más potentes. Así, los compuestos **T7** > **T3** > **T8** son más potentes que **T9**, lo que sugiere que aquellos compuestos cuyo metilo C-30 se encuentra oxidado presentan un incremento significativo de la potencia.
- En línea con estos resultados, reemplazamos el doble enlace $\Delta^{20(29)}$ del derivado **T27** por funciones oxigenadas, rindiendo los análogos **T40** y **T41**, ligeramente más potentes que su precursor **T27**. Además, la relevancia del grupo aldehído quedó patente al observar la presencia de dicho grupo funcional sobre C-30 en los compuestos más activos de esta serie, **T2**, **T7** y **T42**, sugiriendo que este podría presentar interacciones de tipo aceptor de enlaces de hidrógeno con el receptor o aceptor de Michael. Nuestros resultados por otra parte, son coincidentes con trabajos previos de otros grupos que reportan la relevancia del grupo formilo α,β -insaturado para la actividad anti-VIH¹¹⁴.
- Por otra parte, los derivados halogenados, bien con bromo en el anillo A (**T45**) o cloro en la posición C-30 (**T47**), o bien aquellos derivados con doble enlace Δ^1 (**T14** y **T48**), no presentaron cambios significativos en la actividad con respecto a sus correspondientes precursores.
- La regiosustitución sobre el esqueleto triterpénico de lupano parece ser un elemento importante en la actividad, ya que los regioisómeros mostraron diferente grado de actividad. Así, la comparación de análogos con dos grupos hidroxilos, uno en C-3 y el otro sobre C-25 (**T17**), C-11 (**T22**), C-1 (**T25**) o C-28 (**T24**), reveló que la contribución de las posiciones C-11 y C-25 es mayor que C-1 y C-28.

En conclusión, nuestros resultados muestran que la funcionalización de otras posiciones del esqueleto de los TPLs es una estrategia para mejorar el perfil farmacológico. Así, el grado de oxidación de la molécula, el patrón de regiosustitución y el tipo de grupo funcional son elementos fundamentales para la actividad anti-VIH de esta nueva serie de triterpenos con esqueleto de lupano.

¹¹⁴ GUTIÉRREZ-NICOLÁS, F.; GORDILLO-ROMÁN, B.; OBERTI, J. C.; ESTÉVEZ-BRAUN, A.; RAVELO, A. G.; JOSEPH-NATHAN, P. (2012). Synthesis and anti-HIV Activity of lupane and olean-18-ene derivatives. Absolute configuration of 19,20-epoxylupanes by VCD. *J. Nat. Prod.*, 75, 669–676.

V

Capítulo

TÉCNICAS EXPERIMENTALES

TÉCNICAS EXPERIMENTALES



5 TÉCNICAS EXPERIMENTALES

TÉCNICAS FÍSICAS, ESPECTROMÉTRICOS Y ESPECTROSCÓPICOS

Rotación óptica

Para las determinaciones de la actividad óptica se empleó un polarímetro Perkin-Elmer, modelo 241, a la temperatura empleada y usando la línea D del sodio ($\lambda = 589 \text{ nm}$). Los compuestos fueron disueltos en cloroformo seco y se empleó una celda de 1 mL de volumen, paso de luz 10 cm. La concentración (c) se expresa en gramos por 100 mL de disolución.

Espectroscopía ultravioleta (UV)

Los espectros UV-visible fueron registrados en un espectrofotómetro Jasco V-560. El producto se disolvió en etanol puro y se colocó en una celda de cuarzo de 1 ml de volumen y con un paso de luz de 10 mm. Los valores de longitud de onda de absorción (λ) se expresan en nm.

Espectroscopía infrarroja (IR)

Los espectros de IR fueron registrados en un espectrofotómetro FT-IR Bruker, modelo IFS 55, utilizando disoluciones de los compuestos en cloroformo seco sobre una pastilla de cloruro de sodio (NaCl). Los valores de ν se expresan en cm^{-1} .

Resonancia magnética nuclear (RMN)

Los espectros de RMN se realizaron en los espectrofotómetros Bruker Avance 400 (400 MHz para ^1H y 100 MHz para ^{13}C), Bruker Avance 500 (500 MHz para ^1H y 125 MHz para ^{13}C) con una sonda BBO ($\text{BB-}^1\text{H}/\text{D}$ con z-gradiente), y/o Bruker Avance 600 (600 MHz para ^1H y 150 MHz para ^{13}C) equipado con una criosonda de detección TCI de 5 mm (CPTCI, $^1\text{H-}^{13}\text{C}/^{15}\text{N}/\text{D}$ con z-gradiente). Los productos fueron disueltos CDCl_3 (δ_{H} 7.26, δ_{C} 77.0), usando tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los valores de desplazamiento químico (δ) se expresan en ppm y las constantes de acoplamiento (J) en Hz. Los experimentos se llevaron a cabo a 300 K.

Se utilizaron los programas y secuencias de pulsos de ^1H , ^{13}C , DEPT, COSY, NOESY, ROESY, TOCSY, HSQC y HMBC suministrados por la casa Bruker. Todos los experimentos

fueron adquiridos en modo sensible a la fase y selección de coherencia por gradientes a campo. En la dimensión de adquisición de ^1H (F2), se usó una ventana espectral de 4800 Hz, mientras que, para la dimensión F1 (^{13}C) se utilizaron valores de 25000 Hz para el experimento HSQC y de 34700 Hz para el HMBC. En el experimento HMBC, además, se fijó un valor de 10 Hz para $^{2,3}J_{\text{C,H}}$ y se utilizó un tiempo de adquisición de 0.170 s en F2. El número de incrementos en F1 osciló entre 256 y 512 puntos, y se emplearon tiempos de relajación de 1.5 s. Antes de la transformación de Fourier, se realizó un llenado de ceros para expandir los datos hasta el doble de los puntos adquiridos. Los experimentos TOCSY fueron adquiridos con un tiempo de mezcla isotrópico de 60 ms utilizando DIPSI con un ancho de banda de 10 kHz. El procesamiento y el análisis de los espectros de RMN, se efectuaron utilizando el programa TopSpin™ versión 2.1 y 3.2 de Bruker.

En los experimentos de RMN de ^1H , la multiplicidad de las señales se indica por las abreviaturas correspondientes a singulete (s), doblete (d), triplete (t), cuarteto (c) y multiplete (m), así como el subíndice A en los casos que la relajación de los núcleos resultó en un desanchamiento de la correspondiente señal. En los experimentos de RMN ^{13}C se utilizaron las abreviaturas para indicar la multiplicidad de los carbonos metílicos (c), metilénicos (t), metínicos (d) y cuaternarios (s).

Ultrasonido

Para llevar a cabo las reacciones haciendo uso de ultrasonido, se utilizó un ultrasonificador de la casa Selecta, modelo Ultrasons 50/60 Hz.

Espectrometría de masas de baja y alta resolución (EM y EMAR)

Los espectros de masas de baja resolución, así como la determinación de las fórmulas moleculares, de fragmentos y/o iones moleculares, se llevaron a cabo en espectrómetros Fisons Instruments VG Autospec (sector magnético) y LCT Premier XE Micromass Electrospray spectrometer. Los métodos de ionización empleados son impacto electrónico (IE, potencial de ionización 70 eV) y electrospray (ESI modo positivo).

MODELIZACIÓN MOLECULAR Y CÁLCULOS TEÓRICOS

Para realizar la modelización molecular y los cálculos de los descriptores moleculares, se utilizó el PC Model 9.200 (Serena Software), y Gaussian 03W, versión 5.0 de Gaussian, Inc. Para la visualización, se utilizaron los programas BALLView (BALL - Biochemical Algorithms Library 1.3), versión 4.1.0, y Maestro 9.2 (Schrödinger Software Modules), así como ChemBio3D, versión 13.0, y ChemBioDraw Ultra, versión 13.0, ambos de PerkinElmer, CambridgeSoft.

TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

Cromatografía en capa fina (CCF)

Las cromatografías en capa fina, con fines analíticos y preparativos, se realizan sobre cromatofolios (20 × 20 cm) de gel de sílice tipo G de 0.25 mm de espesor, con indicador de fluorescencia a 254 nm, de la empresa Macherey-Nagel Sil G/UV₂₅₄ con soportes de plástico y de aluminio. La detección de los productos sobre las placas se realiza por fluorescencia con luz ultravioleta a 254 y/o 360 nm, o bien pulverizando óleum (disolución de H₂O–H₂SO₄–AcOH, 4:1:20) y posterior calentamiento a 120 °C. Por otra parte, con fines preparativos, se utilizan placas (20 × 20 cm) de 1 mm de espesor de gel de sílice tipo G, con indicador de fluorescencia a 254 nm, de la empresa Macherey-Nagel SIL G-100 UV₂₅₄. La cantidad de muestra a sembrar en estas placas es de unos 40 mg, usándose para la elusión diferentes mezclas de disolventes. La detección de los productos sobre las placas se realiza por fluorescencia con luz ultravioleta a 254 y/o 360 nm, o bien pulverizando óleum sobre el borde, después de proteger convenientemente el resto de la placa con una lámina de vidrio, y posterior calentamiento de la zona tratada con una pistola de calor.

Cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC)

Se utilizan placas (10 × 10 cm) de 1 mm de espesor de gel de sílice de 60, con indicador de fluorescencia a 254 nm, de la empresa Macherey-Nagel NANO-SIL 20 UV₂₅₄. La resolución de estas placas es mayor que las anteriores y la cantidad a sembrar es entorno a 10 mg, usándose para la elusión diferentes mezclas de disolventes. La detección de los productos sobre las placas se realiza por fluorescencia con luz ultravioleta a 254 y/o 360 nm, o bien pulverizando oleum sobre el borde, después de proteger convenientemente el resto de la placa con una lámina de vidrio, y posterior calentamiento de la zona tratada con una pistola de calor.

Cromatografía en columna (CC)

En la realización de columnas cromatográficas (secas y húmedas) se emplea gel de sílice fina de 0.063–0.200 mm de diámetro, de la empresa Macherey-Nagel. La gel de sílice se suspende en el eluyente y se compacta con una bomba de vacío. La muestra se puede aplicar disuelta o adsorbida en gel de sílice de 0.2–0.5 mm de diámetro.

Cromatografía en capa fina circular preparativa (CCRP)

En la separación de mezclas de metabolitos con R_f próximos, se utilizó un equipo Chromatotron, modelo 7924T, 24VDC, 0.5 A, el cual separa en función de la elución de la fase móvil accionada por la fuerza centrífuga. Para muestras entre 50–150 mg se usaron

placas circulares de 1 mm de espesor y para muestras 150–300 mg se usaron placas circulares de 2 mm de espesor. Se usó gel de sílice Merck 60 PF 254 con yeso para las placas circulares.

Cromatografía de exclusión molecular (CEM)

Se utilizó como fase estacionaria la resina lipofílica Sephadex LH-20 (25–100 μm), de Sigma–Aldrich Co. Las columnas fueron preparadas humectando la resina en metanol durante 12 h, siguiendo las instrucciones del fabricante, y empaquetadas por gravedad con la elución mínima de tres volúmenes muertos de metanol antes de cada cambio de fase móvil. El eluyente que en general se utiliza es *n*-hexano–cloroformo–metanol (2:1:1). La muestra a cromatografiar tras ser filtrada se coloca en la cabeza de la columna disuelta en una cantidad de eluyente no superior al 5% del volumen muerto de la columna. La columna puede ser reutilizada tras ser lavada con metanol y estabilizada con el eluyente que se va utilizar.

Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

Para la cromatografía líquida de alta resolución se usa un equipo Varian, que consta de dos bombas de flujo variable, proStar 210 y prepStar 218 (HPLC Solvent Delivery Module), un detector UV-Visible ProStar 335 (Photodiode Array Detector) con rango de longitud de onda 190–950 nm, una columna analítica Ascetis[®]Si (25 cm \times 4.6 mm, 5 μm) y una semipreparativa Ascetis[™]Si (25 cm \times 21.2 mm, 10 μm). El sistema isocrático de disolventes utilizado fue una mezcla de *n*-hexano–acetato de etilo en diferentes proporciones y a diferentes velocidades de flujo, según necesidad de resolución. El software controlador de flujos y longitud de ondas fue el suministrado por Varian Inc.

VI

Capítulo

CONCLUSIONES

DE ESTE TRABAJO DE
INVESTIGACIÓN

TRITERPENOS PENTACÍCLICOS



6 CONCLUSIONES DE ESTA MEMORIA DE TESIS DOCTORAL

El trabajo de investigación llevado a cabo durante la realización de esta Tesis Doctoral abarca el estudio fitoquímico de las hojas de *Celastrus vulcanicola* (Celastraceae), preparación de una quimioteca y evaluación biológica de los productos naturales y derivados obtenidos. De dicha investigación podemos extraer las siguientes conclusiones:

- El estudio fitoquímico de las hojas de *Celastrus vulcanicola* concluye con el aislamiento de 32 sesquiterpenos con esqueleto de dihidro- β -agarofurano, 16 de los cuales se describen por primera vez en la bibliografía química.
- Se determina la estructura de los 16 sesquiterpenos nuevos mediante el estudio sus datos físicos, espectrométricos y espectroscópicos, y su configuración absoluta se establece mediante dicroísmo circular o consideraciones biogénicas.
- Se sintetiza una quimioteca de 82 derivados sesquiterpénicos con esqueleto de dihidro- β -agarofurano, usando como material de partida los productos (1*S*,4*S*,5*S*,6*R*,7*S*,8*S*,9*R*,10*S*)-1-acetiloxi-9-benzoiloxi-8-cinamoiloxi-4,6-dihidroxi-dihydro- β -agarofurano (**A17**) y (1*S*,4*S*,5*S*,6*R*,7*R*,8*S*,9*R*,10*S*)-1,6-diacetiloxi-9-benzoiloxi-8-cinamoiloxi-4-hidroxi-dihydro- β -agarofurano (**A18**), metabolitos mayoritarios de la planta.
- Se evalúan 16 sesquiterpenos naturales y 78 análogos, como inhibidores de la P-glicoproteína humana (Pgp), en células tumorales transfectadas NIH-3T3, mediante citometría de flujo. Los resultados indican que estos sesquiterpenos presentan una potente actividad quimiomoduladora, siendo 15 naturales y 64 derivados más potentes (> 63%) que el conocido revertidor verapamilo, usado como control.
- Se determina la constante de inhibición (K_i), toxicidad (CC_{50}) e índice de reversión (I.R.) frente a daunomicina (DNM) y vinblastina (VNB) de los 29 sesquiterpenos más activos (6 naturales y 23 análogos), usando como criterio aquellos compuestos con un porcentaje de inhibición superior al 75%. El

producto natural **A18** y los derivados 6-metilbutirato de **A17 (6a)**, 6-mesilato de **A17 (34a)** y 4-morfolinilacetato de **A18 (63a)** resultaron los más potentes, con I.R. mayor que el control positivo a todas las concentraciones ensayadas en ambos fármacos.

- Se describe la preparación y elucidación estructural de 22 derivados triterpénicos con esqueleto de lupano a partir de la betulina.
- Se evalúa la actividad antiviral de 26 triterpenos naturales y 22 derivados como inhibidores de la replicación del Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH). Se determina el mecanismo de acción de los compuestos más activos, los compuestos 28-acetiloxi-3 β -hidroxi-lup-20(29)-en-30-al (**T42**) y 28-hidroxi-3-oxo-lup-20(29)-eno (betulona, **T12**) están implicados en la transcripción y la maduración, respectivamente, mientras que el producto 3-oxo-lup-20(29)-en-28-al (betulonal, **T38**) presenta un perfil polifarmacológico actuando a nivel de la entrada y la transcripción del VIH-1 sin afectar la maduración.
- Los estudios de relación estructura-actividad permiten establecer que el grado de oxidación, el patrón de regiosustitución y el tipo de grupo funcional son los rasgos estructurales que contribuyen a la inhibición de la MDR a fármacos en cáncer y replicación del VIH de los sesquiterpenos con esqueleto de dihidro- β -agarofurano y triterpenos con esqueleto de lupano, respectivamente.
- Los excelentes resultados obtenidos revelan que los sesquiterpenos con esqueleto de dihidro- β -agarofurano y los triterpenos de la serie del lupano se perfilan como candidatos para posteriores estudios, dirigidos a explorar su potencial como agentes terapéuticos en el tratamiento del cáncer y SIDA, respectivamente.