

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Productos bioactivos de origen marino

Autor: Pérez Manríquez, Claudia Isabel

**Directores: José Javier Fernández Castro
y María Luisa Souto Suárez**

Departamento de Química Orgánica

JOSÉ JAVIER FERNÁNDEZ CASTRO, PROFESOR TITULAR DE QUÍMICA ORGÁNICA DE LA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA Y MARÍA LUISA SOUTO SUÁREZ, INVESTIGADORA ADSCRITA AL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA

CERTIFICAN: Que el presente trabajo titulado “PRODUCTOS BIOACTIVOS DE ORIGEN MARINO” ha sido realizado bajo nuestra dirección en los laboratorios del Instituto Universitario de Bio-Organica, "Antonio González", durante los cursos académicos de 1997-1998, 1998-1999, 1999-2000, 2000-2001, constituyendo la Memoria que presenta Dña. Claudia Isabel Pérez Manríquez para optar al grado de Doctor en Químicas.

AUTORIZAN: La lectura de esta Memoria por considerar que reúne los requisitos de calidad necesarios para la presentación de la misma.

La Laguna, 14 de Junio de 2001.

Fdo. José Javier Fernández Castro

Fdo. María L. Souto Suárez

Los trabajos que constituyen la presente Memoria fueron realizados en el Instituto Universitario de Bio-Orgánica "Antonio González", bajo la dirección de los Dres. José J. Fernández Castro y María L. Souto Suárez a quienes expreso mi sincero agradecimiento por su ayuda en la realización de esta tesis doctoral.

AGRADECIMIENTOS

A D. Manuel Norte por permitir mi incorporación al grupo de trabajo que él dirige, por su amistad y apoyo constante.

A D. Miguel Zárraga Olavarría, porque sin su motivación no estaría aquí, por su amistad.

A D. José Adrián Gavín Sazatornil, por la realización de parte de la espectroscopía que aparece en esta tesis, por brindarme su sincera amistad y su constante motivación a conocer un poco más el mundo de la espectroscopía de RMN.

A D. Antonio M. Hernández Daranas, por su apoyo y orientación a la hora de enfrentarme con la química de productos naturales marinos y las dificultades que este trabajo conlleva en el laboratorio.

A D. Matías López Rodríguez y D. Pedro Núñez C., por iniciarme en el conocimiento de la cristalografía de rayos $-X$.

A Dña. Martina K. Pec de la Unidad de Investigación del Hospital de La Candelaria por los ensayos de citotoxicidad y D. Francisco Leiva de ANFACO-CECOPESCA por la colaboración en la realización de los ensayos de inhibición enzimática con proteínas fosfatasa.

A Dña. M. C. Gil Rodríguez del Departamento de Botánica de la Universidad de La Laguna por la ayuda en la selección de los especímenes de *Laurencia viridis*.

A D. Cirilo Pérez Pérez por su paciencia, buen humor y apoyo.

A mis amigas y amigos Blanca R. Suárez Gómez, Patricia G. Cruz López, Héctor Carrasco Altamirano, Laura Vásquez Gil, Camilla Bonzano, Andreas Kubo, Alva Alenguer, Miguel Ponce “Poyi” y Gwendal Le Floch por su calidad humana y porque saben disfrutar de la vida, todos ustedes forman parte de los mejores momentos vividos dentro y fuera del laboratorio de marinos, les llevo en mi corazón.

A mis compañeros, Jorge, Littman, Marvín y Francisco, al personal administrativo del IUBO, por esa palabra de ánimo y hacer que mi estancia fuese más grata.

A la Agencia Española de Cooperación Iberoamericana (AECI) por la beca de doctorado que permitió la realización de esta tesis doctoral.

Los trabajos de la presente memoria han sido financiados con fondos correspondientes a los proyectos MAR-98-0978 y 1FD97-0747-C04-01.

*En especial a Luis y Elena
mis padres, Yasna, Luis y Carina mis
hermanos por todo su cariño.*

*A todos mis amigos chilenos,
por su apoyo constante.*

*Porque sin todos ustedes
nada de esto sería posible.*

ÍNDICE

I.- POLIÉTERES DE ORIGEN MARINO DERIVADOS DEL ESCUALENO	
I.1.- INTRODUCCIÓN	1
I.2.- POLIÉTERES TRITERPÉNICOS DE ALGAS	2
I.2.1.- Aislamiento y determinación estructural	2
I.2.1.1.- <i>Compuestos que poseen un sistema de anillo dioxabicyclo[4.4.0]decano</i>	3
I.2.1.2.- <i>Compuestos que poseen un sistema de anillo dioxabicyclo[5.4.0]undecano</i>	10
I.2.1.3.- <i>Compuestos simétricos</i>	11
I.2.2.- Consideraciones biogénicas	13
I.2.3.- Actividad biológica	16
I.3.- POLIÉTERES TRITERPÉNICOS DE ESPONJAS	20
I.3.1.- Aislamiento y determinación estructural	20
I.3.1.1.- <i>Compuestos con un puente etileno</i>	21
I.3.1.2.- <i>Compuestos con un puente modificado o reagrupado</i>	29
I.3.1.3.- <i>Compuestos con un puente butileno</i>	31
I.3.2.- Consideraciones biogénicas	33

II.-	NUEVOS POLIÉTERES TRITERPÉNICOS DE <i>LAURENCIA VIRIDIS</i>	
II.1.-	INTRODUCCIÓN	39
II.2.-	AISLAMIENTO	40
II.3.-	ESTUDIO DE ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL	42
II.3.1.-	Martiriol <u>67</u>	42
II.3.2.-	Dioxepandehidrotirsiferol <u>68</u>	47
II.3.3.-	Clavidol <u>69</u>	69
II.3.4.-	Pseudodehidrotirsiferol <u>70</u>	56
II.3.5.-	3-Metoxi-pseudodehidrotirsiferol <u>71</u>	61
II.3.6.-	2-Metoxi-pseudodehidrotirsiferol <u>72</u>	65
II.3.7.-	Lactodehidrotirsiferol <u>73</u>	69
II.3.8.-	16-<i>epi</i>-Hidroxidehidrotirsiferol <u>74</u>	74
II.3.9.-	3-<i>epi</i>-Dehidrotirsiferol <u>75</u>	77
II.3.10.-	Peróxido de longileno <u>76</u>	81
II.3.11.-	Longileno <u>77</u>	87
III.-	ORIGEN BIOGENÉTICO DE LOS NUEVOS METABOLITOS	
III.1.-	INTRODUCCIÓN	91
III.2.-	PROPUESTAS BIOGENÉTICAS	92
III.2.1.-	Martiriol <u>67</u> y dioxepandehidrotirsiferol <u>68</u>	92
III.2.2.-	Compuestos con el anillo A de cinco miembros <u>70-73</u>	94
III.2.3.-	Clavidol <u>69</u>	98

III.2.4.-	Peróxido de longileno <u>76</u> y longileno <u>77</u>	99
IV.-	ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE POLIÉTERES DE <i>L. VIRIDIS</i>	
IV.1.-	ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE PROTEÍNA FOSFATASA PP2A	101
IV.1.1.-	Introducción	101
IV.1.2.-	Tipos de inhibidores de proteínas fosfatasas	102
IV.1.2.1.-	<i>Péptidos cíclicos</i>	103
IV.1.2.2.-	<i>Policétidos</i>	105
IV.1.2.3.-		106
IV.1.3.-	Estudio preliminar sobre la inhibición de proteína fosfatasa tipo 2A por poliéteres de <i>Laurencia viridis</i>	107
IV.2.-	ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD	115
V.-	PARTE EXPERIMENTAL	
V.1.-	TÉCNICAS EXPERIMENTALES GENERALES	119
V.2.-	RECOLECCIÓN Y EXTRACCIÓN DEL ALGA <i>LAURENCIA VIRIDIS</i>	121
V.3.-	MARCHA CROMATOGRÁFICA DEL EXTRACTO	122
V.4.-	ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE PP2A	137
V.4.1.-	Preparación de las disoluciones de las muestras de poliéteres	137
V.4.2.-	Ensayos de inhibición de fosfatasa	137

V.5.-	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA	156
V.5.1.-	Cultivos celulares	156
V.5.2.-	Ensayos de proliferación celular	156
V.5.3.-	Inhibición del crecimiento celular	156

CONCLUSIONES

I. POLIÉTERES DE ORIGEN MARINO DERIVADOS DEL ESCUALENO

I.1. INTRODUCCIÓN

En los últimos treinta años, con los avances tecnológicos, la investigación de compuestos bioactivos a partir de plantas y microorganismos terrestres se ha visto equiparada por aquella que encuentra en el mar una fuente inagotable de metabolitos con una gran diversidad estructural sumada a una potente actividad farmacológica. Esto ha llevado a que la investigación en el campo de los productos naturales de origen marino se haya convertido en un área de estudio prioritaria.

Uno de los grupos más interesantes es el formado por los compuestos de naturaleza polietérea, los cuales, desde el punto de vista estructural, presentan una gran diversidad en el tamaño de los anillos, y desde el punto de vista biológico, exhiben potentes actividades. Sus orígenes biogénéticos se encuentran en los ácidos grasos o como derivados del escualeno los de naturaleza terpénica. Esta revisión bibliográfica está dedicada a este segundo grupo, y pretende ofrecer una visión general sobre su aislamiento y determinación estructural, explicar a grandes rasgos las síntesis químicas realizadas, y resumir la investigación acerca de sus actividades biológicas. Estos metabolitos han sido identificados en algas rojas del género *Laurencia* y en esponjas principalmente de la familia *Axinellidae*.¹ Todos los poliéteres triterpénicos conocidos hasta el momento aislados de algas o esponjas, son poliéteres derivados del escualeno que en la mayoría de los casos están formados por dos sistemas de anillos separados, los cuales dan lugar a series características de compuestos.

El presente capítulo está por tanto estructurado en dos partes para poder relacionar debidamente las estructuras químicas en cada grupo, la primera dedicada a los poliéteres aislados de algas y la segunda a los aislados a partir de esponjas.

I.2. POLIÉTERES TRITERPÉNICOS DE ALGAS

I.2.1. Aislamiento y determinación estructural

Las algas rojas del género *Laurencia* (*Rhodomelaceae*) son conocidas por producir interesantes metabolitos secundarios. Este interés está justificado por el elevado número y variedad de los esqueletos encontrados. Sin duda, esta diversidad es consecuencia de una de sus principales características, la naturaleza halogenada de estas sustancias, que le permite sufrir fácilmente procesos intramoleculares que alteran sus estructuras.

Los metabolitos secundarios característicos de *Laurencia* pueden dividirse en dos grupos de acuerdo a su origen biogenético: no terpénicos y terpénicos.^{2,3,4} El primer gran grupo de metabolitos aislados de esta alga está formado por las acetogeninas C-15 no terpénicas derivadas del metabolismo de los ácidos grasos. En el grupo de los terpenos, los sesquiterpenos son los más abundantes habiéndose encontrado en gran número y diversidad estructural, mientras, el número de ejemplos de diterpenos y triterpenos es sensiblemente menor.

Los triterpenos polioxigenados aislados de *Laurencia* pueden clasificarse, de acuerdo con sus características estructurales, en tres grandes grupos:

- Compuestos que poseen un sistema de anillos dioxabicyclo[4.4.0]decano
- Compuestos que poseen un sistema de anillos dioxabicyclo[5.4.0]undecano
- Compuestos con elementos de simetría

¹ J. J. Fernández, M. L. Souto y M. Norte, *Nat. Prod. Rep.*, **2000**, *17*, 135.

² R. E. Moore, Algal Nonisoprenoid, *Marine Natural Products, Chemical and Biological Perspectives, Vol.1*, ed. P. J. Scheuer, Academic Press, **1978**, p. 43.

³ J. D. Martín y J. Darias, Algal Sesquiterpenoid, *Marine Natural Products, Chemical and Biological Perspectives, Vol.1*, ed. P. J. Scheuer, Academic Press, **1978**, p. 125.

⁴ K. L. Erickson, Constituents of *Laurencia*, *Marine Natural Products, Chemical and Biological Perspectives, Vol. 5*, ed. P. J. Scheuer, Academic Press, **1983**, p. 13.

1.2.1.1. Compuestos que poseen un sistema de anillo dioxabicyclo[4.4.0]decano

El primer ejemplo de poliéter triterpénico de origen marino derivado del escualeno con un sistema dioxabicyclo[4.4.0]decano en los anillos B-C, fue aislado de la *Laurencia thyrifera* recolectada en Nueva Zelanda por Blunt y col. Para este metabolito altamente oxigenado, el tirsiferol, fue propuesta la estructura **1** mediante estudios de difracción de rayos X de su acetato **2**, aunque la configuración absoluta no fue definida.^{5,6} Se realizaron unos pocos ensayos biológicos con los extractos crudos de estos compuestos no presentando ningún tipo de inhibición de crecimiento frente a cultivos de microorganismos tales como *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus niger* y *Saccharomyces cerevisiae*.

El segundo ejemplo de esta serie, el dehidrotirsiferol **3** (DHT), fue identificado seis años después en especies de *L. pinnatifida* recolectada en las Islas Canarias.⁷ Su estructura, que presenta un doble enlace entre los carbonos C-15–C-28, fue confirmada en base a las correlaciones químicas que permitieron su transformación en tirsiferol **1**.

Un nuevo éter cíclico, el 23-acetato de tirsiferilo **4** (TA), fue aislado de *L. obtusa* recolectada en la Isla de Teuri, en Japón. Su estructura fue determinada mediante su correspondiente hidrólisis a tirsiferol **1**.⁸ Debido a que el extracto crudo presentó una potente actividad citotóxica (ED₅₀=1.8 µg/mL) frente a células de neoplasma linfóide de ratón P-388, el compuesto puro y los acetatos **2** y **5**, una vez aislados e identificados, fueron también evaluados. El compuesto **4** resultó ser el más potente, presentando un ED₅₀=0.3 ng/mL (Tabla 1).⁹

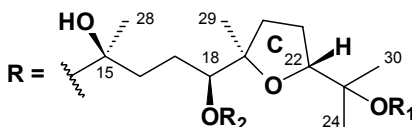
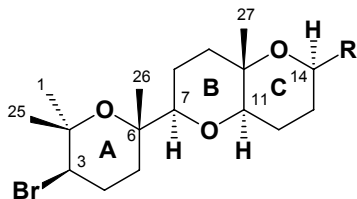
⁵ J. W. Blunt, T. J. Hartshorn, T. J. McLennan, M. H. G. Munro, W. T. Robinson y S. C. Yorke, *Tetrahedron Lett.*, **1978**, 69.

⁶ J. W. Blunt, J. D. McCombs, M. H. G. Munro y F. N. Thomas, *Magn. Reson. Chem.*, **1989**, 27, 792.

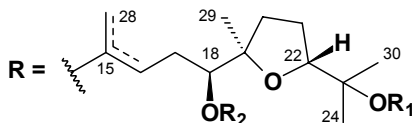
⁷ A. G. González, J. M. Arteaga, J. J. Fernández, J. D. Martín, M. Norte y J. Z. Ruano, *Tetrahedron*, **1984**, 14, 2751.

⁸ T. Susuki, M. Susuki, A. Furusaki, T. Matsumoto, A. Kato, Y. Imanaka y E. Kurosawa, *Tetrahedron Lett.*, **1985**, 26, 1329.

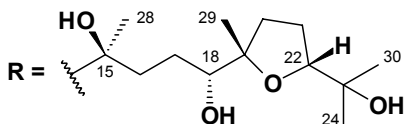
⁹ T. Susuki, M. Takeda, M. Susuki, E. Kurosawa, A. Furusaki, T. Matsumoto, Y. Imanaka y A. Kato, *28th Symposium on the Chemistry of Natural Products, Symposium Papers*, Sendai, **1986**, p. 215.



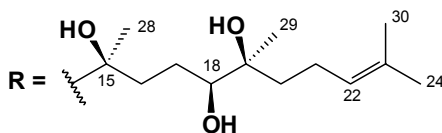
- 1 Tirsiferol $R_1=R_2=H$
2 18-Acetato de tirsiferilo $R_1=H; R_2=Ac$
4 23-Acetato de tirsiferilo $R_1=Ac; R_2=H$
5 23,18-Diacetato de tirsiferilo $R_1=R_2=Ac$



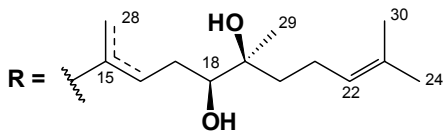
- 3 $\Delta^{15,28}$ Dehidrotirsiferol $R_1=R_2=H$
7 $\Delta^{15,28}$ 15-(28)-Diacetato de anhidrotirsiferilo $R_1=R_2=Ac$
8 $\Delta^{15,16}$ 15-Diacetato de anhidrotirsiferilo $R_1=R_2=Ac$



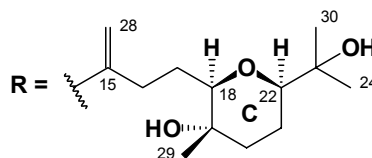
6 Venustatriol



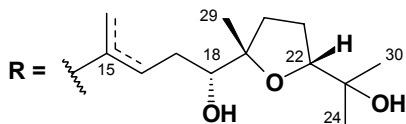
9 Magireol A



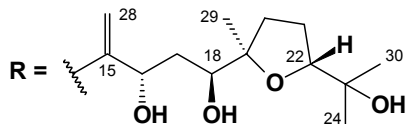
10 $\Delta^{15,28}$ Magireol B
11 $\Delta^{15,16}$ Magireol C



13 Isodehidrotirsiferol



17 $\Delta^{15,28}$ Dehidrovenustatriol
18 $\Delta^{15,16}$ 15, 16-Dehidrovenustatriol



20 16-Hidroxidehidrotirsiferol

El venustatriol **6** fue el siguiente compuesto descrito. Éste fue aislado de extractos de *L. venusta* que mostraban una importante actividad frente a los virus de la estomatitis vesicular (VSV) y herpes simple tipo 1 (HSV-1).¹⁰ Su estructura y la configuración absoluta de los diez centros quirales presentes en la molécula, fueron determinadas mediante estudios de difracción de rayos X, lo que permitió también la correcta asignación del tirsiferol **1**. Ambas moléculas presentan la misma configuración en los centros asimétricos 3*R*, 6*S*, 7*R*, 10*S*, 11*R*, 14*R* y 15*S*, y una disposición espacial de sillas en los anillos A y B, mientras que el anillo C se encuentra forzado a adoptar una conformación de bote para evitar la interacción desfavorable 1,3 diaxial entre los sustituyentes, caso de que adoptasen la correspondiente conformación de silla (Figura 1).

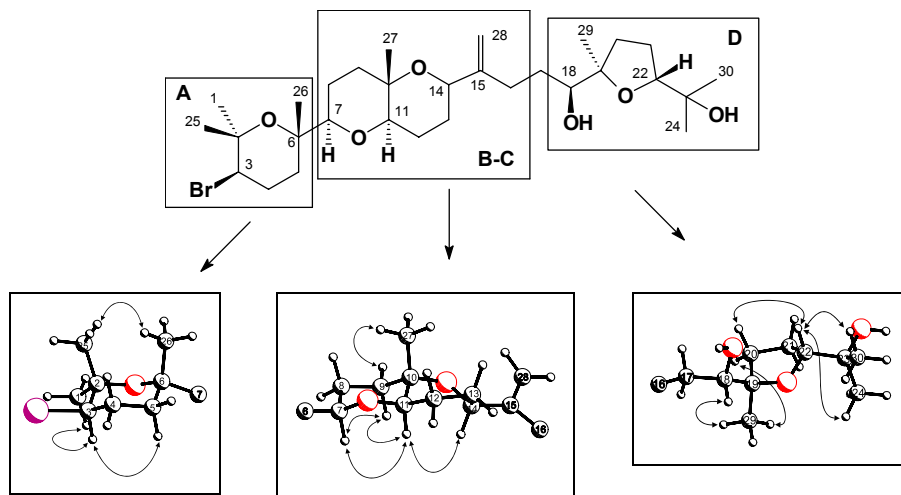


Figura 1.- Disposición espacial y correlaciones NOE más significativas del dehidrotirsiferol **3**, metabolito similar al venustatriol **6** en los anillos A, B y C.

¹⁰ S. Sakemi, T. Higa, C. W. Jefford y G. Bernardinelli, *Tetrahedron Lett.*, **1986**, 27, 4287.

La diferencia esencial entre ambos compuestos radica en la disposición de los sustituyentes del anillo tetrahidrofurano. La configuración de los carbonos C-18 y C-19 en el tirsiferol **1** resulta opuesta a la del venustatriol **6**, sin embargo, la correspondiente al carbono C-22 es idéntica, tal y como puede apreciarse en el Esquema 1, apartado I.2.2. de la presente memoria.

Llegados a este punto, debido al gran interés generado por estos políéteres marinos por sus estructuras originales y potentes efectos citotóxicos, a finales de la década de los 80, muchos grupos centraron sus esfuerzos en realizar su síntesis. La primera aproximación sintética consistió en la preparación del fragmento central correspondiente a los anillos B y C usando estrategias de ciclación con sales de mercurio.¹¹ Seguidamente fue publicada, con un buen control estereoquímico, la construcción del sistema bromoéter tricíclico similar al fragmento correspondiente a los anillos A, B-C del tirsiferol **1** y venustatriol **6**.^{12,13} Finalmente, tanto estos dos compuestos como el 23-acetato de tirsiferilo **4** fueron sintetizados a partir de productos de partida muy sencillos usando rutas enantioselectivas y convergentes.^{14,15,16,17,18,19}

Del extracto de *L. obtusa* fueron aislados otros cinco compuestos que mostraron una potente actividad citotóxica, el diacetato de 15(28)-anhidrotirsiferilo **7**, el diacetato de 15-anhidrotirsiferilo **8**, el magireol A **9**, el magireol B **10** y el magireol C **11**.²⁰ Sus estructuras fueron determinadas por el análisis de sus datos espectroscópicos y de las correlaciones químicas realizadas. Así, el tratamiento del

¹¹ C. A. Broka, L. Hu, W. J. Lee y T. Shen, *Tetrahedron Lett.*, **1987**, 28, 4993.

¹² M. Hashimoto, M. Yanagiya, T. Kan, H. Shirahama y T. Matsumoto, *Tetrahedron Lett.*, **1987**, 28, 5665.

¹³ C. A. Broka y Y. T. Lin, *J. Org. Chem.*, **1988**, 53, 5876.

¹⁴ M. Hashimoto, T. Kan, K. Nozaki, M. Yanagiya, H. Shirahama y T. Matsumoto, *Tetrahedron Lett.*, **1988**, 29, 1143.

¹⁵ E. J. Corey y D. C. Ha, *Tetrahedron Lett.*, **1988**, 29, 3171.

¹⁶ T. Kan, M. Hashimoto, M. Yanagiya y H. Shirahama, *Tetrahedron Lett.*, **1988**, 29, 5417.

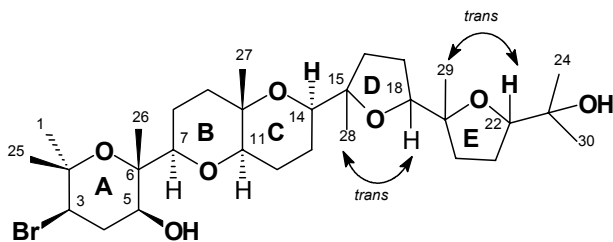
¹⁷ K. Nozaki y H. Shirahama, *Chem. Lett.*, **1988**, 1847.

¹⁸ M. Hashimoto, T. Kan, K. Nozaki, M. Yanagiya, H. Shirahama y T. Matsumoto, *J. Org. Chem.*, **1990**, 55, 5088.

¹⁹ K. F. Albizati, V. A. Martin, M. R. Agharahami y D. A. Stolze, Terpenoids, *Synthesis of Marine Natural Products, Bioorganic Marine Chemistry, Vol. 5*, ed. P. J. Scheuer, Springer Verlag, **1992**, p. 254.

compuesto **5** con cloruro de tionilo dio lugar a una mezcla de **7** y **8**, y la confirmación de la estructura del magireol A **9** fue realizada por la transformación de éste en tirsiferol **1** mediante epoxidación con ácido *m*-cloroperbenzoico y posterior tratamiento con ácido *p*-toluensulfónico. Todos estos compuestos presentaron una potente actividad en los ensayos realizados frente a células de leucemia P-388 (Tabla 1).^{9,20}

Otro compuesto pentacíclico, el callicladol **12**,²¹ fue aislado de *L. calliclada* recogida en las costas de Vietnam. Su estructura posee un sistema de anillos A-B-C similar al del tirsiferol y sus congéneres, con un grupo β-hidroxilo secundario en C-5. La estereoquímica relativa fue determinada en función de las correlaciones NOE y los valores de las constantes de acoplamiento observadas, que indicaron que todos los protones metinos sobre los anillos A-B y C estaban orientados en dirección axial. La configuración absoluta de C-5 se asignó como *S*, usando el método avanzado de Mosher.²² En este compuesto no se detectaron correlaciones NOE entre los otros enlaces éter, lo que sugirió que la estereoquímica de los dos anillos oxolanos D-E era también *trans*. El callicladol **12** presentó una actividad citotóxica *in vitro* frente a células de leucemia P-388 con IC₅₀ de 1.75 µg/mL.



12 Callicladol

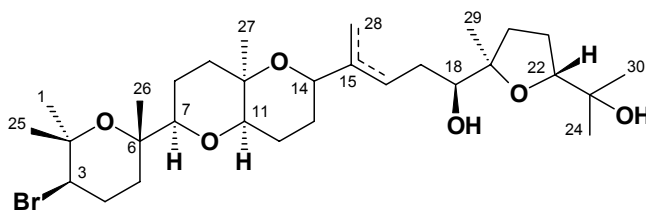
Es incuestionable que la *Laurencia viridis*, una nueva especie descrita de especímenes recolectados en las Islas Canarias, es la mayor productora de este tipo de metabolitos. Ésta es una planta anual que crece en la zona intermareal rápidamente

²⁰ T. Susuki, M. Takeda, M. Susuki, E. Kurosawa, A. Kato y Y. Imanaka, *Chem. Lett.*, **1987**, 361.

²¹ M. Suzuki, Y. Matsuo, Y. Takahashi y M. Masuda, *Chem. Lett.*, **1995**, 1045.

²² I. Ohtani, T. Kusumi, Y. Kashman y H. Kakisawa, *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, *113*, 4092.

durante los meses de invierno-primavera y decae a finales del verano.²³ Del estudio de esta alga fueron aislados nueve metabolitos nuevos, congéneres del tirsiferol **1** o del venustatriol **6**. Sus estructuras fueron determinadas a través de la interpretación de sus datos espectroscópicos y la estereoquímica relativa fue propuesta sobre la base de experimentos de ROESY y NOEDIFF. Inicialmente, además del dehidrotirsiferol **3**, fueron aislados del extracto de acetona dos isómeros, el isodehidrotirsiferol **13** y el 10-*epi*-dehidrotirsiferol **14**.²⁴ En el compuesto **13**, el anillo D cambió a un sistema de anillo oxano a diferencia del de oxolano presente en el compuesto **3**. En el otro isómero **14**, los cambios se localizaron en la fusión de los anillos B-C, la cual debe ser *cis* con una conformación flexible a diferencia de la fusión *trans* presente en todos los otros metabolitos aislados con anterioridad.



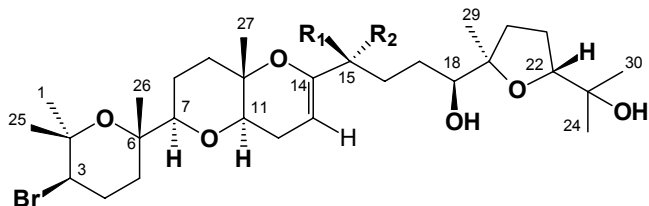
14 $\Delta^{15,28}$ 10-*epi*-Dehidrotirsiferol
19 $\Delta^{15,16}$ 10-*epi*-15,16-Dehidrotirsiferol

En un estudio posterior y del extracto de cloroformo-metanol, fueron aislados los tirsenoles A **15** y B **16**.²⁵ Estos compuestos poseen un inusual sistema enol-éter en el anillo C en los carbonos C-13–C-14, junto con un sistema diol en los carbonos C-15–C-28. La estereoquímica relativa en C-15 se estableció como *R** en el tirsenol A **15** y *S** en el tirsenol B **16**. El resto de los centros quirales fueron idénticos a los observados en el dehidrotirsiferol **3**.

²³ M. C. Gil-Rodríguez y R. Haroun, *Bot. Mar.*, **1992**, 35, 227.

²⁴ M. Norte, J. J. Fernández, M. L. Souto y M. D. García-Grávalos, *Tetrahedron Lett.*, **1996**, 37, 2671.

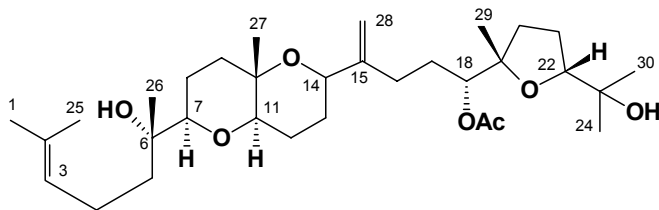
²⁵ M. Norte, J. J. Fernández, M. L. Souto, J. A. Gavín y M. D. García-Grávalos, *Tetrahedron Lett.*, **1997**, 53, 3173.



15 Tirsenol A, R₁=OH, R₂=CH₂-OH

16 Tirsenol B, R₁=CH₂-OH, R₂=OH

Otros cinco metabolitos estrechamente relacionados con el tirsiferol **1** y el venustatriol **6** fueron también descritos.²⁶ El dehidrovenustatriol **17** y el 15,16-dehidrovenustatriol **18** mostraron, respectivamente, un doble enlace terminal entre los carbonos C-15–C-28 y un doble enlace trisustituido con una configuración *Z* entre C-15–C-16. En el 10-*epi*-15,16-dehidrotirsiferol **19**, la presencia de un doble enlace trisustituido con configuración *E* entre los carbonos C-15–C-16 en lugar de uno entre los carbonos C-15–C-28 como en **14**, también fue claramente determinada; y en el 16-hidroxi-dehidrotirsiferol **20**, la presencia de un grupo hidroxilo en C-16 con configuración relativa *S**, pudo ser establecida de acuerdo con los datos espectroscópicos.



21 Acetato de predehidrovenustatriol

Finalmente, el último compuesto aislado en este estudio y el más interesante desde el punto de vista biogénico fue el acetato de predehidrovenustatriol **21**. Su estudio estructural mostró que posee el sistema de anillos B-C así como la cadena lateral idénticos a los del 18-acetato de dehidrovenustatriol. La característica más

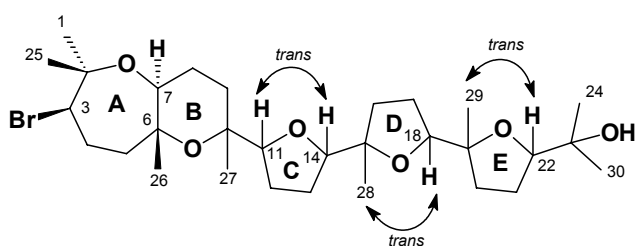
²⁶ M. Norte, J. J. Fernández y M. L. Souto, *Tetrahedron Lett.*, **1997**, *53*, 4649.

importante fue la ausencia de anillo A y del átomo de bromo en la posición C-3, unido a la presencia de un doble enlace trisustituido entre el carbono C-2-C-3.

Los ensayos biológicos realizados con estos compuestos puros fueron llevados a cabo *in vitro*, orientados a determinar sus actividades citotóxicas. Los resultados aparecen recogidos en la Tabla 1.

1.2.1.2. Compuestos que poseen un sistema de anillo dioxabicyclo[5.4.0]undecano

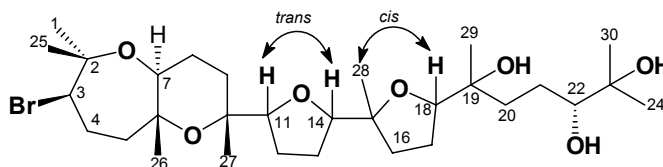
El enshuol **22**, aislado de *L. omaezakiana*, fue el primer ejemplo de una nueva clase de bromoterpenos pentacíclicos.²⁷ Su estructura está formada por un sistema de anillos de 2,8-dioxabicyclo[5.4.0]undecano (anillos A y B) y tres anillos de oxolano aislados (C-D-E). La estereoquímica de los centros quirales alrededor del anillo 2,8-dioxabicyclo[5.4.0]undecano fue determinada como 3*R*, 6*R* y 7*S* mediante comparación de experimentos NOESY y NOE, y la aplicación del método avanzado de Mosher del compuesto obtenido por tratamiento de **22** con zinc en polvo y ácido acético.²² Al no observarse correlaciones NOE entre los otros enlaces éter, los autores sugirieron que la estereoquímica de los tres anillos de oxolano es *trans*.



22 Enshuol

²⁷ Y. Matsuo, M. Suzuki y M. Masuda, *Chem. Lett.*, **1995**, 1043.

En este grupo se debería también incluir el aurilol **23**²⁸ que fue aislado de la liebre marina *Dolabella auricularia* (orden Aplysiacea, familia Aplysiidae) siendo posible que su origen se encuentre en la dieta del molusco. La estructura de **23** presenta un sistema de anillo A-B 2,8-dioxabicyclo[5.4.0]undecano y dos anillos oxolanos aislados C y D. La estereoquímica se propuso, sobre la base de correlaciones NOESY, la comparación de constantes de acoplamiento con modelos estereoisoméricos simples, y la preparación de (*R*) y (*S*)-bisMTPA. Así, la estereoquímica absoluta de los cinco centros se estableció como 3*R*, 6*R*, 7*S*, 10*R* y 22*R*. Aunque no se observaron correlaciones NOE entre los otros enlaces éter, se sugirió que la estereoquímica de los dos anillos oxolanos fuera *trans* en el anillo C y *cis* en el anillo D. El aurilol **23** exhibe citotoxicidad frente a células HeLa S₃ (cáncer humano de útero) con un IC₅₀ de 4.3 µg/mL.



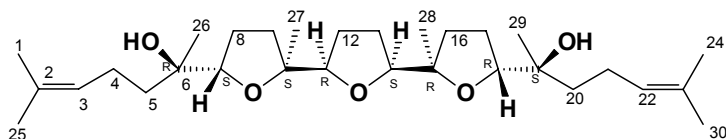
23 Aurilol

1.2.1.3. Compuestos simétricos

El compuesto meso teurileno **24**, fue aislado junto con el 23-acetato de tirsiferol **4** de *L. obtusa* recolectada en la Isla de Teuri.⁸ La estructura de este metabolito fue determinada por métodos de rayos X y posee tres unidades tetrahidrofurano enlazadas en el centro de la molécula con ocho centros quirales, y simetría *C_s*. El teurileno **24**, un compuesto inactivo frente a líneas celulares P-388, atrajo especial interés sin embargo, en su síntesis y propiedades conformacionales. La

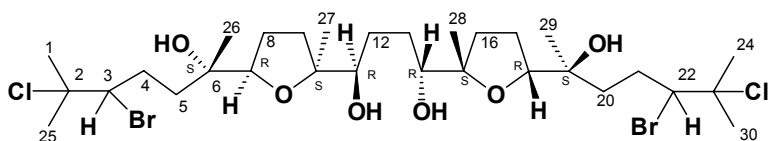
²⁸ K. Suenaga, T. Shibata, N. Takada, H. Kigoshi y K. Yamada, *J. Nat. Prod.*, **1998**, *61*, 515.

estrategia utilizada por Shirahama y col., es interesante ya que parte de fragmentos ópticamente puros para obtener un producto ópticamente inactivo.^{19, 29, 30}



24 Teurileno

Un ejemplo único de compuesto halogenado con cloro y una simetría C_2 , el intricatetraol **25**, fue aislado del alga *L. intricata*. Su estructura fue deducida a partir de evidencias espectrales, químicas, y biogénicas.³¹ El tratamiento de **25** con zinc y ácido acético dio como resultado, por deshalogenación, un compuesto vinílico simétrico estrechamente relacionado con el compuesto meso teurileno **24**. La posición de los cuatro halógenos fue determinada por métodos espectroscópicos y químicos.³² La estereoquímica relativa en la región de los anillos de oxolano fue definida por correlaciones NOE, y la configuración absoluta de los grupos hidroxilo en C-11 y C-14 se estableció por la aplicación de los métodos avanzados de Mosher.²²



25 Intricatetraol

²⁹ M. Hashimoto, M. Yanagiya y H. Shirahama, *Chem. Lett.*, **1998**, 645.

³⁰ M. Hashimoto, H. Harigaya, M. Yanagiya y H. Shirahama, *Tetrahedron Lett.*, **1988**, 29, 5947.

³¹ M. Suzuki, Y. Matsuo, S. Takeda y T. Suzuki, *Phytochemistry*, **1993**, 33, 651.

³² B. J. Burrenson, F. X. Woolard y R. E. Moore, *Chem. Lett.*, **1975**, 1111.

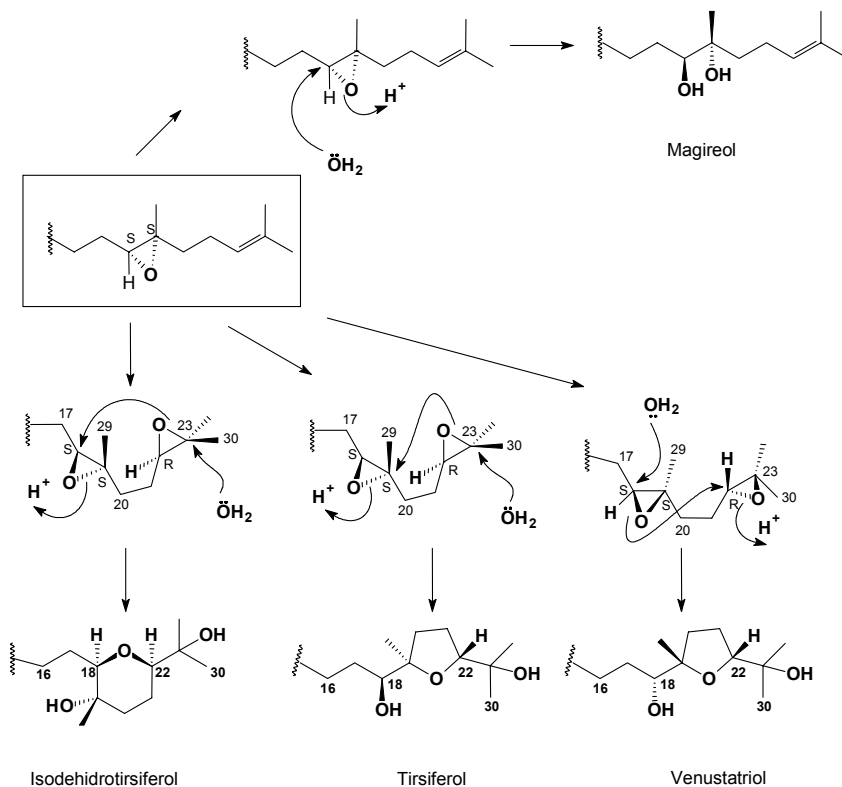
I.2.2. Consideraciones biogénicas

Desde el punto de vista biogénico, los éteres polioxigenados derivados del escualeno aislados de especies de *Laurencia*, podrían surgir de un precursor común, el (10*R*,11*R*)-epoxiesqualeno aislado de *Laurencia okamurai*.³³ Este compuesto podría evolucionar al (6*S*,7*S*,10*R*,11*R*,14*R*,15*R*,18*S*,19*S*)-tetraepóxido de escualeno **26** como intermediario común, aunque éste aún no ha sido encontrado. A partir de este intermedio se pueden proponer tres posibles rutas: la primera para el tirsiferol **1**, el venustatriol **6** y sus derivados que poseen sistemas de anillos B-C dioxabicyclo[4.4.0]decano, la segunda para aquellos compuestos que poseen un sistema de anillos A-B dioxabicyclo[5.4.0]undecano, y la tercera que implica la génesis de compuestos simétricos tales como el teurileno **24**.

En el tirsiferol **1** o el venustatriol **6**, y derivados correspondientes, es posible observar, desde el punto de vista biogénico, diferentes procesos de ciclación. El anillo D es posiblemente biosintetizado a partir del fragmento diepóxido 18*S*,19*S*,22*R*, por protonación al (18*S*,19*S*)-epóxido seguido por hidroxilación en C-23 para dar, el anillo oxolano en la serie del tirsiferol o el anillo oxano en el isodehidrotirsiferol **13**. Cuando el proceso es iniciado por una protonación del (22*R*)-23-epóxido seguida de una hidroxilación en C-18, se produce la serie del venustatriol como se ilustra en el Esquema 1.

Por otro lado, en un principio se pensó que la formación del sistema de anillos A-B-C tenía lugar a través de una ciclación concertada de tres epóxidos después de la formación de un ion bromonio en C-2–C-3. Sin embargo, como consecuencia de la identificación del acetato de predehidrovenustatriol **21** con ausencia del átomo de bromo y del anillo A, pero con un doble enlace entre los carbonos C-2–C-3; los cambios de estereoquímica en el carbono C-10 en los compuestos 10-*epi*-dehidrotirsiferol **14** y 10-*epi*-15,16-dehidrotirsiferol **19**; la presencia en el tirsenol A **15** y tirsenol B **16** del enol-éter en el carbono C-13–C-14, o del grupo β-hidroxilo en C-5

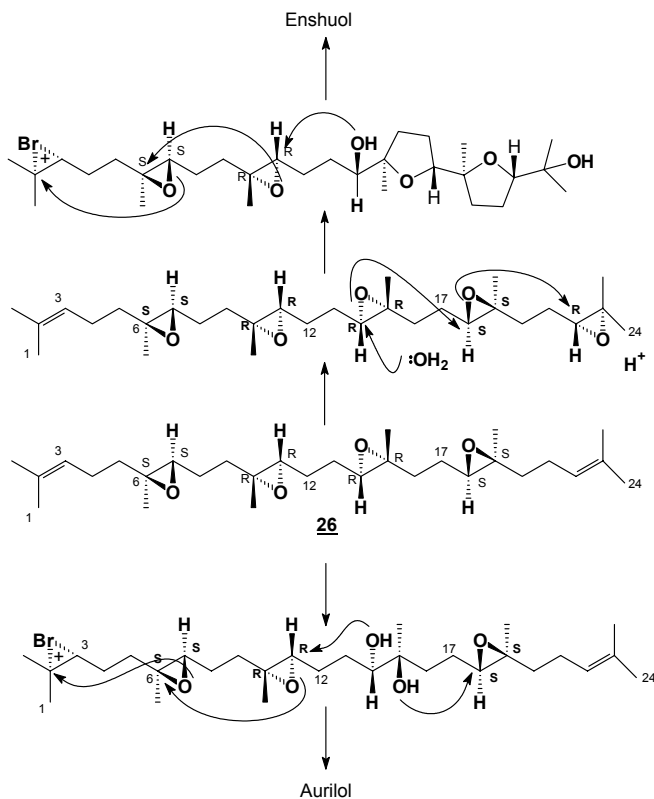
en el callicladol **12**; la propuesta biogenética clásica para estos metabolitos entra en contradicción y sería más conveniente asumir que la ciclación ocurre a través de un proceso secuencial.



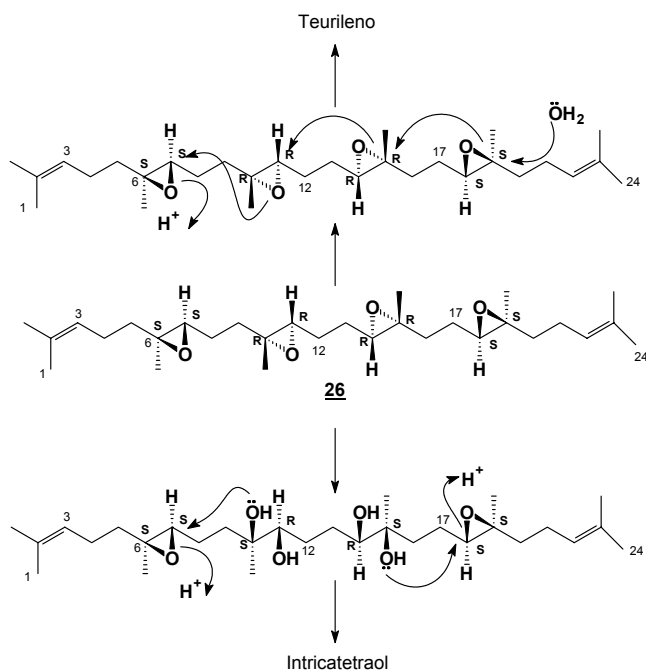
Esquema 1

El segundo grupo está formado por los compuestos con un sistema de anillos dioxabicyclo[5.4.0]undecano. Su propuesta biogenética está también basada en el intermedio tetraepóxido **26**. En estos compuestos el proceso comenzaría con una protonación enzimática sobre el (14*R*,15*R*)-epóxido y evolucionaría siguiendo la ruta mostrada en el Esquema 2 hacia el producto enshuol **22** con una relación todo *trans* entre los tres enlaces éter del los oxolanos,²⁷ y hacia el aurilol **23**, el cual fue descrito con una relación *trans* entre H-11 y H-14, y una relación *cis* entre H-18 y H₃-28.²⁸

³³ H. Kigoshi, M. Ojika, Y. Shizuri, H. Niwa y K. Yamada, *Tetrahedron Lett.*, **1982**, 5413.



Para el último grupo considerado, el teurileno **24** y el intricatetraol **25**, Susuki y col. propusieron una biogénesis (Esquema 3).³¹ El teurileno **24** podría derivar del tetraepóxido de escualeno **26** a través de una protonación enzimática inicial hacia el (6*S*,7*S*)-epóxido seguido por una ciclación e hidroxilación en C-19. En **25** se asume el mismo origen, esto es, desde **26** por protonación al (6*S*,7*S*)-epóxido y subsecuente ciclación e hidroxilación en C-11 para dar una mitad con configuración (6*S*,7*R*,10*R*,11*S*) y una relación *trans* entre H-7 y H₃-27. La otra mitad sería generada por un intermedio 14,15-diol, el cual es similar al formado por protonación e hidroxilación del 14,15-epóxido. La reacción del grupo hidroxilo en C-15 con el epóxido en C-18 debería aportar esta mitad con una relación *cis* entre H-18 y H₃-28. La subsecuente halogenación produciría el compuesto **25** (Esquema 3).



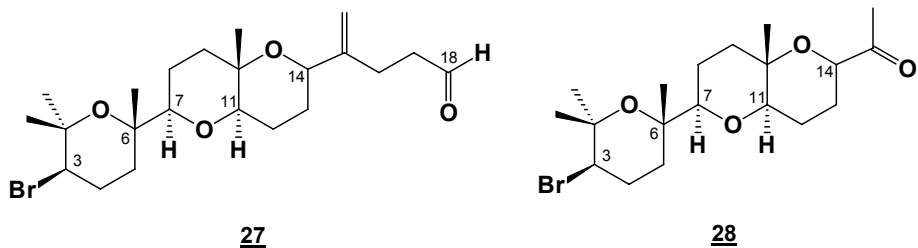
Esquema 3

I.2.3. Actividad biológica

Desde el momento en el que el 23-acetato de tirsiferilo **4** fue aislado y se encontró que presentaba una potente actividad citotóxica, los ensayos biológicos de este tipo de compuestos se enfocaron hacia la evaluación de esta propiedad. Los efectos citotóxicos fueron evaluados con cultivos de líneas de células de P-388 (neoplasma linfóide de ratón), A-549 (carcinoma de pulmón humano), HT-29 (carcinoma de colon humano) y MEL-28 (melanoma humano). Estos ensayos establecieron la actividad citotóxica de estos compuestos, mostrando que los mismos poseen una potente y selectiva actividad frente a líneas de células P-388. Los resultados de los ensayos biológicos se encuentran resumidos en la Tabla 1.

Líneas de células ⇨ Compuestos ↓	IC ₅₀								
	P-388		A-549		HT-29		MEL-28		
	µg/mL	µM	µg/mL	µM	µg/mL	µM	µg/mL	µM	
Metabolitos aislados de algas del género <i>Laurencia</i> :									
<u>1</u>	Tirsiferol	0.01	0.016	10.0	16.53	10.0	16.53		
<u>2</u>	18-Acetato de tirsiferilo	0.30	0.47						
<u>3</u>	Dehidrotirsiferol	0.01	0.017	2.5	4.26	2.5	4.26	5	8.52
<u>4</u>	23-Acetato de tirsiferilo	0.0003	0.00047						
<u>5</u>	18,23-Diacetato de tirsiferilo	0.52	0.75						
<u>7</u>	15(28)-Diacetato de anhidrotirsiferilo	0.05	0.074						
<u>8</u>	15-Diacetato de anhidrotirsiferilo	0.10	0.148						
<u>9</u>	Magireol A	0.03	0.052						
<u>10</u>	Magireol B	0.03	0.052						
<u>11</u>	Magireol C	0.03	0.052						
<u>12</u>	Callicladol	1.75	2.89						
<u>13</u>	Isodehidrotirsiferol	0.01	0.017	2.5	4.26	2.5	4.26	2.5	4.26
<u>14</u>	10- <i>epi</i> -Dehidrotirsiferol	1.00	1.70	5.0	8.52	5.0	8.52	5.0	8.52
<u>15</u>	Tirsenol A	0.25	0.40	>1.0	>1.62	>1.0	>1.62	>1.0	>1.62
<u>16</u>	Tirsenol B	0.01	0.016	>1.0	>1.62	>1.0	>1.62	>1.0	>1.62
<u>17</u>	Dehidrovenustatriol	0.01	0.017	2.5	4.26	2.5	4.26	2.5	4.26
<u>18</u>	15,16-Dehidrovenustatriol	0.25	0.43	2.5	4.26	2.5	4.26	2.5	4.26
<u>19</u>	10- <i>epi</i> -15,16-Dehidrotirsiferol	0.50	0.85	2.5	4.26	1.2	2.04	2.5	4.26
<u>20</u>	16-Hidroxidehidrotirsiferol	0.50	0.83	1.2	1.99	1.2	1.99	1.2	1.99
<u>21</u>	Acetato de predehidrovenustatriol	1.20	2.18	2.5	4.54	5.0	9.09	2.5	4.54
<u>27</u>		>1.00	>2.26	>1.00	>2.26	>1.00	>2.26		
<u>28</u>		>2.00	>4.96	>2.00	>4.96	>2.00	>4.96		
Metabolitos aislados de esponjas de la familia <i>Axinellidae</i> :									
<u>50</u>	Sodwanona G	1	2.0	0.1	0.2	1	2.0	1	2.0
<u>51</u>	Sodwanona I	9.8	20.0	9.8	20.0	9.8	20.0	9.8	20.0
<u>47</u>	Sodwanona M	1	2.0		-		-		-

Tabla 1.- Valores de IC₅₀ de poliéteres triterpénicos de origen marino.



Un estudio de las relaciones estructura-actividad fue realizado con los metabolitos aislados de *L. viridis*.³⁴ Este estudio comenzó con un proceso de simplificación molecular dando por fragmentación oxidativa los compuestos **27** y **28**. Estas modificaciones redujeron considerablemente su citotoxicidad y selectividad frente a la suspensión de células de leucemia. Una posible explicación a estos hechos se puede hallar en la presencia necesaria de la cadena flexible comprendida entre los carbonos C-15 y C-24, así como la importancia de las diferentes conformaciones adoptadas por los distintos análogos en base a las correlaciones establecidas entre las orientaciones de la cadena flexible y los valores de IC₅₀. Los metabolitos más activos poseen una conformación similar al dehidrotirsiferol **3** (IC₅₀=0.01 µg/mL), mientras que cuando la orientación de la cadena se desvía en ambas direcciones, el valor de la actividad citotóxica se reduce progresivamente, como ocurre con el tirsenol A **15** (IC₅₀=0.25 µg/mL) y el 10-*epi*-dehidrotirsiferol **14** (IC₅₀=1.0 µg/mL) (Figura 2).

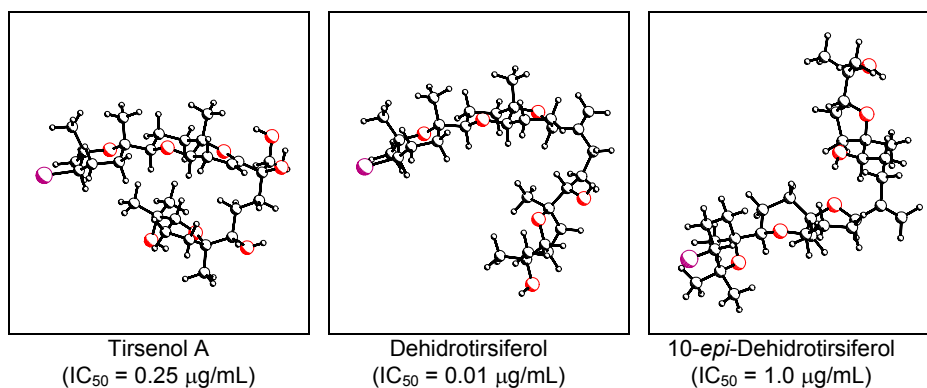


Figura 2.- Vista espacial de las estructuras 3D propuestas de compuestos representativos aislados de *L. viridis* y sus valores de IC₅₀.

³⁴ J. J. Fernández, M.L Souto y M. Norte, *Bioorg. Med. Chem.*, **1998**, *6*, 2237.

El 23-acetato de tirsiferilo **4** (TA) mostró además una potente y específica inhibición de proteínas fosfatasa tipo 2A (PP2A), específicas de serina/treonina, con valores de IC₅₀ de 4-16 μM, dependiendo de la concentración de la enzima.³⁵ Este compuesto no afectó en cambio por encima de 1mM, la actividad de las proteínas fosfatasa tipo I (PPI), 2B (PP2B), 2C (PP2C), o de las proteínas fosfatasa específicas de tirosina (PTP). Aún más, inhibió la actividad de PP2A en un extracto crudo de una línea celular humana de células T, células Jurkat, así como la subunidad catalítica purificada. Este trabajo sugiere que el 23-acetato de tirsiferilo **4** puede ser, junto con el ácido okadaico, la microcistina LR, la caliculina A y la tautomicina, una herramienta útil para el estudio de los procesos celulares mediados por fosfatasa.

El venustatriol **6** ha sido descrito con actividad frente al virus de la estomatitis vesicular (VSV) y del herpes simple tipo 1 (HSV-1).¹⁰ Sin embargo, los ensayos biológicos fueron realizados con el extracto crudo de *L. venusta*, en el cual también se identificaron los compuestos tirsiferol **1** y 23-acetato de tirsiferilo **4**, no habiéndose publicado aún ensayos con el producto puro.

Los mecanismos de inhibición del crecimiento por el dehidrotirsiferol **3** fueron investigados en líneas de células de cáncer humano de piel tanto sensibles como resistentes a drogas (MDR⁺).³⁶ Este compuesto fue capaz de salvar la resistencia a multidroga mediada por la glicoproteína P, y es por tanto, un candidato interesante para el desarrollo de futuros ensayos clínicos. El tratamiento de células KB con el compuesto **3** reveló en el análisis del ciclo celular una acumulación en la fase S, mientras que no provocó ningún aumento obvio ni en la apoptosis ni en la necrosis.

La citotoxicidad del dehidrotirsiferol **3** frente a tres líneas celulares de cáncer de mama, T47D (IC₅₀ de 13.5 μM), ZR-75 (IC₅₀ de 16.0 μM) y Hs578T (IC₅₀ de 18.9 μM), fue examinada y comparada con el compuesto quimioterapéutico doxorubicina y

³⁵ S. Matsuzawa, T. Suzuki, M. Suzuki, A. Matsuda, T. Kawamura, Y. Mizuno y K. Kikuchi, *FEBS Lett.*, **1994**, 356, 272.

el inhibidor de la mitosis colchicina. Este estudio demostró que este metabolito no modula el transporte mediado por la glicoproteína P (P-gp), por lo tanto podría ser usado en líneas de células que expresan de P-gp sin interferencia.³⁷

Algunos de los terpenos conocidos (ej. paclitaxel, docetaxel, etc) están ya en uso o en ensayos clínicos, pero ninguno de éstos es de origen marino. Estos poliéteres triterpénicos podrían representar una fuente de fármacos interesantes con efectos antineoplásticos no convencionales.

I.3. POLIÉTERES TRITERPÉNICOS DE ESPONJAS

I.3.1. Aislamiento y determinación estructural

Los terpenos, hasta la fecha, son los metabolitos secundarios no esteroideos más abundantes aislados de esponjas marinas. Muchos sesqui-, di-, y sesterpenos interesantes han sido caracterizados de estos animales, pero hasta el aislamiento de los sifolanos en 1981 de una esponja del Mar Rojo, la *Siphonochalina siphonella* (orden Haploscheridae, familia *Halichonidae*), no habían sido publicados otros triterpenos aparte del escualeno.³⁸ Los más recientes han sido identificados principalmente de otras tres esponjas *Axinella weltneri*, *Raspaciona aculeata*, y *Ptilocaulis spiculifer*, todas de la familia *Axinellidae*, recolectadas en el Indo Pacífico, Mar Mediterráneo y Mar Rojo. Estos metabolitos consisten, en la mayoría de los casos, de dos sistemas cíclicos separados que hemos clasificado de acuerdo con el tipo de ligando que conecta estos sistemas:

- Compuestos con un puente etileno que generalmente conecta dos *trans*-decahidrobenzooxepinas o una *trans*-decahidrobenzooxepina con otro sistema cíclico

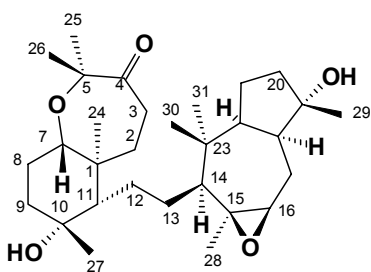
³⁶ M. K. Pec, M. Hellan, K. Moser-Thier, J. J. Fernández, M. L. Souto y E. Kubista, *Anticancer Res.*, **1998**, *18*, 3027.

³⁷ M. K. Pec, K. Moser-Thier, J. J. Fernández, M. L. Souto y E. Kubista, *Int. J. Oncol.*, **1999**, *14*, 739.

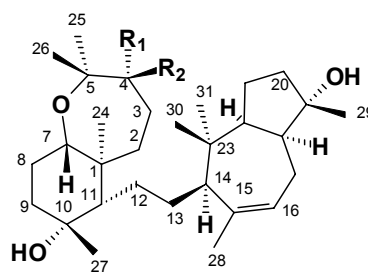
- Compuestos con un puente modificado o reagrupado
- Compuestos con un puente butileno

1.3.1.1. Compuestos con un puente etileno

Los sifolanos poseen dos sistemas bicíclicos atípicos, un octahidroazuleno y una *trans*-decahidrobenzooxepina, enlazados entre sí por un puente etileno. Hasta donde se conoce, tan sólo uno de estos metabolitos, la sifolenona B **29**, aislada de la esponja *Siphonochalina siphonella*,³⁹ ha presentado una estructura polietérea. Ésta fue determinada por correlaciones químicas con los compuestos relacionados sifolenol **30** y sifolenona A **31**,³⁹ aunque las configuraciones absolutas de éstos fueron posteriormente corregidas por Kakisawa y col. aplicando los métodos de Mosher.^{22,40} Por lo tanto, proponemos que la estructura de la sifolenona B debería ser **29** en lugar del enantiómero publicado inicialmente.



29 Sifolenona B



30 Sifolenol; R₁=H; R₂=OH
31 Sifolenona A; R₁=R₂=O

En 1990, estructuralmente relacionado con los metabolitos tipo sifolano, fue aislado el primer y más representativo metabolito de una nueva clase de esqueleto triterpénico, la raspacionina **32**.⁴¹ Se obtuvo a partir del extracto liposoluble de la

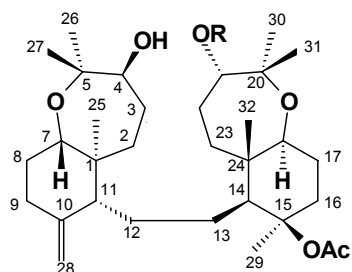
³⁸ U. Shmueli, S. Carmely, A. Groweiss y Y. Kashman, *Tetrahedron Lett.*, **1981**, 22, 709.

³⁹ S. Carmely y Y. Kashman, *J. Org. Chem.*, **1983**, 48, 3517.

⁴⁰ I. Ohtami, T. Kusumi, Y. Kashman y H. Kakisawa, *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 1296.

⁴¹ G. Cimino, A. Crispino, C. A. Mattia, L. Mazzarella, R. Puliti, E. Trivellone y M. J. Uriz, *Tetrahedron Lett.*, **1990**, 31, 6565.

Raspaciona aculeata y exhibe un esqueleto caracterizado por dos sistemas *trans*-perhidrobenzooxepinas unidos por un puente etileno en posición ecuatorial. La *Raspaciona aculeata* es una esponja roja mediterránea que ofrece interesantes desafíos para la investigación química. Primero, su clasificación taxonómica fue objeto de discusión, de hecho, *R. aculeata* pertenece a la familia *Paspailiidae*, la cual ha sido alternativamente clasificada dentro del orden Poecilosclerida o Axinellida sobre la base de sus características estructurales. Segundo, esta esponja parece desplegar alguna actividad aleloquímica ya que está completamente libre de organismos epífitos. La estructura de la raspacionina **32** fue sugerida por análisis de sus datos espectroscópicos y la estereoquímica relativa fue proporcionada por análisis de difracción de rayos X,^{41,42} aunque la estereoquímica absoluta no fue determinada hasta 1993 por aplicación de los métodos de Mosher utilizando el éster α -metoxi- α -trifluorometilfenilacético (MTPA).⁴³



32 Raspacionina; R=Ac
35 21-Deacetil-raspacionina; R=H

En la misma esponja y con el mismo esqueleto triterpénico que el compuesto **32**, fueron aislados otros metabolitos polietéricos, la raspacionina A **33**,⁴⁴ la raspacionina B **34**,⁴⁵ y ocho compuestos minoritarios **35-42**.⁴⁶ La principal diferencia entre la estructura de la raspacionina **32** y el compuesto **33** fue la ausencia del sistema *exo*-metileno en los carbonos C-10-C-28, y la presencia en el sistema

⁴² R. Puliti, E. Trivellone, A. Crispino y G. Cimino, *Acta Crystallogr., Sect A*, **1991**, C47, 2609.

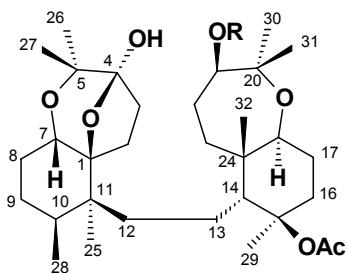
⁴³ G. Cimino, R. Epifanio, A. Madaio, R. Puliti y E. Trivellone, *J. Nat. Prod.*, **1993**, 56, 1622.

⁴⁴ G. Cimino, A. Crispino, R. Epifanio, A. Madaio, C. A. Mattia, L. Mazzarella, R. Puliti, E. Trivellone y M. J. Uriz, *Tetrahedron Lett.*, **1992**, 48, 9013.

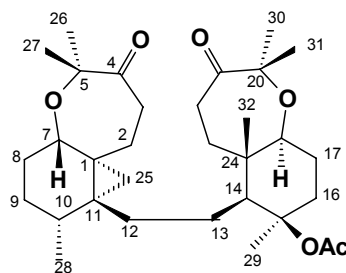
⁴⁵ G. Cimino, A. Crispino, A. Madaio, E. Trivellone y M. J. Uriz, *J. Nat. Prod.*, **1993**, 56, 534.

⁴⁶ G. Cimino, A. Madaio, E. Trivellone y M. J. Uriz, *J. Nat. Prod.*, **1994**, 57, 784.

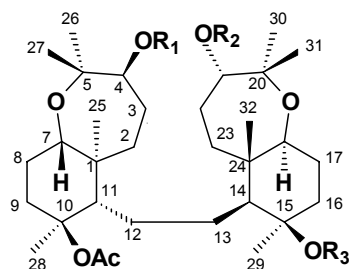
perhidrobenzooxepina de un oxígeno entre C-4 y C-1, el cual, teniendo en cuenta el origen biogénico a partir de un precursor como el escualeno, debería inducir un desplazamiento 1,2 del metilo desde C-1 a C-11, dando lugar al esqueleto triterpénico reagrupado **33**. Esto fue determinado con certeza por estudios de difracción de rayos X de su derivado desacetilado **43**. La estereoquímica absoluta de ambos compuestos fue propuesta en C-21 como *R* para **43** y **33** por aplicación de los métodos de Mosher. La estructura y estereoquímica relativa de la raspacionina B **34** fue elucidada por medio de métodos espectroscópicos, principalmente resonancia magnética nuclear mono y bi-dimensional, sugiriendo una estructura relacionada con la raspacionina **32** pero con dos grupos cetonas en C-4 y C-21. Este metabolito se caracteriza también por la presencia de un anillo ciclopropano que pudo ser establecido por los experimentos HOHAHA y HMBC. Su estereoquímica absoluta fue propuesta por comparación de su curva de dicroísmo circular con la de los compuestos relacionados **33** y **31**. Con respecto a los productos minoritarios, sus estructuras presentaron funcionalizaciones distintas en los carbonos C-4, C-10, C-15 y C-21.⁴⁶ Su caracterización total por RMN ha llevado a la racionalización de los efectos de ciertos sustituyentes sobre los desplazamientos químicos de los átomos en el sistema perhidrobenzooxepina. La estereoquímica absoluta de estos compuestos se asumió como presumiblemente la misma de las otras raspacioninas sobre la base del máximo observado en la curva de dicroísmo circular a 302 nm para los compuestos **37**, **38**, **39**, **41** y **42** debido a una unidad cetona, lo que sugirió una estereoquímica absoluta idéntica a los derivados 4-oxo de la raspacionina **32** y 21-oxo de la raspacionina A **33**, así como a la raspacionina B **34**.⁴⁵



33 Raspacionina A; R=Ac
43 21-Deacetil-raspacionina A; R=H

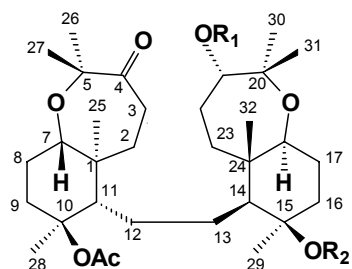


34 Raspacionina B



36 10-Acetoxi-21-deacetil-28-hidroraspacionina; R₁=H; R₂=H; R₃=Ac

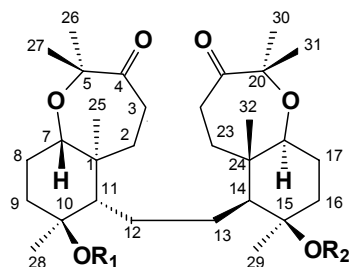
40 10-Acetoxi-4-acetil-15-deacetil-28-hidroraspacionina; R₁=Ac; R₂=Ac; R₃=H



37 10-Acetoxi-21-deacetil-4-oxo-28-hidroraspacionina; R₁=H; R₂=Ac

38 10-Acetoxi-15,21-dideacetil-4-oxo-28-hidroraspacionina; R₁=H; R₂=H

39 10-Acetoxi-15-deacetil-4-oxo-28-hidroraspacionina; R₁=Ac; R₂=H

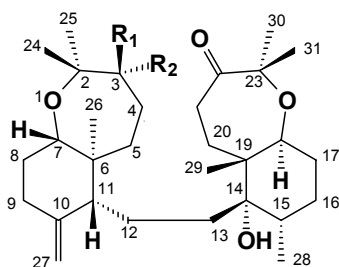


41 10-Acetoxi-15-deacetil-4,21-dioxo-28-hidroraspacionina; R₁=Ac; R₂=H

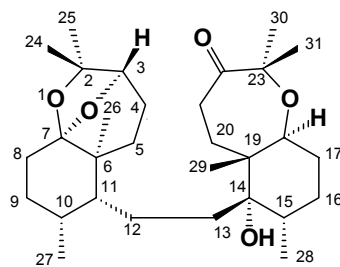
42 10-Acetoxi-4,21-dioxo-28-hidroraspacionina; R₁=H; R₂=Ac

Estrechamente relacionado con estos metabolitos, fue aislado de la esponja *Axinella weltneri* un nuevo grupo de triterpenos llamados sodwanonas. Las sodwanonas poseen al menos un sistema perhidrobenzooxepina derivado de una mitad del precursor escualeno, y a partir de la otra mitad del escualeno, se obtiene una variedad de otros sistemas que por lo menos pertenecen a tres esqueletos carbonados

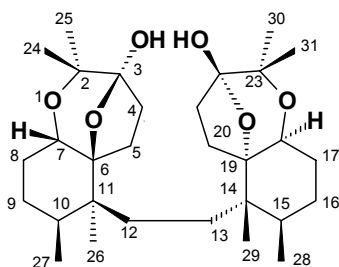
diferentes. Uno de ellos, constituido por las sodwanonas D **44**, E **45**, F **46**, K **47**, y M **48**, presentan también dos sistemas perhidrobenzooxepinas como las raspacioninas por lo que estos metabolitos pueden clasificarse dentro de la misma clase.



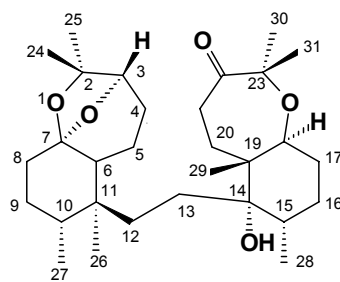
44 Sodwanona D; R₁=R₂=O
47 Sodwanona K; R₁=H; R₂=OH



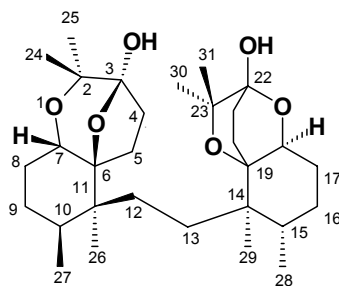
45 Sodwanona E



46 Sodwanona F



48 Sodwanona M



49 Sodwanona L

Las sodwanonas D **44**, E **45** y F **46**,⁴⁷ fueron aisladas de especímenes del Indo-Pacífico de estas esponjas. Las estructuras fueron inicialmente determinadas sobre la

⁴⁷ A. Rudi, Y. Kashman, Y. Benayahu y M. Schleyer, *J. Nat. Prod.*, **1994**, *57*, 1416.

base de sus datos de RMN, aunque la elucidación estructural de los compuestos **45** y **46** necesitó un análisis más amplio por lo que los estudios de difracción de rayos X de estos metabolitos fueron también llevados a cabo.⁴⁸ La estructura de la sodwanona D **44** se propuso con dos sistemas característicos perhidrobenzooxepina, los oxepanos 3-oxo-2,2,6 y 22-oxo-19,23,23-trimetilados. A partir de la comparación de los datos espectroscópicos de RMN de la sodwanona **45** con el compuesto **44**, se sugirió que la principal diferencia entre ambos era la presencia de un grupo cetil interno en las posiciones C-3–C-7. La estereoquímica relativa de este metabolito fue propuesta por análisis de las correlaciones NOE, mientras el análisis de rayos X, además de confirmar esta última, estableció la estereoquímica relativa de las dos mitades de la molécula mostrando el suave plegamiento del anillo oxepano izquierdo. La comparación de los datos de RMN de la sodwanona F **46** con los de la raspacionina A **33**, claramente llevó a la identificación de una mitad de la estructura como idéntica a la mitad izquierda del compuesto **33**. La otra mitad difiere en la estereoquímica en C-15, como reflejó el estudio de difracción de rayos X.⁴⁸

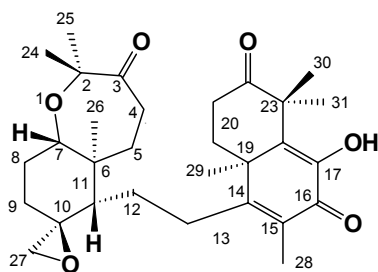
De especímenes de *Axinella weltneri* recolectados en las Islas Comores, se aisló la sodwanona D **44** junto con otros tres triterpenos nuevos, las sodwanonas M **48**, K **48**, y L **49**.⁴⁹ La comparación de los datos espectroscópicos del compuesto mayoritario aislado, la sodwanona M **48**, con los de las sodwanonas identificadas anteriormente,⁴⁷⁻⁴⁸ sugiere que el compuesto **48** posee el mismo sistema perhidrobenzooxepina en la mitad derecha que la sodwanona E **45**, mientras que en la otra mitad es observada la migración del grupo metilo Me-26, desde C-6 a C-11. Una migración 1,2 equivalente ha sido previamente descrita para la sodwanona F **46**⁴⁷ y la raspacionina **32**.⁴¹ La asignación de la estereoquímica relativa de los centros quirales fue establecida principalmente mediante correlaciones NOE. La sodwanona M **48** presentó además actividad citotóxica frente a células P-388 a una concentración de 1 µg/mL, aunque no tuvo actividad frente a las líneas A-549, MT-29, y MEL-28 (Tabla

⁴⁸ A. Rudi, I. Goldberg, Z. Stein, Y. Kashman, Y. Benayahu, M. Schleyer y M. D. García-Grávalos, *J. Nat. Prod.*, **1995**, *58*, 1702.

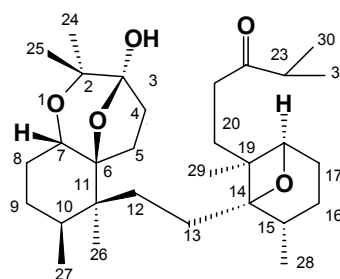
⁴⁹ A. Rudi, M. Aknin, E. M. Gaydou y Y. Kashman, *J. Nat. Prod.*, **1997**, *60*, 700.

1). La estructura de la sodwanona K **47** fue confirmada por la oxidación del alcohol axial C-3 en el derivado ya conocido sodwanona D **44**.

Otras dos sodwanonas, las sodwanonas G **50** e I **51**,⁴⁸ fueron también aisladas de la esponja *Axinella weltneri*. La elucidación estructural del compuesto **50** comenzó con el estudio exhaustivo de sus datos espectroscópicos, aunque tanto su estructura como su estereoquímica relativa fueron completadas de forma inequívoca por análisis de difracción de rayos X. Esto mostró que la parte izquierda de la molécula posee la misma estereoquímica que la raspacionina **32** y la sodwanona D **44**, mientras la diferencia se sitúa en el fragmento C-8–C-11 que contiene sólo siete grupos metilos porque el octavo ha sido transformado en un epóxido entre las posiciones C-10–C-27. En el compuesto **51**, la sodwanona I, la mitad izquierda de la molécula fue idéntica a la sodwanona F **46**, pero la otra mitad se distinguió de las unidades encontradas en las sodwanonas publicadas hasta ese momento. Los desplazamientos químicos de las señales y los experimentos de COSY y HMBC apuntaron un sistema oxabicyclo[3.1.1]heptano, lo cual fue confirmado por el experimento NOESY. Las sodwanonas G **50** e I **51** presentaron actividades citotóxicas, siendo activas a concentraciones de 20 μM o inferiores, frente a los cuatro ensayos de líneas celulares realizados: P-388, A-549, MT-29, y MEL-28. Además, la sodwanona G **50**, a diferencia de las sodwanonas M **48** e I **51**, mostró una alta especificidad frente a líneas de células de cáncer de hígado humano A-549, diez veces menor que en las otras líneas celulares ensayadas como se observa en la Tabla 1.



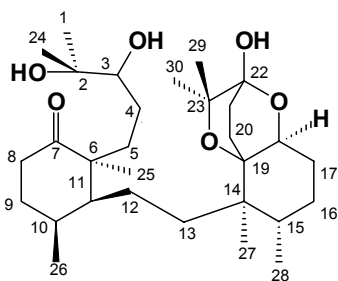
50 Sodwanona G



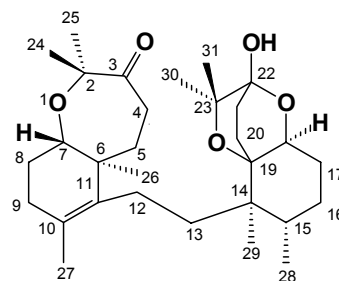
51 Sodwanona I

De forma análoga, la sodwanona L **49** posee la parte izquierda de su estructura idéntica a la correspondiente de la sodwanona F **47**, y su mitad derecha con un sistema dioxabicyclo[2.2.2]octano que representa una nueva clase de sodwanonas. La estereoquímica que se sugirió para este compuesto fue relativa, por lo que cada mitad representada podría realmente corresponder a su enantiómero. Así, la relación entre las dos mitades demasiado lejanas entre sí para observar correlaciones NOE se basa en las estructuras de difracción de rayos X de varias sodwanonas.

Las sodwanonas N **52**, O **53** y P **54**⁵⁰ también consistieron en dos sistemas de anillos separados. Una mitad de cada compuesto con el mismo anillo de oxepano sustituido que las respectivas sodwanonas E **45** (sin cierra cetálico), D **44** y M **48**; y una segunda mitad común, del C-14 al C-23, con la misma estructura tricíclica de la mitad derecha de la sodwanona L **49**. Con respecto a la sodwanona N **52**, sólo uno de los dos grupos metilos centrales del precursor escualeno se desplazó al átomo de carbono vecino, mientras que en la sodwanona F **46** lo habían hecho los dos. La estereoquímica relativa de las dos mitades en estos compuestos tampoco pudo ser determinada por correlaciones NOE debido a la movilidad conformacional alrededor del enlace C-12–C-13, por lo que se cree con las mismas reservas que en el caso anterior, que es equivalente a la de la sodwanona L **49** con su correspondiente parte izquierda.

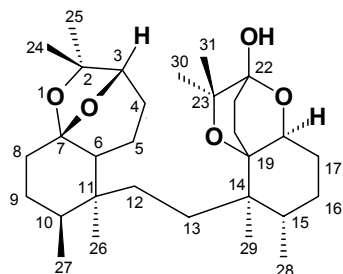


52 Sodwanona N



53 Sodwanona O

⁵⁰ A. Rudi, T. Yosief, M. Schleyer y Y. Kashman, *Tetrahedron*, **1999**, *55*, 5555.

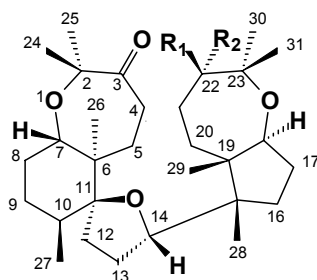


54 Sodwanona P

1.3.1.2. Compuestos con un puente modificado o reagrupado

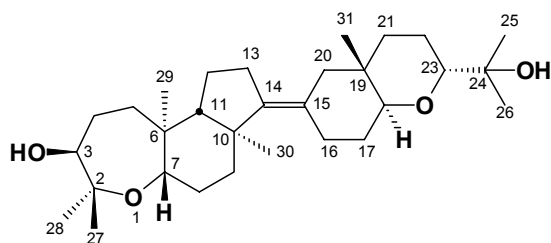
A partir de *Ptilocaulis spiculifer* recolectada en el Mar Rojo fueron aislados, junto con varias sodwanonas conocidas, **44**, **46**, y **51**, cinco nuevos triterpenos: la yardenona **55** y el abudinol **56** de una primera recolección,⁵¹ y la 22-dihidroyardenona **57**, el abudinol B **58** y la muzitona **59** de la segunda.⁵⁰ Las estructuras de los compuestos **55** y **56** fueron determinadas por interpretación de sus datos espectroscópicos y confirmadas, incluyendo sus estereoquímicas relativas, por análisis de difracción de rayos X. La comparación de los datos del compuesto **57** con los de los triterpenos anteriores sugirió una estrecha relación entre ellos. Los átomos del 1 al 19 que constituyen cuatro anillos, fueron idénticos a los presentes en la yardenona **55**, mientras que los átomos del quinto, un segundo anillo oxepano, se diferenció en que el grupo carbonilo había sido reemplazado por un grupo OH en C-22, hecho que fue confirmado por oxidación de Jones del compuesto **57** con Na₂Cr₂O₇-acetona para dar la yardenona **55**. La estereoquímica del grupo 22-OH estaría del mismo lado del anillo que el metino H-18. El abudinol B **58** mostró ser un isómero cercano del abudinol **56**, renombrado como abudinol A, donde el anillo E es también un oxepano en lugar de un tetrahidopirano como en el compuesto **56**. Esto fue confirmado por micro-acetilación de **58** para dar un diacetato, mientras que el abudinol A que tiene un grupo hidroxilo secundario y uno terciario da sólo un monoacetato.

⁵¹ A. Rudi, Z. Stein, I. Goldberg, T. Yosief, Y. Kashman y M. Schleyer, *Tetrahedron Lett.*, **1998**, *39*, 1445.

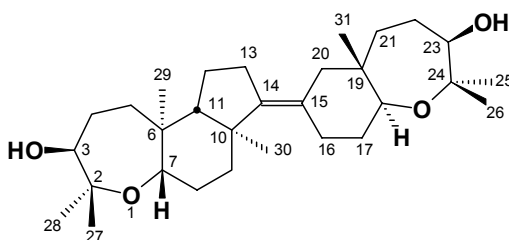


55 Yardenona; $R_1=R_2=O$

57 22-Dihidroyardenona; $R_1=H$; $R_2=OH$

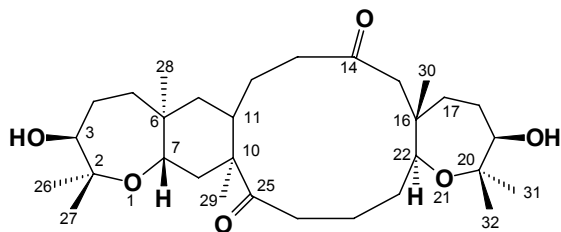


56 Abudinol



58 Abudinol B

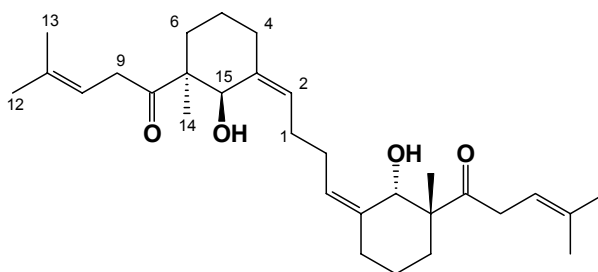
El último compuesto aislado fue un derivado tetracíclico designado muzitona **59** con dos sistemas hidroxitrimetil-oxepano, anillos A y D. El anillo A fusionado por un anillo ciclohexano adicional B (C-6-C-11), y cierra con el cuarto, un anillo cicloundecanodiona C que completa la estructura del compuesto **59**. Su estereoquímica fue sugerida sobre la base de correlaciones NOE comparadas con los datos obtenidos del abudinol y otros compuestos relacionados.



59 Muzitona

1.3.1.3. Compuestos con un puente butileno

El último grupo está constituido por una clase de triterpenos poco frecuente. El esqueleto escualénico parcialmente ciclado presente en estos compuestos, ha sido encontrado hasta ahora tan sólo en otro producto natural de origen marino no polietérico, la limatulona **60**, una sustancia de defensa obtenida de la lapa *Collisea limatula*.⁵²

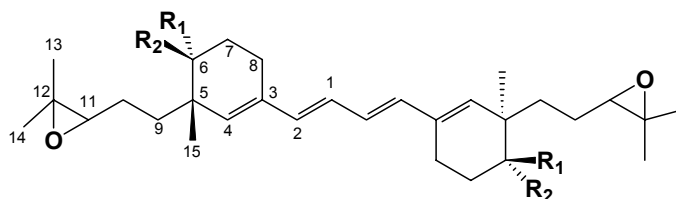


60 Limatulona

De una mezcla de especímenes de esponja de *Rhaphisia sp.*, orden Poecilosclerida, familia *Tedaniidae*, y de otra esponja clasificada como perteneciente al orden Axinellida, familia *Euryponidae*, recolectada en las Islas Nauru, fueron primeramente aislados dos nuevos alcoholes triterpénicos estereoisoméricos, los

⁵² K. F. Albizati, J. R. Pawlik y D. J. Faulkner, *J. Org. Chem.*, **1985**, *50*, 3428.

nauroles A **61** y B **62**.⁵³ Aunque el origen exacto de los nuevos productos es desconocido, sus estructuras poseen un esqueleto carbonado simétrico atípico centrado alrededor de una unidad tetraeno linealmente conjugada y con sólo dos anillos carbocíclicos. Sus estructuras fueron determinadas inicialmente a partir de sus datos espectroscópicos, revelando que los dos compuestos tienen una estructura prácticamente idéntica, el mismo esqueleto superponible y la misma geometría del doble enlace, diferenciándose en la estereoquímica del alcohol. Ambos resultaron medianamente tóxicos frente a células P-388, ED₅₀ de 4.6 y 4.4 µg/mL, respectivamente.



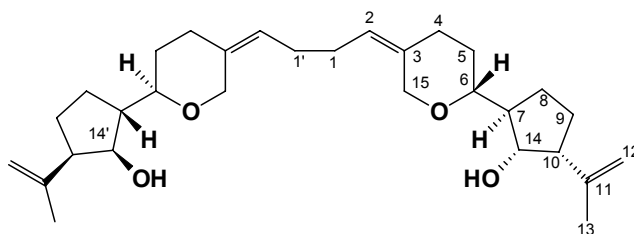
61 Naurole A; R₁=H; R₂=OH
62 Naurole B; R₁=OH; R₂=H

Por último, dos nuevos triterpenos, el testudinariol A **63** y el testudinariol B **64**, fueron aislados de la piel y el exudado del molusco *Pleurobranchus testudinarius*,⁵⁴ siendo el compuesto **63** el principal componente liposoluble de la secreción defensiva de aspecto mucoso producida por el molusco. La estructura de testudinariol A **63** ha sido asignada sobre la base de extensos estudios espectroscópicos. Su configuración absoluta en el centro C-14 fue determinada por aplicación de los métodos modificados de Mosher. El análisis de los espectros de RMN ¹H de los dos ésteres MTPA mostró que la quiralidad de C-14 (C-14') era *S*. El trabajo estructural sobre el metabolito minoritario también presente, el testudinariol B **64**, llevó al epímero de **63** en C-10. La presencia de **63** en la parte más externa del animal y en el exudado, es indicativa de que este compuesto podría actuar como agente defensivo del *Pleurobranchus testudinarius*. Además, el testudinariol A **63** ha

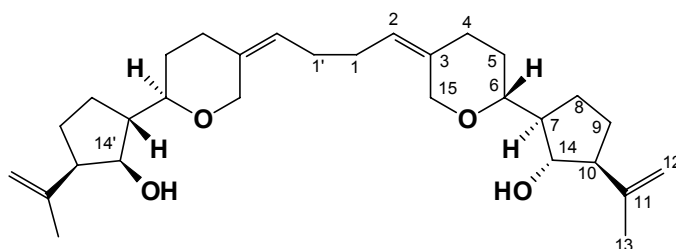
⁵³ F. Guzmán y F. J. Schmitz, *J. Org. Chem.*, **1991**, 56, 55.

⁵⁴ A. Spinella, E. Mollo, E. Trivellone y G. Cimino, *Tetrahedron*, **1997**, 53, 16891.

mostrado actividad ictiotóxica en el ensayo frente a *Gambusia affinis* a concentraciones de 10 ppm.



63 Testudinarol A



64 Testudinarol B

I.3.2. Consideraciones biogenéticas

El primer grupo de estos triterpenos comprende dos sistemas cíclicos separados obtenidos presumiblemente, en sifolanos y algunas sodwanonas, por dos ciclaciones separadas de triepoxi-escualenos **65**, o en la mayoría de los compuestos, de tetraepoxi-escualenos **66**. Se ha sugerido que cada ciclación lleva a la formación de un ion carbonio obtenido por protonación, bien de un epóxido o de uno de los dobles enlaces del escualeno (Esquema 4).

Parece que en el caso de los metabolitos con dos sistemas *trans*-perhidrobenzooxepina, como en el caso de la raspacionina **32** y compuestos relacionados, el precursor común podría ser el (2,3*S*,6*S*,7*S*,18*S*,19*S*,22*S*,23)-tetraepoxi-escualeno **66** a través de dos ciclaciones equivalentes. Cada proceso podría consistir en la protonación del epóxido terminal (2,3 ó 22,23), ciclación e hidroxilación de uno

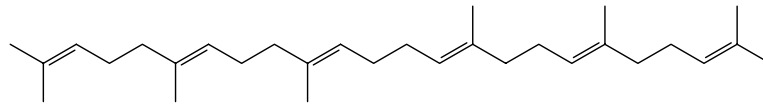
de los dobles enlaces centrales (10,11 ó 14,15, respectivamente) (Esquema 4). La raspacionina A **33** y la sodwanona F **46** podrían sufrir a continuación un desplazamiento 1,2 del grupo metilo en C-1 al C-11, inducido por la formación de un puente de oxígeno entre C-4 y C-1, dando un triterpeno reagrupado. De forma similar, una simple migración del metilo tendría lugar en la formación de la sodwanona M **48**.

El precursor propuesto para la formación de los sifolanos es el (2,3*S*,6*S*,7*S*,18*S*,19*S*)-triepoxi-escualeno **65**. Una ciclación en una forma equivalente a la de los metabolitos anteriores, debería involucrar el fragmento (2,3*S*,6*S*,7*S*)-diepóxido para dar el sistema característico *trans*-perhidrobenzooxepina de la mitad de la molécula de estos metabolitos. Por otro lado, el sistema octahidroazuleno podría generarse por el doble enlace 14,15 que promueve una ciclación al doble enlace terminal y el ataque al epóxido 18,19 protonado.

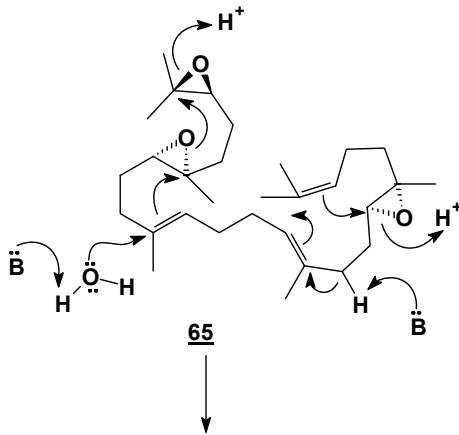
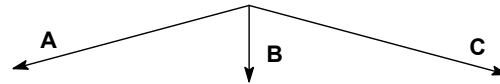
El sistema dioxabicyclo[2.2.2]octano presente en las sodwanonas L **49**, N **52**, O **53** y P **54** podrían haberse generado por ciclación de la segunda mitad del precursor escualeno **66**, como se observa en la ruta B.b del Esquema 4.

De especial interés en este grupo, ha sido el aislamiento de las sodwanonas I **51** y N **52** mostrando sistemas parcialmente ciclados, lo que indica, que la biogénesis clásica sugerida para los metabolitos anteriores envolviendo dos ciclaciones consecutivas, una para cada sistema aislado, al igual que sucedía con los metabolitos de *Laurencia* no debe ser concertada.

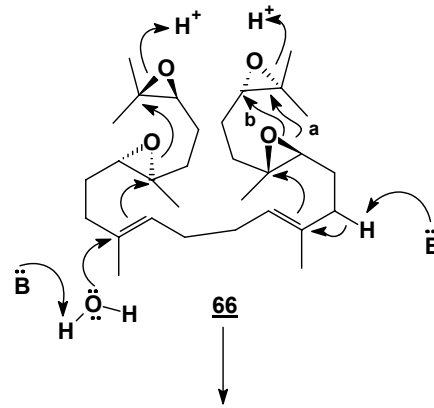
Rudi y col.⁵¹ han propuesto una biogénesis para los abudinoles A **56**, B **58** y la muzitona **59**. Es posible que el precursor tetraepoxi-escualeno **66** sufra una ciclación después de la funcionalización del Me-28 y así explicar la desaparición del octavo grupo metilo en los abudinoles y la muzitona. Las rutas a y b (Esquema 5) son alternativas para la formación tanto del anillo tetrahidropiránico como de un oxepano, dando los abudinoles A **56** y B **58**, respectivamente. Se sugiere además que un intermedio espiro es el precursor que permite explicar los grupos carboxilos en C-25 y C-14 en la estructura propuesta para la muzitona **59**.



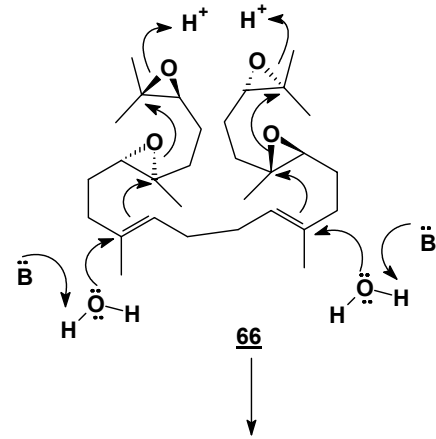
Escualeno



Sifolenonas

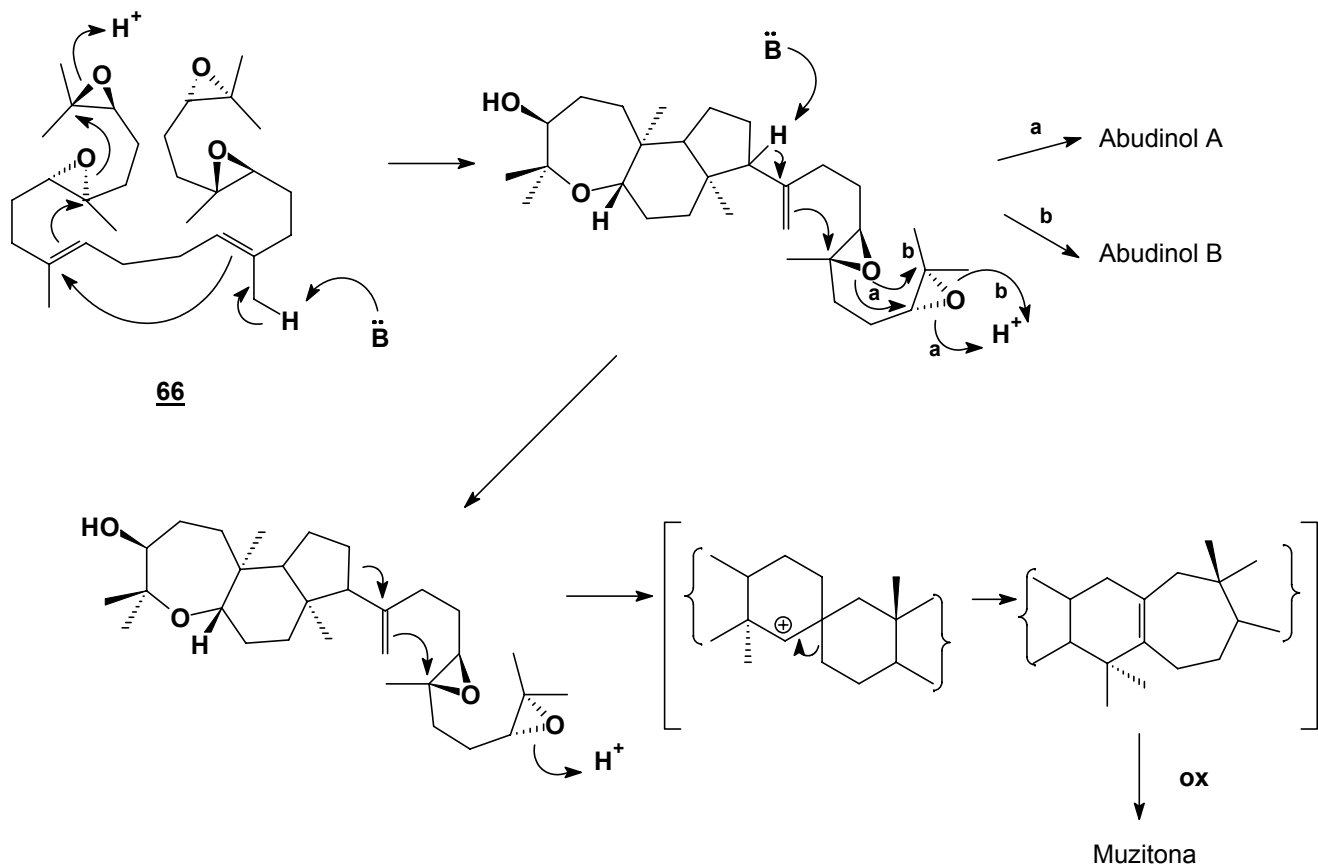


Sodwanonas



Raspacioninas

Esquema 4



Esquema 5

Para la formación del último grupo de compuestos, aquellos con un puente etileno, no se ha formulado ninguna interpretación biogénica. Sólo se ha mencionado que podría estar involucrada una ciclación parcial del precursor escualeno.

Finalmente, de los estudios recogidos en esta revisión bibliográfica, podemos concluir que los poliéteres triterpénicos de origen marino son únicos en sus estructuras y potentes actividades biológicas, lo que les confiere un importante potencial farmacológico y los convierte en herramientas útiles en la investigación biomédica.

II. NUEVOS POLIÉTERES TRITERPÉNICOS DE *LAURENCIA VIRIDIS*

II.1. INTRODUCCIÓN

Una de las líneas fundamentales de investigación de nuestro grupo en los últimos años, ha estado orientada hacia la búsqueda de nuevas moléculas de origen marino con actividad biológica, concretamente hacia aquellas sustancias con actividad citotóxica o con efectos antivirales. Tal y como se puede desprender de la lectura del Capítulo I de la presente memoria, las algas rojas del género *Laurencia* son de particular interés no sólo por lo novedoso de las estructuras de los metabolitos secundarios que producen, sino también por las interesantes actividades farmacológicas que éstos poseen. Dentro de dicho género, la especie inicialmente clasificada como *Laurencia pinnatifida*, y posteriormente descrita como una especie nueva, *Laurencia viridis*,²³ es uno de los ejemplos más representativos. De su estudio, se han aislado metabolitos de naturaleza tanto terpénica como no terpénica procedentes del metabolismo de los ácidos grasos.¹ Dentro de los compuestos de naturaleza terpénica destacan fundamentalmente los poliéteres triterpénicos derivados del escualeno, revelándose como la especie más prolífica en este tipo de sustancias.

Los estudios de estos triterpenos en esta especie, comenzaron en el año 1984 con el aislamiento e identificación del representante mayoritario de este grupo, el dehidrotirsiferol **3**,⁷ que mostró una potente y selectiva actividad frente a células de leucemia linfocítica de ratón P-388 con un $IC_{50}=0.01 \mu\text{g/mL}$. Diez años más tarde se realizó una nueva recolección y estudio que permitió la identificación de nueve metabolitos nuevos **13-21**,²⁴⁻²⁶ que además de estructuras novedosas, presentaron en su totalidad potentes actividades citotóxicas. A partir de sus datos espectroscópicos y farmacológicos, haciendo uso de cálculos de mecánica molecular y de simplificaciones moleculares, se llevó a cabo una búsqueda del “farmacóforo”. Como resultado se estableció una clara relación estructura-actividad y que la orientación de la cadena carbonada entre los carbonos C-14/C-19 condiciona en gran medida la potencia de la

actividad citotóxica de estos compuestos.³⁴ A la vista de estos resultados, se decidió profundizar en este estudio aislando e identificando nuevas sustancias y explorando nuevas posibilidades farmacológicas.

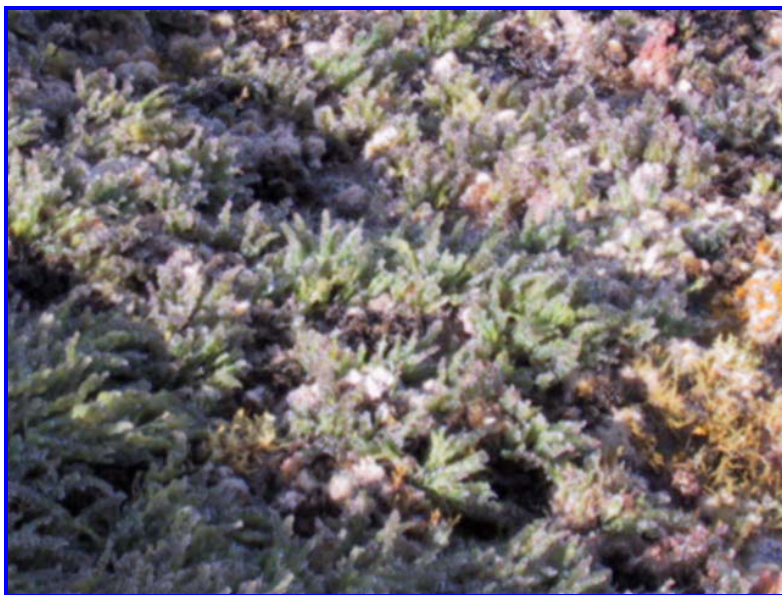
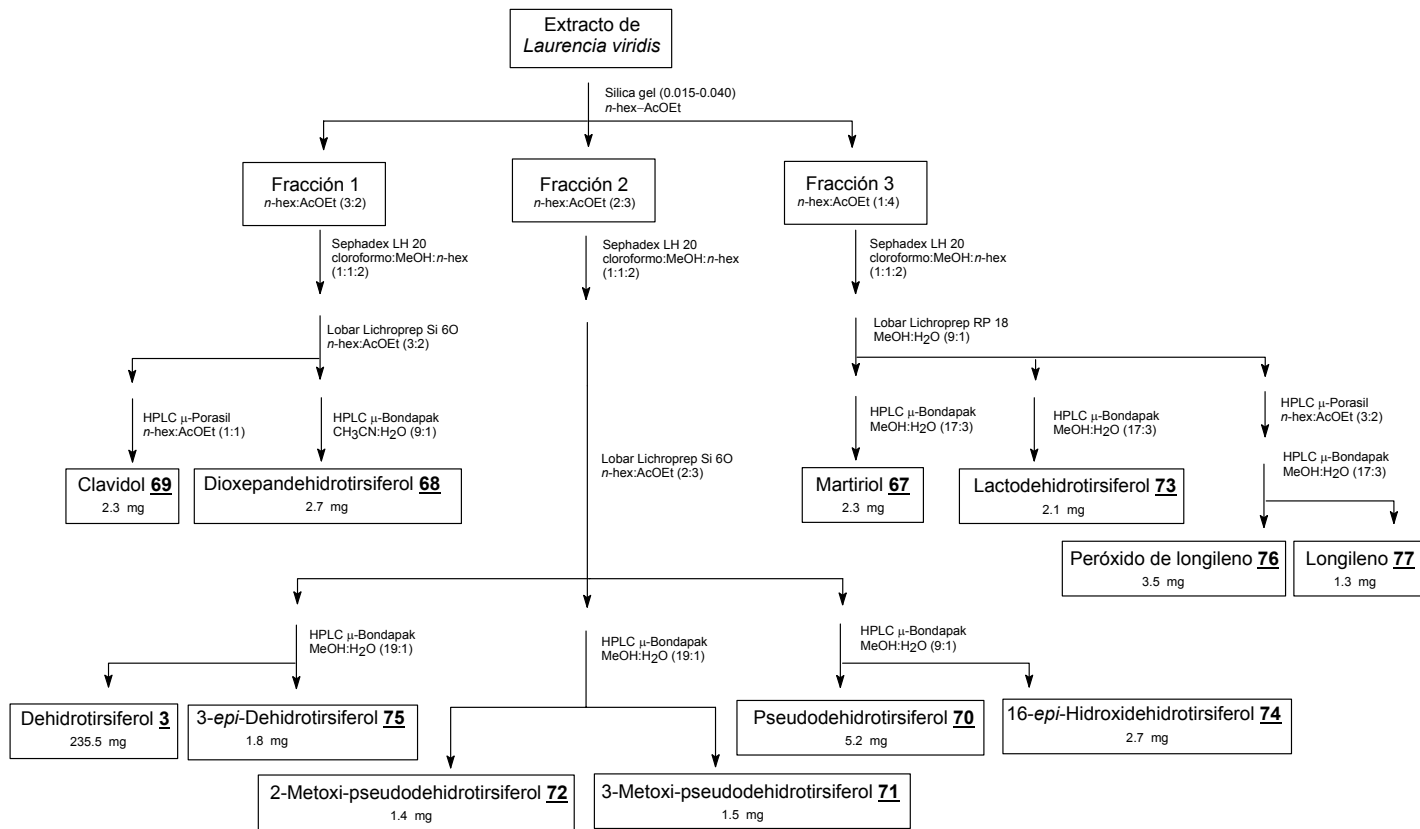


Figura 3.- Foto de la *Laurencia viridis* en Paraíso Floral (Adeje).

II.2. AISLAMIENTO

El alga *Laurencia viridis*, fue recolectada en Paraíso Floral (Adeje), entre los meses de Abril a Mayo (Figura 3). La recolección se realizó a mano durante la bajamar trasladándose inmediatamente en neveras hasta el laboratorio, donde se maceró con una mezcla de cloroformo:metanol (1:1) a temperatura ambiente durante cuatro días, y seguidamente, una vez seca y triturada, mediante soxhlet se extrajo con diclorometano hasta agotamiento. Las mezclas de disolventes fueron evaporadas y la reunión de los extractos resultante se fraccionó de acuerdo con la pauta indicada en el siguiente esquema cromatográfico (Esquema 6).



Esquema 6

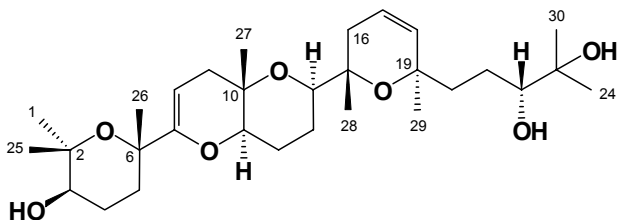
Del estudio cromatográfico de las fracciones de *n*-hexano:acetato de etilo 3:2→1:4 del extracto del alga *Laurencia viridis* fueron aislados, además del dehidrotirsiferol **3** y varios de los metabolitos conocidos en este alga relacionados con el tirsiferol **1**, diez nuevos poliéteres derivados del escualeno: el martiriol **67**,⁵⁵ el dioxepandehidrotirsiferol **68**, el clavidol **69**, el pseudodehidrotirsiferol **70** y los derivados metoxilados **71-72**, el lactodehidrotirsiferol **73**, el 16-*epi*-hidroxidehidrotirsiferol **74**, el 3-*epi*-dehidrotirsiferol **75**, el peróxido de longileno **76** y el longileno **77**. Es de destacar, que estos derivados introdujeron importantes variaciones estructurales respecto a los triterpenos aislados previamente de este alga, y en general, con respecto al tipo de esqueletos aislados hasta ahora de *Laurencia*, como queda recogido en el primer capítulo de esta memoria. Señalar también, que curiosamente en este estudio no se aisló ningún derivado de la serie del venustatriol **6**, lo que quizás se deba a que la recogida del alga se realizó un poco más tarde de lo habitual, cuando empezaba a decaer, o bien, a que se ha observado la aparición de nuevos híbridos en la colonia.

II.3. ESTUDIO DE ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL

II.3.1. Martiriol **67**

El martiriol **67** fue aislado como un sólido amorfo $[\alpha]_D^{25} = +4$ (*c* 0.03, CHCl₃) y la fórmula molecular determinada como C₃₀H₅₀O₇ en base a la fragmentación observada en su espectro de masas. El espectro de RMN ¹³C confirmó la fórmula molecular y mostró la presencia de ocho grupos metilos, ocho metilenos y siete grupos metinos, junto con la de siete carbonos cuaternarios situados en la posición α a átomos de oxígeno (Tabla 2).

⁵⁵ C.P. Manríquez, M. L. Souto, J. A. Gavín, M. Norte y J. J. Fernández, *Tetrahedron*, **2001**, *57*, 3117.



67 Martiriol

En el espectro de RMN ^1H se pudieron apreciar cuatro señales correspondientes a metinos centrados a δ_{H} 3.85, 3.96, 3.99 y 4.06, los cuales fueron identificados como H-22, H-11, H-3 y H-14, respectivamente, por comparación con los datos espectroscópicos de otros metabolitos relacionados. Junto a estas señales fueron observadas las pertenecientes a tres protones olefínicos centradas a δ_{H} 5.34 (H-8), 5.64 (H-18) y 5.66 (H-17), así como las de dos pares de metilenos diastereotópicos, uno de ellos a δ_{H} 1.90 y 2.05 correspondiente a los protones H_2 -9, y el otro a δ_{H} 2.07 y 2.23 correspondiente a los protones H_2 -16 (Tabla 2).

Un análisis detallado de los espectros DQF-COSY y TOCSY del martiriol **67**, nos permitió establecer cinco fragmentos parciales, C-3 \rightarrow C-5, C-8 \rightarrow C-9, C-11 \rightarrow C-14, C-16 \rightarrow C-18 y C-22 \rightarrow C-20, dispuestos como se muestra en la Figura 4.

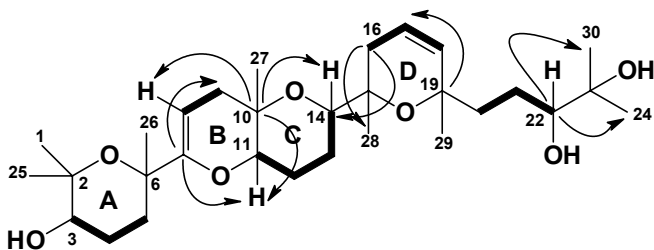


Figura 4.- Estructuras parciales del martiriol **67** obtenidas del estudio de los espectros DQF-COSY y TOCSY. Representación mediante flechas de las conectividades más importantes observadas en el espectro HMBC.

Por otra parte, a través del experimento HMBC se lograron conectar estas estructuras parciales, junto con los carbonos cuaternarios y los grupos metilo. Este

análisis puede ser convenientemente iniciado en el carbono cuaternario C-10 (δ_C 85.9), el cual fue correlacionado con los protones en δ_H 5.34 (H-8, dd, $J=2.0$ y 6.0 Hz), 3.96 (H-11, dd, $J=6.0$ y 10.0 Hz), 4.06 (H-14, dd, $J=5.7$ y 10.3 Hz) y 1.12 (H₃-27, s) (Figuras 4 y 5). Además, las conectividades del carbono C-7 (δ_C 170.5) con los protones H₂-9 y H-11 indicaron que este compuesto posee un inusual sistema enol-éter en el anillo B en los carbonos C-7–C-8. Por otro lado, las correlaciones en el espectro HMBC del carbono alílico C-16 (δ_C 41.5) con los protones H-14 y H₃-28 (δ_H 1.19, s), y las del carbono C-19 (δ_C 70.6) con H-17, H-18 y H₃-29 (δ_H 1.30, s) permitieron localizar el cuarto sistema de anillos presente en la molécula. Este anillo D está formado por un enlace éter entre los carbonos cuaternarios C-15 y C-19.

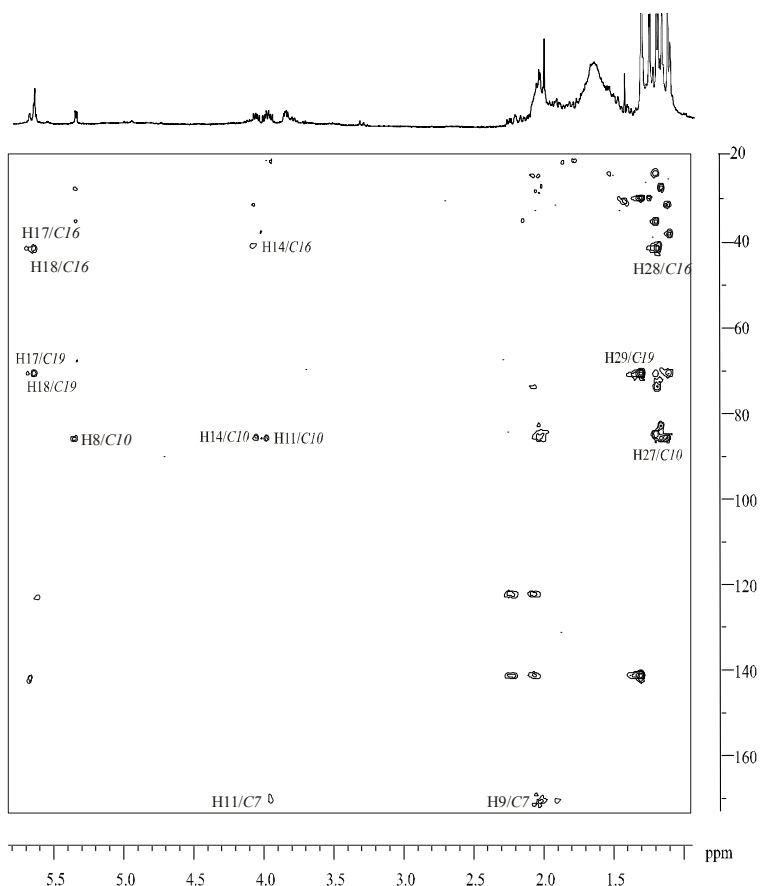


Figura 5.- HMBC del martiriol **67**.

Nº C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	J (Hz)
1	29.7	1.21	s	
2	85.7			
3	82.8	3.99	dd	6.0; 10.0
4	28.1	1.52		
		1.93		
5	35.0	1.78		
		2.06		
6	85.2			
7	170.5			
8	98.8	5.34	dd	2.0; 6.0
9	35.2	1.90	dd	2.0; 12.0
		2.05	dd	6.0; 12.0
10	85.9			
11	84.5	3.96	dd	6.0; 10.0
12	21.2	1.78		
		2.03		
13	29.1	1.55		
		1.98		
14	85.7	4.06	dd	5.7; 10.3
15	73.8			
16	41.5	2.07	dd	5.3; 13.0
		2.23	dd	2.7; 13.0
17	122.2	5.66	ddd	5.3; 2.7; 11.0
18	141.1	5.64	d	11.0
19	70.6			
20	31.4	1.56		
		2.07		
21	25.8	1.92		
		2.06		
22	84.3	3.85	dd	4.5; 7.5
23	70.6			
24	24.0	1.12	s	
25	24.9	1.16	s	
26	21.2	1.20	s	
27	29.8	1.12	s	
28	24.8	1.19	s	
29	29.7	1.30	s	
30	28.0	1.18	s	

Tabla 2.- RMN ^{13}C y ^1H del martiriol **67**.

Una característica importante a resaltar en este compuesto desde el punto de vista biogénico, como veremos más adelante, es la sustitución del átomo de bromo en el carbono C-3 por un grupo hidroxilo. Este dato fue obtenido a través del experimento HSQC y las correlaciones a largo alcance observadas en el experimento HMBC. Por último, en función de las restantes correlaciones observadas en estos experimentos se completó el esqueleto carbonado asignado al martiriol **67** (Figura 4, Tabla 2).

La estereoquímica relativa de este compuesto fue propuesta en base a las correlaciones selectivas observadas en el espectro NOESY y los valores de las constantes de acoplamiento ^1H - ^1H . La magnitud de $J_{3,4\alpha}=6.0$ Hz y $J_{3,4\beta}=10.0$ Hz, así como la correlación NOE entre H-3 y los protones H₃-1 sugirió que la estereoquímica relativa en C-3 es R^* . Además, la interacción NOE entre el protón H-11 y H-14 confirmó el sistema característico en este tipo de metabolitos *silla/bote* flexible para los anillos B y C. Esto implica que las estereoquímicas relativas en esta región de la molécula deben ser por tanto, C-6 S^* , C-10 S^* , C-11 R^* y C-14 R^* . La ausencia de una interacción NOE entre H₃-28 y H₃-29 indicó que la estereoquímica relativa en la unión éter del anillo D debe ser *trans*. El hecho de que las constantes de acoplamiento de H-22 fuesen $J_{22,21\alpha}=4.5$ Hz y $J_{22,21\beta}=7.5$ Hz, así como la presencia de protones diastereotópicos H₂-21 y la correlación NOE entre H-18 y H-22, permitieron deducir que el alcohol secundario está unido con el oxígeno del anillo pirano formando un enlace por puente de hidrógeno tal y como se observa en la Figura 6.

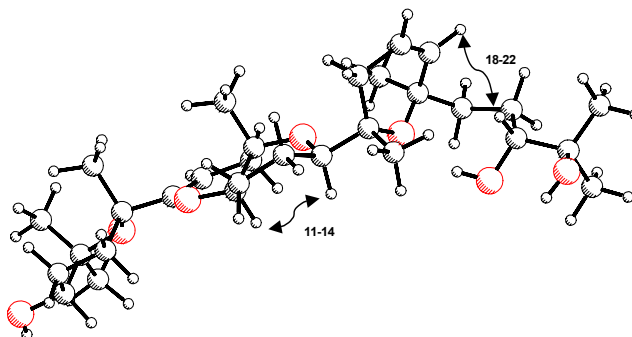
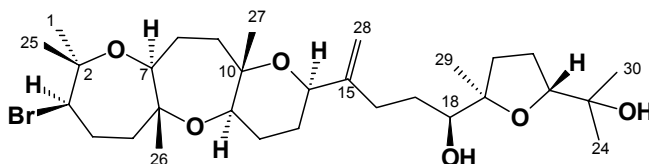


Figura 6.- Conformación de mínima energía obtenida para el martiriol **67**. Se representan también las correlaciones NOE más significativas entre H-11 y H-14 y entre H-18 y H-22.

II.3.2. Dioxepandehidrotirsiferol **68**

El compuesto **68**, dioxepandehidrotirsiferol, se obtuvo también como un sólido amorfo de color blanco. El análisis del espectro de masas de este metabolito mostró un ion molecular consistente con la fórmula molecular $C_{30}H_{51}O_6^{81}Br$ (obs. a m/z 588.282410; calc. 588.284855).



68 Dioxepandehidrotirsiferol

En la asignación estructural de este compuesto ayudó la considerable analogía espectroscópica con el dehidrotirsiferol **3** (Tablas 3 y 4). Así, la principal variación entre los espectros de RMN 1H de los compuestos **68** y **3** fueron los desplazamientos a campo bajo de las señales correspondientes a los protones H-3 (δ_H 4.16, dd, $J=2.0$ y 10.2 Hz) y H-7 (δ_H 3.53, dd, $J=1.0$ y 10.3 Hz), así como una diferencia apreciable en la constante de acoplamiento de H-3 con respecto a la de otros productos de esta serie como el dehidrotirsiferol con un anillo A tetrahidropiránico. Asimismo, los protones de los grupos metilos C-1, C-25 y C-26, en este caso, aparecieron centrados a δ_H 1.32, 1.34 y 1.10, respectivamente.

Estos datos sugieren que las modificaciones en este compuesto están localizadas principalmente en los anillos A y B.

Las conectividades observadas en los experimentos COSY y HSQC hicieron posible la asignación del fragmento C-1→C-11 como sigue δ_C : 24.6 (C-1), 59.5 (C-3), 31.6 (C-4), 40.1 (C-5), 76.0 (C-7), 28.4 (C-8), 41.1 (C-9) y 71.2 (C-11) (Figura 7).

n° C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	J (Hz)
1	31.0	1.27	s	
2	74.9			
3	59.0	3.89	dd	4.1; 12.6
4	28.2	2.13		
		2.26		
5	37.1	1.52		
		1.80		
6	74.4			
7	86.7	3.08	dd	2.5; 11.0
8	22.9	1.49		
		1.76		
9	38.7	1.44		
		1.77		
10	72.9			
11	78.9	3.43	dd	5.7; 11.3
12	21.8	1.60		
		1.81		
13	26.6	1.86		
		2.11		
14	72.5	4.28	dd	4.0; 8.1
15	151.3			
16	29.9	2.12		
		2.43		
17	30.3	1.45		
		1.63		
18	76.2	3.52	dd	1.7; 10.4
19	86.0			
20	31.7	1.60		
		2.12		
21	26.3	1.84 (2H)		
22	87.6	3.76	dd	6.0; 9.9
23	70.5			
24	24.0	1.12	s	
25	23.6	1.39	s	
26	20.1	1.20	s	
27	19.4	1.23	s	
28	109.8	4.88	bs	
		5.05	bs	
29	23.7	1.14	s	
30	27.7	1.21	s	

Tabla 3.- RMN ^{13}C y ^1H del dehidrotirsiferol **3**.

n° C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	J (Hz)
1	24.6	1.32	s	
2	77.8			
3	59.5	4.16	dd	2.0; 10.2
4	31.6	2.10		
		2.20		
5	40.1	1.60		
		1.76		
6	78.9			
7	76.0	3.53	dd	1.0; 10.3
8	28.4	1.43		
		1.83		
9	41.1	1.50		
		1.69		
10	78.0			
11	71.2	3.49	dd	5.1; 11.5
12	24.3	1.51		
		1.73		
13	26.8	1.84		
		2.04		
14	70.2	4.10	dd	5.5; 5.7
15	150.5			
16	29.8	2.23		
		2.44		
17	30.0	1.40		
		1.63		
18	76.1	3.50	dd	1.7; 9.9
19	86.1			
20	31.6	1.81		
		2.10		
21	26.6	1.57		
		1.86		
22	87.6	3.73	dd	5.8; 10.2
23	70.5			
24	24.0	1.11	s	
25	25.4	1.34	s	
26	20.6	1.10	s	
27	19.0	1.15	s	
28	109.8	4.86	bs	
		4.98	bs	
29	23.8	1.12	s	
30	27.7	1.20	s	
OH-18		2.35	s	

Tabla 4.- RMN ^{13}C y ^1H del dioxepandehidrotirsiferol **68**.

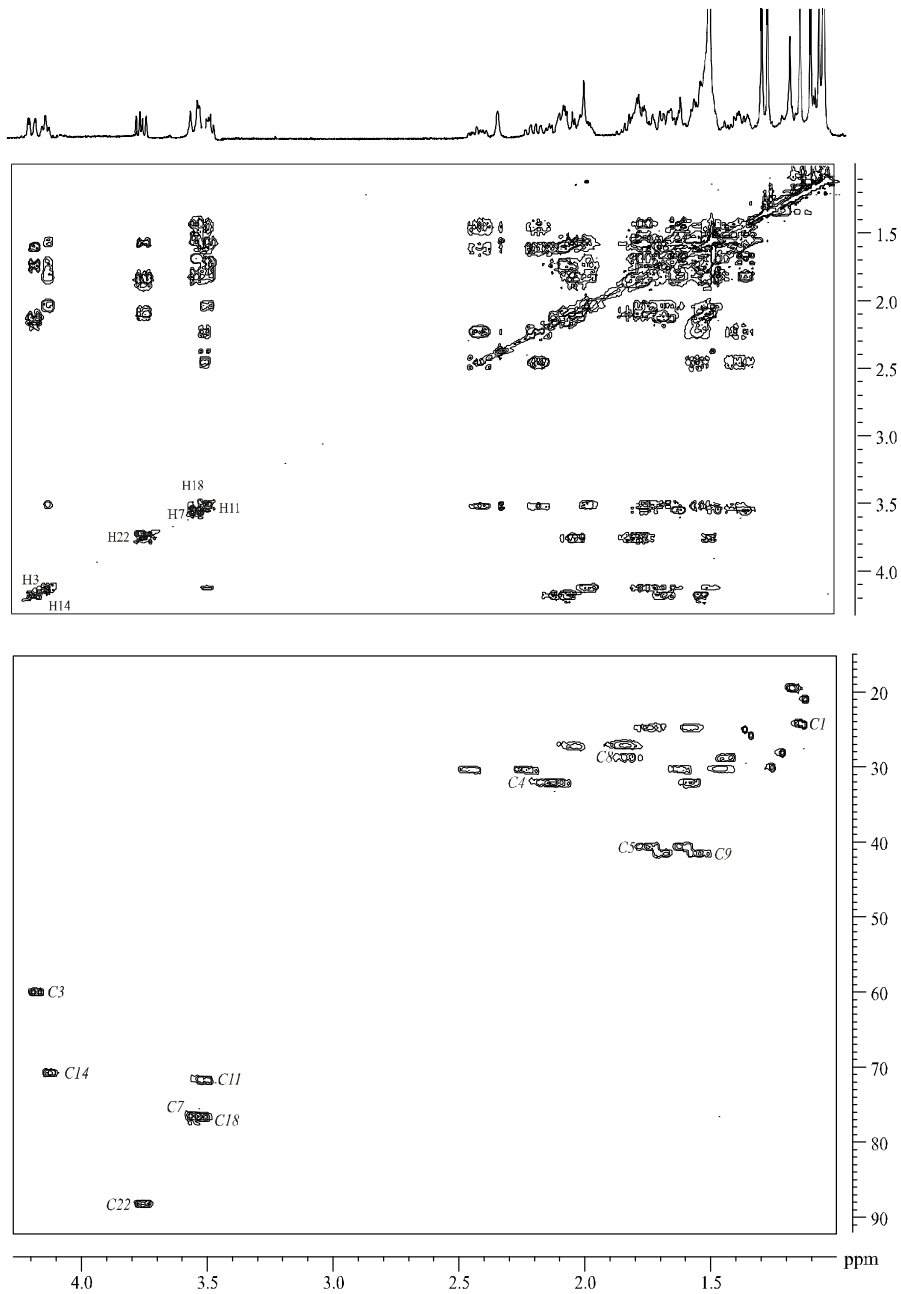


Figura 7.- COSY y HSQC del dioxepandehidrotirsiferol **68**.

Las señales correspondientes a los carbonos cuaternarios C-O en C-2, C-6 y C-10 fueron identificadas a δ_C 77.8, 78.9 y 78.0 por sus correlaciones observadas en el experimento HMBC con H-3, H-7 y H-11, respectivamente (Figura 8). Además, en este experimento fue posible conectar el carbono C-2 (δ_C 77.8) con el protón H-7 (δ_H 3.53), y el carbono C-6 (δ_C 78.9) con el protón H-11 (δ_H 3.49).

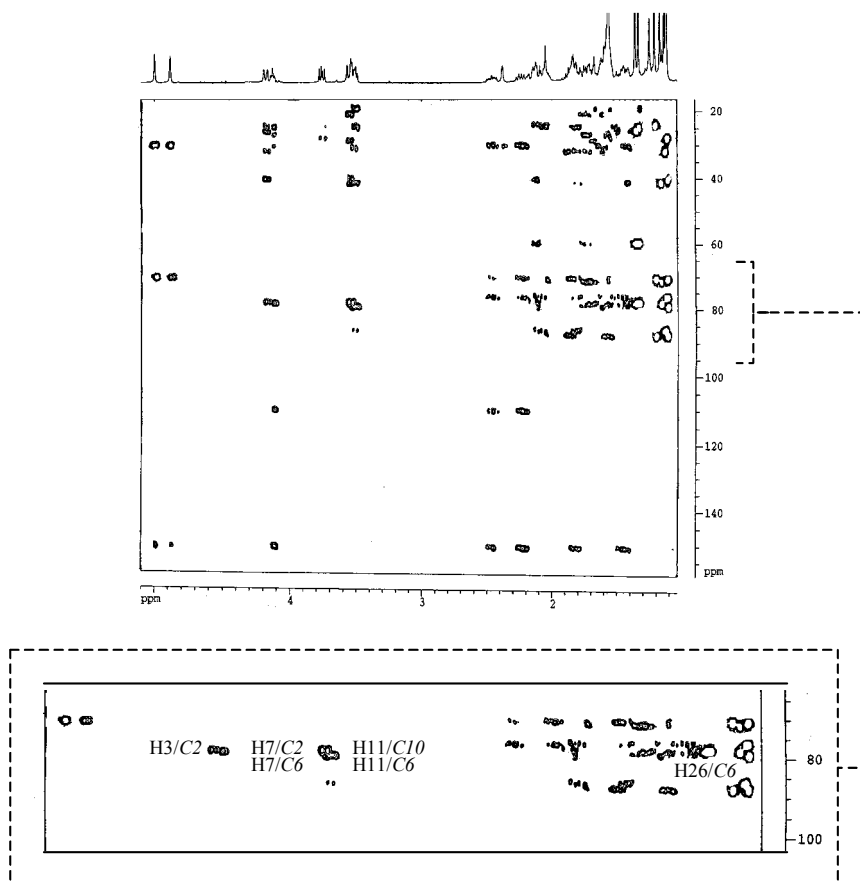


Figura 8.- HMBC del dioxepandehidrotirsiferol **68** y expansión de la zona señalada.

Estos hechos pueden ser solamente explicados por la presencia de tres éteres cíclicos fusionados (anillos A, B, C) en el compuesto **68** como muestra la Figura 9. Este agrupamiento se asemeja a los fragmentos observados en las toxinas de origen

marino tales como brevetoxinas, hemibrevetoxina y ciguatoxinas.⁵⁶ En esta figura se muestra la conformación que adoptan los anillos A, B, C, basándonos en las constantes de acoplamiento y las correlaciones ROE observadas que indican que la estereoquímica relativa en C-3, C-6, C-7, C-10 y C-11 debe ser *R**, *R**, *S**, *S** y *R** respectivamente.

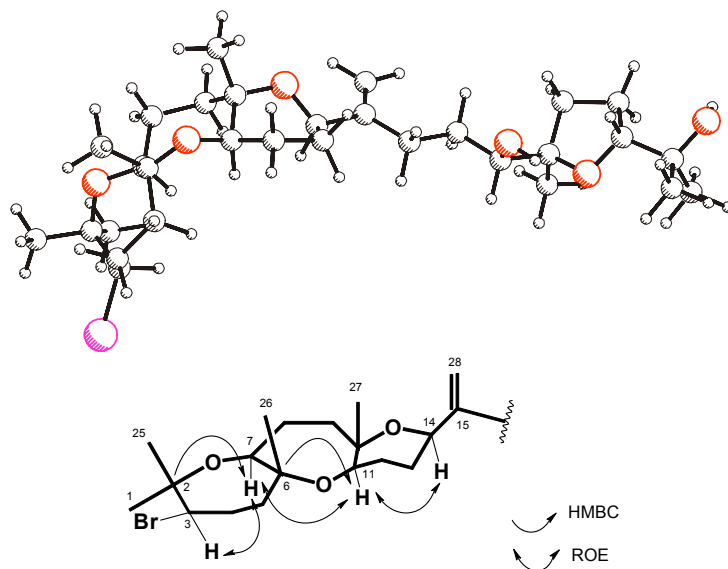


Figura 9.- Conformación de mínima energía calculada para el dioxepandehidrotirsiferol **68**. Correlaciones más importantes observadas en los espectros ROESY y HMBC.

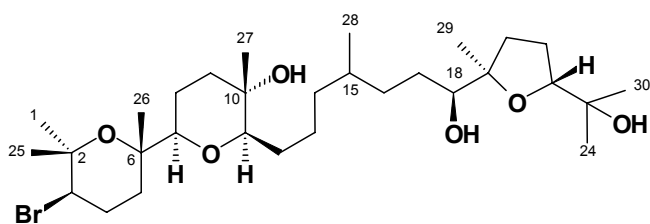
II.3.3. Clavidol **69**

El clavidol **69** fue aislado como un sólido blanco amorfo, $[\alpha]_D^{25} = +1.1$ (*c* 0.18, CHCl_3), estableciéndose su fórmula molecular como $\text{C}_{30}\text{H}_{55}\text{O}_6\text{Br}$ mediante espectrometría de masas. Así en el espectro FAB se pudo observar dos picos isotópicos de ión molecular a m/z 592/590 y el correspondiente al $\text{M}^+ + \text{Na}$ a m/z 615.

En la zona baja del espectro de RMN ^1H se apreciaron las señales de cinco grupos metinos centradas a δ_{H} 3.95, 3.83, 3.76, 3.73 y 3.04 asignables a los protones

⁵⁶ A. H. Daranas, M. Norte, J. J. Fernández, *Toxicon*, **2001**, 39, 1101

H-11, H-3, H-18, H-22 y H-7, respectivamente, y que se asignaron inicialmente por comparación con otros metabolitos de la serie del tirsiferol aislados previamente de este alga,^{7,24-26} ya que mostraron desplazamientos y constantes de acoplamiento muy parecidas (Tabla 5).



69 Clavidol

El hecho más importante observado fue la ausencia de protones olefinicos y la presencia de una señal doblete correspondiente a un grupo metilo centrada a δ_H 0.82 (H₃-28, d, J=6.4 Hz). El análisis de los experimentos COSY y TOCSY, comenzando estratégicamente en las señales de los metinos anteriormente mencionados, nos permitió establecer los cuatro fragmentos estructurales siguientes: C-3→C-5, C-7→C-9, C-11→C-18, C-22→C-20 (Figuras 10 y 11).

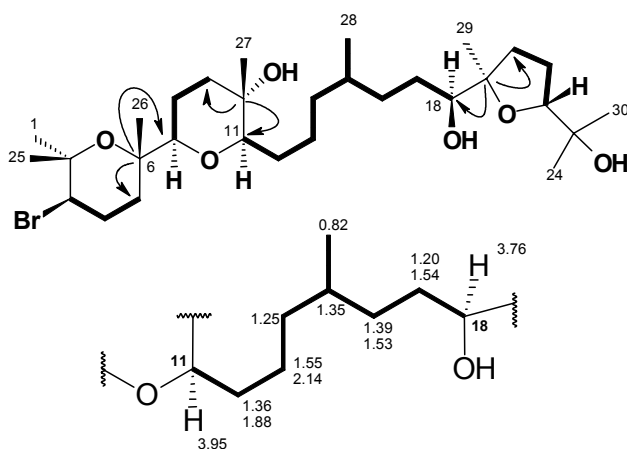


Figura 10.- Estructuras parciales obtenidas de las correlaciones observadas en los espectros COSY y TOCSY del clavidol **69** y conectividades más importantes del espectro HMBC. Desplazamientos químicos de los protones que constituyen el fragmento C-11→C-18.

n° C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	J (Hz)
1	31.6	1.23	s	
2	75.1			
3	59.2	3.83	dd	4.0; 12.3
4	28.3	2.08		
		2.22		
5	37.0	1.47		
		1.75		
6	74.9			
7	85.9	3.04	dd	2.5; 11.5
8	23.2	1.45		
		1.75		
9	38.7	1.57		
		1.77		
10	70.1			
11	75.5	3.95	dd	8.0; 9.8
12	20.0	1.36		
		1.88		
13	27.7	1.55		
		2.14		
14	28.9	1.25 (2H)		
15	38.7	1.35		
16	27.3	1.39		
		1.53		
17	27.0	1.20		
		1.54		
18	74.5	3.76	dd	2.2; 13.0
19	84.9			
20	32.8	1.50		
		2.11		
21	26.6	1.79 (2H)		
22	87.0	3.73	dd	6.0; 10.0
23	71.9			
24	24.3	1.10	s	
25	23.6	1.37	s	
26	20.1	1.17	s	
27	30.9	1.24	s	
28	16.9	0.82	d	6.4
29	24.3	1.10	s	
30	29.3	1.24	s	

Tabla 5.- RMN ^{13}C y ^1H del clavidol **69**.

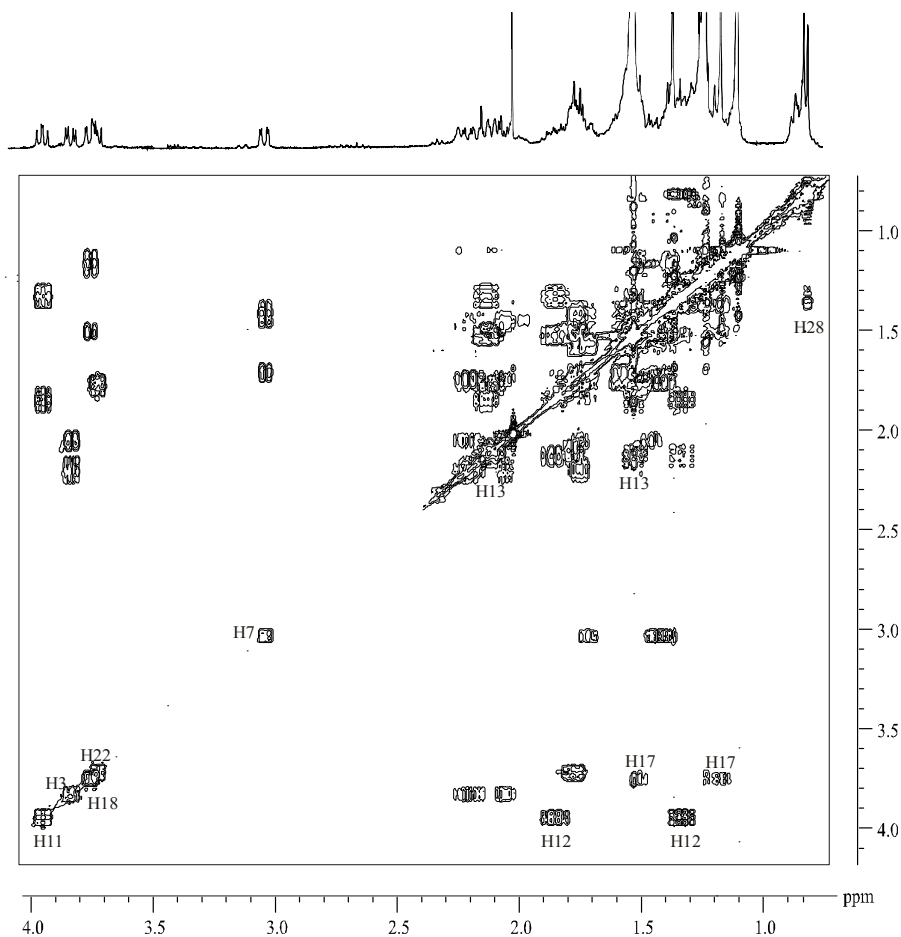


Figura 11.- COSY del clavidoide **69**.

Estos datos fijan la diferencia con el resto de los metabolitos aislados hasta el momento en el fragmento C-11→C-18. Así, esta estructura parcial puede construirse basada en las conectividades siguientes. Tomando como punto de partida el metino H-11 (δ_H 3.95, dd, $J=8.0$ y 9.8 Hz), éste presenta conectividades con el metileno H₂-12 (δ_H 1.36 y 1.88), que a su vez puede ser conectado con H₂-13 (δ_H 1.55 y 2.14). Así mismo, de forma consecutiva, H₂-13 se conecta con H₂-14 (δ_H 1.25) y este último con el metino H-15 (δ_H 1.35). El metino H-15 presentó además conectividades con H₂-16 (δ_H 1.39 y 1.53) y H₃-28 (δ_H 0.82). Finalmente, los acoplamientos que terminan de

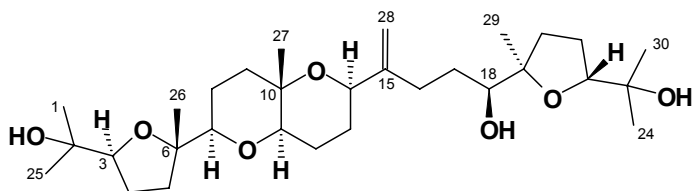
configurar este fragmento son los observados para H₂-16 con H₂-17 (δ_{H} 1.20 y 1.54) y los de H₂-17 con H-18 (δ_{H} 3.76, dd, $J=2.2$ y 13.0 Hz) (Figuras 10 y 11).

Las correlaciones observadas en el experimento de HMBC a partir de los carbonos cuaternarios: C-6 (δ_{C} 74.9) con H₂-5 (δ_{H} 1.47 y 1.75), H-7 (δ_{H} 3.04, dd, $J=2.5$ y 11.5 Hz) y H₃-26 (δ_{H} 1.17); C-10 (δ_{C} 70.1) con H-11, H₂-9 (δ_{H} 1.57 y 1.77) y H₃-27 (δ_{H} 1.24); y C-19 (δ_{C} 84.9) con H-18, H₂-20 (δ_{H} 1.50 y 2.11) y H₃-29 (δ_{H} 1.10) nos permitieron conectar las estructuras parciales anteriormente descritas. El resto de las señales observadas en los experimentos de RMN 2D establecieron de forma inequívoca la estructura plana del clavido **69** tal y como se observa en la Figura 10.

La estereoquímica relativa propuesta para los carbonos C-3, C-6, C-7, C-10, C-11, C-18, C-19 y C-22 es idéntica a la que presentan los compuestos de la serie del tirsiferol y se asignó en base a las constantes de acoplamiento y a las conectividades observadas en el experimento ROESY. La estereoquímica relativa en C-15 permanece aún sin determinar.

II.3.4. Pseudodehidrotirsiferol **70**

El compuesto **70**, el pseudodehidrotirsiferol, fue también aislado como un sólido amorfo de color blanquecino, $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -13.1$ (c 0.13, CHCl₃), y resultó ser un isómero del martiriol **67**, como se estableció en base al ion molecular de su espectro de masas de alta resolución (HRMS, obs. a m/z 524.37107, calc. 524.37130, C₃₀H₅₂O₇).



70 Pseudodehidrotirsiferol

n° C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	J (Hz)
1	24.0	1.11	s	
2	70.6			
3	86.7	3.76	dd	5.8; 9.1
4	26.3	1.84 (2H)		
5	35.2	1.66 2.04		
6	84.0			
7	84.0	3.32	dd	2.6; 11.4
8	24.5	1.51 1.66		
9	38.7	1.57 1.81		
10	72.8			
11	78.9	3.46	dd	5.6; 11.7
12	21.8	1.65 1.84		
13	26.4	1.85 2.08		
14	72.5	4.29	dd	4.2; 7.1
15	151.3			
16	29.7	2.20 2.46		
17	29.9	1.48 1.64		
18	76.2	3.53	dd	1.5; 10.8
19	86.1			
20	31.6	1.58 2.10		
21	26.5	1.83 (2H)		
22	87.6	3.76	dd	6.5; 9.8
23	70.4			
24	23.9	1.13	s	
25	27.5	1.19	s	
26	22.7	1.14	s	
27	19.4	1.25	s	
28	109.9	4.89 5.05	bs bs	
29	23.7	1.14	s	
30	27.7	1.21	s	
OH-18		2.38	s	

Tabla 6.- RMN ^{13}C y ^1H del pseudodehidrotirsiferol **70**.

Sus datos espectroscópicos resultaron similares a los del dehidrotirsiferol **3** (Tabla 3), lo cual ayudó significativamente en la asignación de la estructura para este producto. El compuesto **70** se distingue del **3** en el desplazamiento de los protones H-3 (δ_H 3.76), H₂-4 (δ_H 1.84), H₂-5 (δ_H 1.66 y 2.04), H₃-1 (δ_H 1.11) y H₃-25 (δ_H 1.19) que fija la diferencia entre ambos en el anillo A (Tabla 6).

Las señales observadas en el experimento HSQC para este fragmento (Figura 12), mostraron las correlaciones siguientes δ_C : 24.0 (C-1), 86.7 (C-3), 26.3 (C-4), 35.2 (C-5) y 27.5 (C-25).

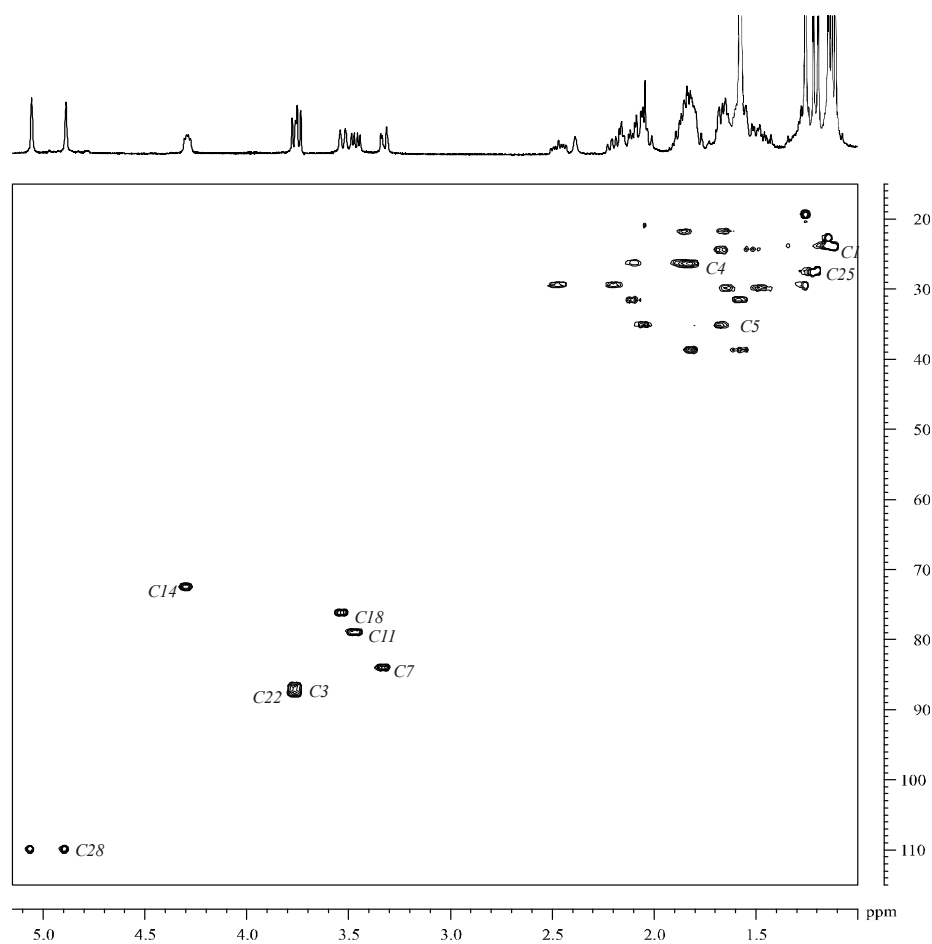


Figura 12.- HSQC del pseudodehidrotirsiferol **70**.

Los carbonos cuaternarios C-2 y C-6 fueron asignados sobre la base de sus correlaciones HMBC a δ_C 70.6 y 84.0, respectivamente (Figura 13). Todo esto sugiere que el sistema de anillo A, que usualmente es un tetrahidropirano, ha cambiado en este compuesto a un sistema de anillo tetrahydrofuránico formado por un puente éter entre los carbonos C-3 y C-6.

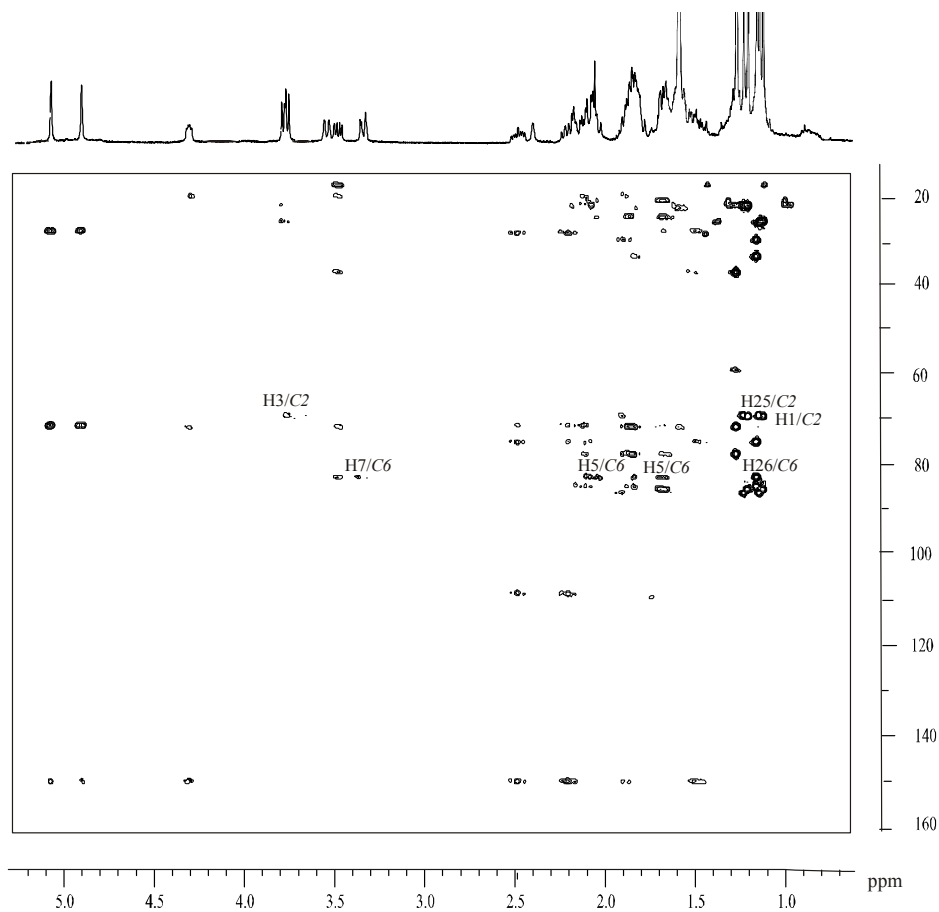


Figura 13.- HMBC del pseudodehidrotirsiferol **70**.

Las correlaciones ROE de H-3 (δ_H 3.76) con H₃-1 (δ_H 1.11), H₃-25 (δ_H 1.19) y H-7 (δ_H 3.32), así como la no correlación con H₃-26 (δ_H 1.14), estableció una orientación opuesta entre el grupo metilo H₃-26 y el protón metino H-3, lo que nos indicó que la configuración relativa en C-3 es *S** (Figuras 14 y 15).

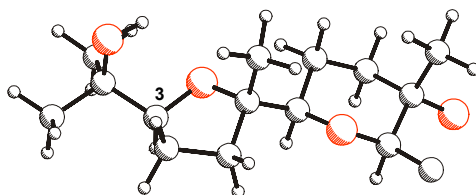


Figura 14.- Estructura parcial correspondiente a los anillos A y B del pseudodehidrotirsiferol **70** donde se puede apreciar la estereoquímica relativa propuesta en el carbono C-3.

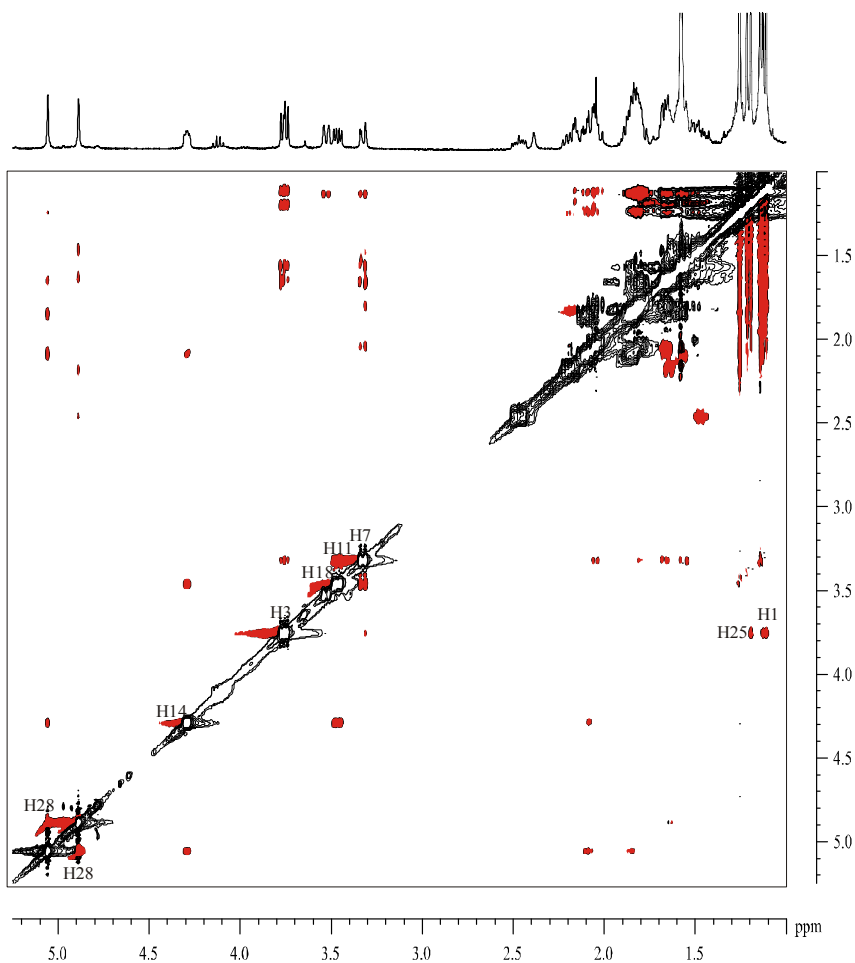
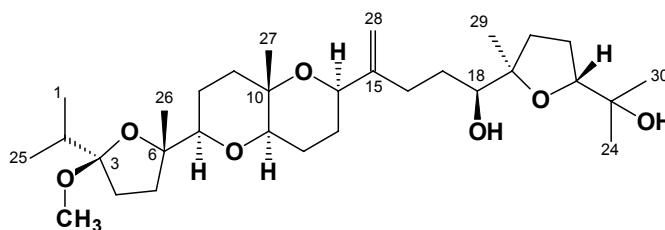


Figura 15.- ROESY del pseudodehidrotirsiferol **70**.

II.3.5. 3-Metoxi-pseudodehidrotirsiferol **71**

El siguiente compuesto, que denominamos 3-metoxi-pseudodehidrotirsiferol **71**, fue aislado como un sólido amorfo de color blanquecino, $[\alpha]_D^{25} = +3.6$ (c 0.03, CHCl_3). Aun cuando no mostró su ión molecular en el espectro de masas, su fórmula molecular fue determinada como $\text{C}_{31}\text{H}_{54}\text{O}_7$ en base a las señales observadas en su espectro de RMN ^{13}C y a las fragmentaciones obtenidas de su espectro de masas de alta resolución. Así, presentó dos picos significativos uno a m/z 506.361053 (calc. 506.360740) que corresponde a la pérdida de un grupo metoxilo $[\text{M}^+ - \text{CH}_3\text{O}]$, y otro a m/z 488.355728 (calc. 488.350175) debido a la pérdida adicional de agua $[\text{M}^+ - \text{CH}_3\text{O} - \text{H}_2\text{O}]$.



71 3-Metoxi-pseudodehidrotirsiferol

Sus datos espectroscópicos mostraron que estaba estrechamente relacionado con el pseudodehidrotirsiferol **70**, diferenciándose por la presencia de un grupo isopropilo cuyas señales aparecen a δ_{H} 0.88 (H_3 -1, d, $J=6.9$ Hz), δ_{H} 0.92 (H_3 -25, d, $J=6.8$ Hz), δ_{H} 2.20 (H-2, m) y un grupo metoxilo a δ_{H} 3.19 (CH_3O -, s) (Tabla 7).

La ausencia del metino característico H-3, junto con los datos anteriores, establecieron que las modificaciones se encuentran en el anillo A de esta sustancia.

Las conectividades observadas en los espectros COSY y HSQC hicieron posible realizar la asignación de la mayoría de los carbonos que componen este fragmento de la forma siguiente δ_{C} : 17.8 (C-1), 17.8 (C-25), 29.5 (C-2), 34.4 (C-4), 32.6 (C-5), 23.8 (C-26) y 47.2 (CH_3O -) (Figura 16).

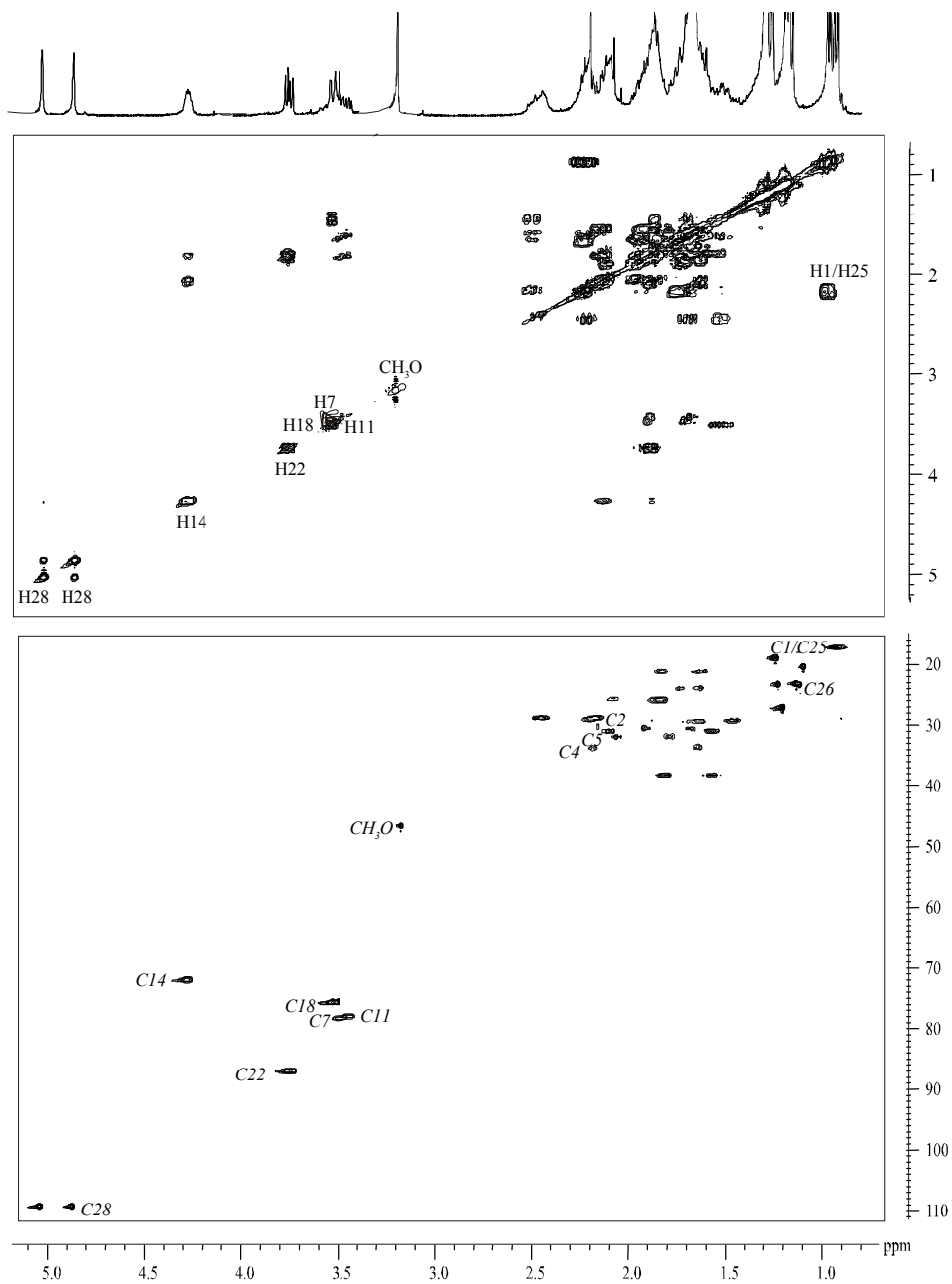


Figura 16.- COSY y HSQC del 3-metoxi-pseudodehidrotirsiferol **71**.

A continuación, los centros cuaternarios C-3 y C-6 fueron asignados a las señales δ_C 112.8 y 84.9, basados en sus correlaciones HMBC. Así, fue posible observar la correlación entre la señal del carbono C-3 con las señales correspondientes a los protones H₃-1, H₃-25, H-2, H₂-4 y el grupo CH₃O- presente sobre el mismo carbono anomérico C-3. Por otro lado, la señal del carbono cuaternario C-6 presentó correlaciones con las señales correspondientes a los protones H₂-5 (δ_H 1.80 y 2.07), H-7 (δ_H 3.50) y H₃-26 (δ_H 1.24) (Figura 17).

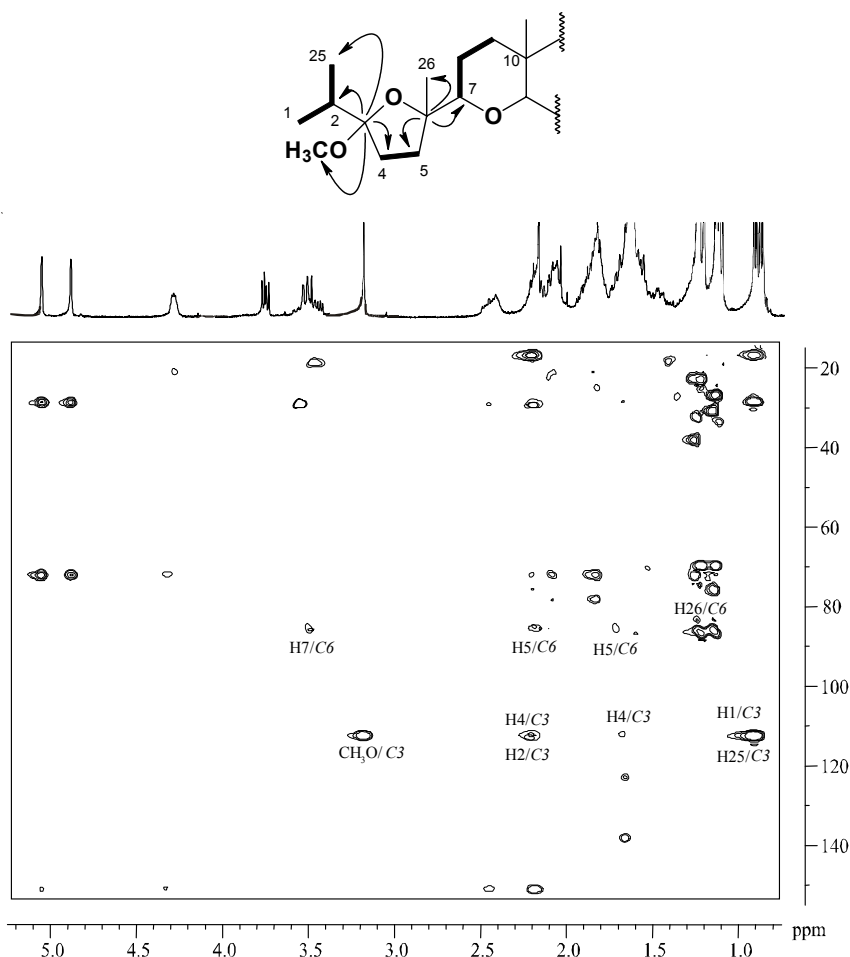


Figura 17.- Fragmento del compuesto **71** entre los carbonos C-1→C-11. En trazo grueso se distinguen las estructuras parciales determinadas mediante el estudio del espectro COSY. Las flechas indican las correlaciones más importantes observadas para los carbonos C-3 y C-6 en el espectro de HMBC, espectro situado en la parte inferior.

nº C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	J (Hz)
1	17.8	0.88	d	6.9
2	29.5	2.20		
3	112.8			
4	34.4	1.65		
		2.20		
5	32.6	1.80		
		2.07		
6	84.9			
7	79.0	3.50	d	10.0
8	24.7	1.57		
		1.65		
9	38.9	1.58		
		1.83		
10	72.8			
11	78.6	3.45	dd	5.4; 11.4
12	21.7	1.64		
		1.84		
13	26.3	1.84		
		2.09		
14	72.6	4.29	dd	3.9; 7.6
15	151.3			
16	29.9	2.18		
		2.46		
17	30.1	1.46		
		1.64		
18	76.5	3.53	dd	1.5; 9.5
19	86.1			
20	31.7	1.58		
		2.10		
21	26.6	1.85 (2H)		
22	87.6	3.76	dd	6.0; 10.0
23	70.5			
24	24.0	1.13	s	
25	17.8	0.92	d	6.8
26	23.8	1.24	s	
27	19.6	1.25	s	
28	109.9	4.88	bs	
		5.05	bs	
29	23.8	1.14	s	
30	27.7	1.21	s	
CH ₃ O-	47.2	3.19	s	

Tabla 7.- RMN ^{13}C y ^1H del 3-metoxi-pseudodehidrotirsiferol **71**.

La configuración relativa propuesta para el carbono C-3 es S^* , en base a las correlaciones ROE observadas entre los protones H₃-26 y el grupo CH₃O- presente en dicho carbono, tal y como muestra la Figura 18.

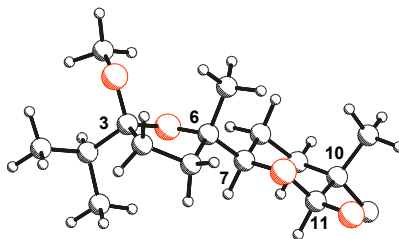
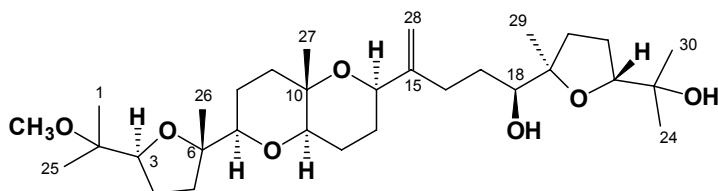


Figura 18.- Fragmento de la estructura del 3-metoxi-pseudodehidrotirsiferol **71** entre los carbonos C-1→C-11 donde se puede apreciar la estereoquímica relativa propuesta en el carbono C-3, C-6, C-7, C-10 y C-11.

II.3.6. 2-Metoxi-pseudodehidrotirsiferol **72**

El compuesto **72**, el 2-metoxi-pseudodehidrotirsiferol, resultó ser un isómero del compuesto anterior en base a las fragmentaciones observadas en su espectro de masas de alta resolución y las señales de carbonos apreciadas en RMN, que por lo tanto corresponden también a una fórmula molecular de C₃₁H₅₄O₇.



72 2-Metoxi-pseudodehidrotirsiferol

Cuando analizamos y comparamos los espectros correspondientes a los experimentos RMN ¹H, RMN ¹³C y HSQC del compuesto **72** con los del pseudodehidrotirsiferol **70** y el 3-metoxi-pseudodehidrotirsiferol **71**, se puede

determinar la estrecha relación estructural que existe entre los mismos, fijando nuevamente las modificaciones en el entorno del anillo tetrahidrofuranilo A.

Las diferencias que se pueden apreciar entre este compuesto y el pseudodehidrotirsiferol **70** son el desplazamiento hacia campos más bajos del protón H-3 (δ_H 3.91, dd, $J=6.1$ y 8.8 Hz) y la presencia de una señal a δ_H 3.25 (3H, s) que sugiere como modificación entre ambos la sustitución del grupo hidroxilo por un grupo metoxilo en el carbono C-2 (Figura 19, Tabla 8).

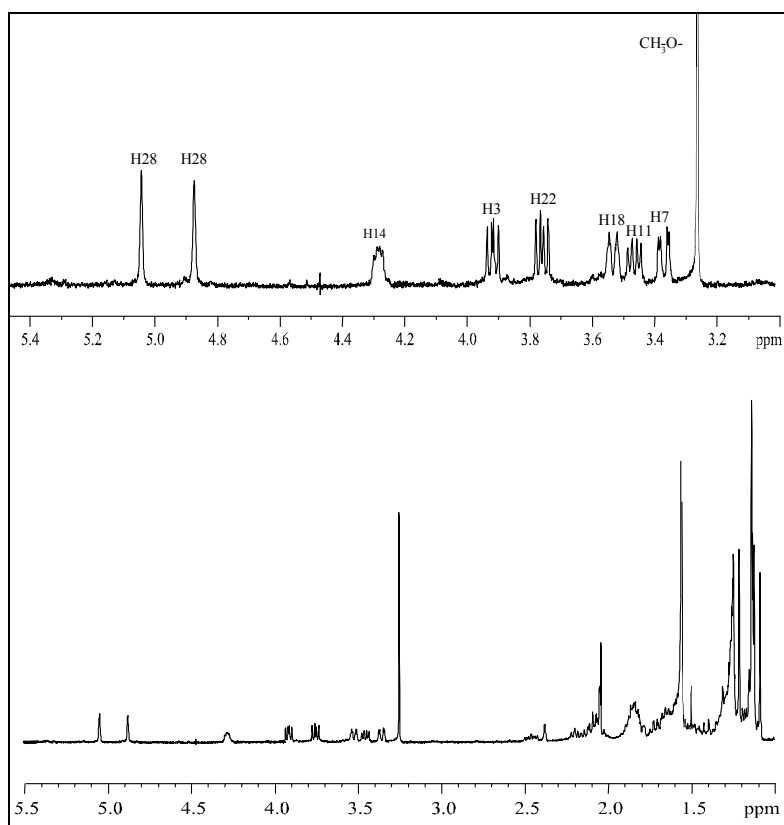


Figura 19.- RMN ^1H del 2-metoxi-pseudodehidrotirsiferol **72**.

n° C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	J (Hz)
1	20.9	1.09	s	
2	76.6			
3	84.9	3.91	dd	6.1; 8.8
4	27.5	1.70		
		1.85		
5	31.7	1.58		
		2.10		
6	84.2			
7	83.9	3.36	dd	2.7; 11.5
8	24.7	1.48		
		1.66		
9	38.8	1.56		
		1.80		
10	72.8			
11	78.7	3.46	dd	5.5; 11.3
12	21.9	1.63		
		1.84		
13	26.3	1.85		
		2.09		
14	72.6	4.28	dd	3.4; 7.1
15	151.3			
16	29.7	2.18		
		2.46		
17	30.0	1.46		
		1.65		
18	76.2	3.52	dd	1.2; 10.3
19	86.1			
20	34.4	1.59		
		2.05		
21	26.6	1.85 (2H)		
22	87.6	3.76	dd	6.0; 10.0
23	70.4			
24	24.0	1.12	s	
25	20.9	1.14	s	
26	22.8	1.15	s	
27	19.5	1.25	s	
28	109.9	4.88	bs	
		5.05	bs	
29	23.8	1.13	s	
30	21.7	1.21	s	
CH ₃ O-	49.8	3.25	s	
OH-18		2.38	s	

Tabla 8.- RMN ^{13}C y ^1H del 2-metoxi-pseudodehidrotirsiferol **72**.

La situación de este grupo metoxilo quedó confirmada mediante las correlaciones observadas en el experimento HMBC donde se pudo apreciar la correlación entre el carbono cuaternario C-2 (δ_C 76.6) y los protones H₃-1 (δ_H 1.09, s), H₃-25 (δ_H 1.14, s), H-3 (δ_H 3.91, dd, $J=6.1$ y 8.8 Hz), junto con los protones del grupo CH₃O- (δ_H 3.25, s) (Figura 20).

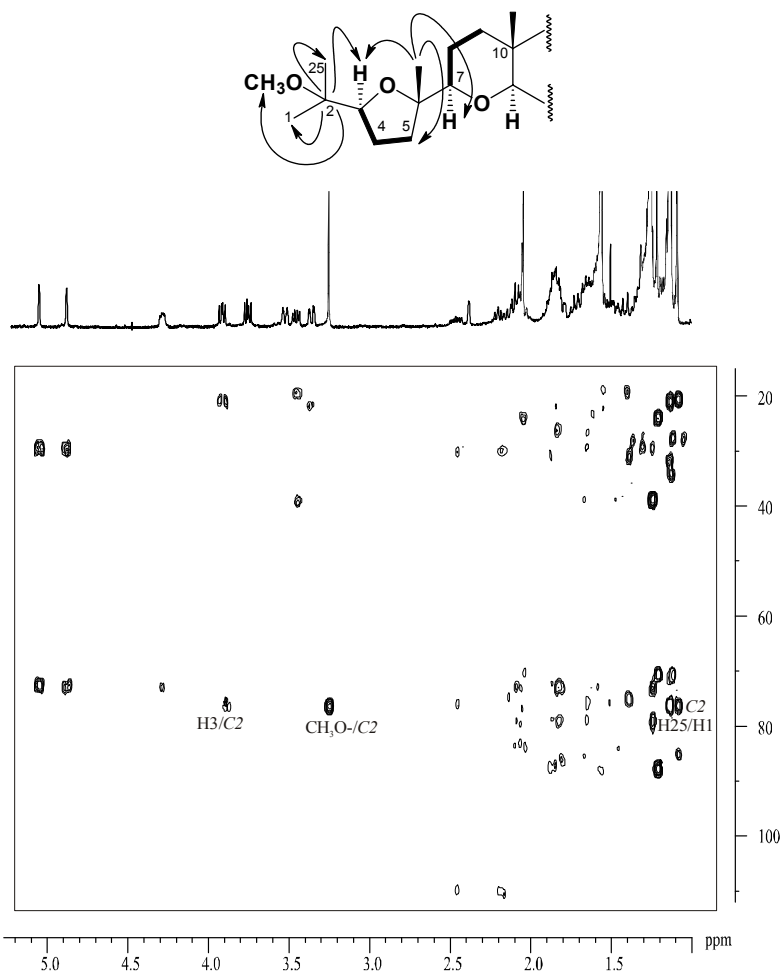


Figura 20.- Fragmento de la estructura del compuesto **72** comprendido entre los carbonos C-1→C-11. En trazo grueso se distinguen las estructuras parciales que se pueden determinar mediante el estudio del espectro COSY. Las flechas indican las correlaciones HMBC más importantes observadas para los carbonos C-2 y C-26 que nos permiten unir adecuadamente dichas estructuras. En la parte inferior, experimento de HMBC.

La estereoquímica del compuesto **72** se determinó a partir de la información obtenida en el experimento ROESY. El nuevo metoxilo presenta correlaciones dipolares con H₃-1, H₃-25 y H-3. Por otro lado, H-3 presenta también correlaciones con H₃-1, H₃-25, H-7 y H-5 α (δ_H 2.10) y no presenta ningún tipo de correlación con los protones H₃-26, lo que determina una configuración relativa *S** en C-3. El resto de los centros quirales presentes en la molécula mantienen la misma estereoquímica observada en el dehidrotirsiferol **3** (Figura 21).

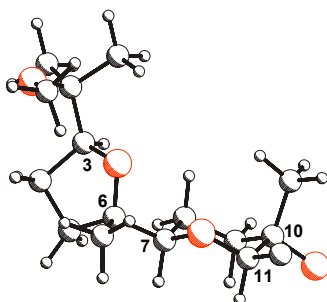


Figura 21.- Fragmento de la estructura del compuesto **72** comprendido entre los carbonos C-1→C-11 donde se puede apreciar la estereoquímica relativa propuesta en el carbono C-3, C-6, C-7, C-10 y C-11.

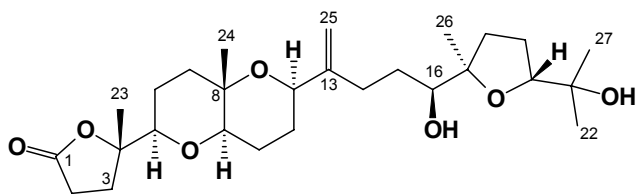
II.3.7. Lactodehidrotirsiferol **73**

Indudablemente, uno de los metabolitos aislados más interesantes de esta serie, y el único con menos de 30 átomos de carbono, es el lactodehidrotirsiferol **73**. Fue aislado como un sólido blanco amorfo, $[\alpha]_D^{25} = +4.3$ (*c* 0.21, CHCl₃), y presentó, también a diferencia del resto de los triterpenos conocidos de esta serie, una absorción en el espectro de IR (CHCl₃) con un máximo a 1771.2 cm⁻¹ característico de un agrupamiento γ -lactona. Este hecho junto con el estudio de los espectros de RMN de ¹H y ¹³C y la determinación de su fórmula molecular como C₂₇H₄₄O₇ por espectrometría de masas FAB, nos llevaron a sugerir la formación de esta lactona por una fragmentación oxidativa de parte del esqueleto original de escualeno (Tabla 9).

n° C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	J (Hz)
1 [3]	177.4			
2 [4]	29.7	2.50 2.68		
3 [5]	29.1	1.75 2.46		
4 [6]	87.1			
5 [7]	82.7	3.53	dd	1.7; 11.8
6 [8]	24.3	1.49 1.67		
7 [9]	38.3	1.63 1.87		
8 [10]	72.2			
9 [11]	78.8	3.46	dd	5.6; 11.7
10 [12]	21.6	1.60 1.88		
11 [13]	26.2	1.85 2.06		
12 [14]	72.7	4.28		
13 [15]	151.1			
14 [16]	29.3	2.18 2.47		
15 [17]	29.8	1.50 1.65		
16 [18]	76.2	3.53	dd	1.5; 11.7
17 [19]	86.1			
18 [20]	31.6	1.60 2.13		
19 [21]	26.6	1.87 (2H)		
20 [22]	87.7	3.76	dd	6.6; 10.6
21 [23]	70.5			
22 [24]	24.0	1.13	s	
23 [26]	23.3	1.34	s	
24 [27]	19.5	1.26	s	
25 [28]	110.0	4.89 5.05	bs bs	
26 [29]	23.8	1.14	s	
27 [30]	27.7	1.22	s	

[La numeración descrita entre corchetes se realiza para poder comparar con el resto de los metabolitos de esta serie]

Tabla 9.- RMN ^{13}C y ^1H del lactodehidrotirsiferol **73**.



73 Lactodehidrotirsiferol

Al comparar el espectro de RMN ^1H del lactodehidrotirsiferol **73** con el del dehidrotirsiferol **3** o el de otros derivados, se observan cambios tales como la ausencia de las señales correspondientes a los grupos metilo $\text{H}_3\text{-1}$ y $\text{H}_3\text{-25}$, junto con las pertenecientes al metino H-3 .

El estudio del experimento RMN ^{13}C confirmó la desaparición de estas señales, así como la de un carbono cuaternario en posición α a un átomo de oxígeno y por tanto, atribuible al carbono equivalente a C-2 del dehidrotirsiferol **3**. Asimismo, este experimento mostró la aparición de un carbono carboxílico centrado a δ_{C} 177.4.

Por otra parte, en el experimento COSY se pudo apreciar la existencia de un sistema aislado de dos metilenos diasterotópicos centrados a δ_{H} 2.68 y 2.50, y a δ_{H} 2.46 y 1.75, y que fueron respectivamente correlacionados en el experimento HSQC, con los carbonos a δ_{C} 29.7 y δ_{C} 29.1 (Figura 22). Estos carbonos metilénicos fueron identificados como C-2 y C-3 en el lactodehidrotirsiferol **73** por sus correlaciones a largo alcance en el experimento de HMBC (Figura 23). Así se observó acoplamiento entre el carbono C-1 (δ_{C} 177.4) y los protones $\text{H}_2\text{-2}$ y $\text{H}_2\text{-3}$; así como del carbono C-4 (δ_{C} 87.1) con los protones $\text{H}_2\text{-2}$, $\text{H}_2\text{-3}$, H-5 (δ_{H} 3.53, dd, $J=1.7$ y 11.8 Hz) y $\text{H}_3\text{-23}$ (δ_{H} 1.34).

Esta información nos permitió fijar la modificación en el anillo A, que aparece en este metabolito como un sistema de γ -lactona (Figura 22).

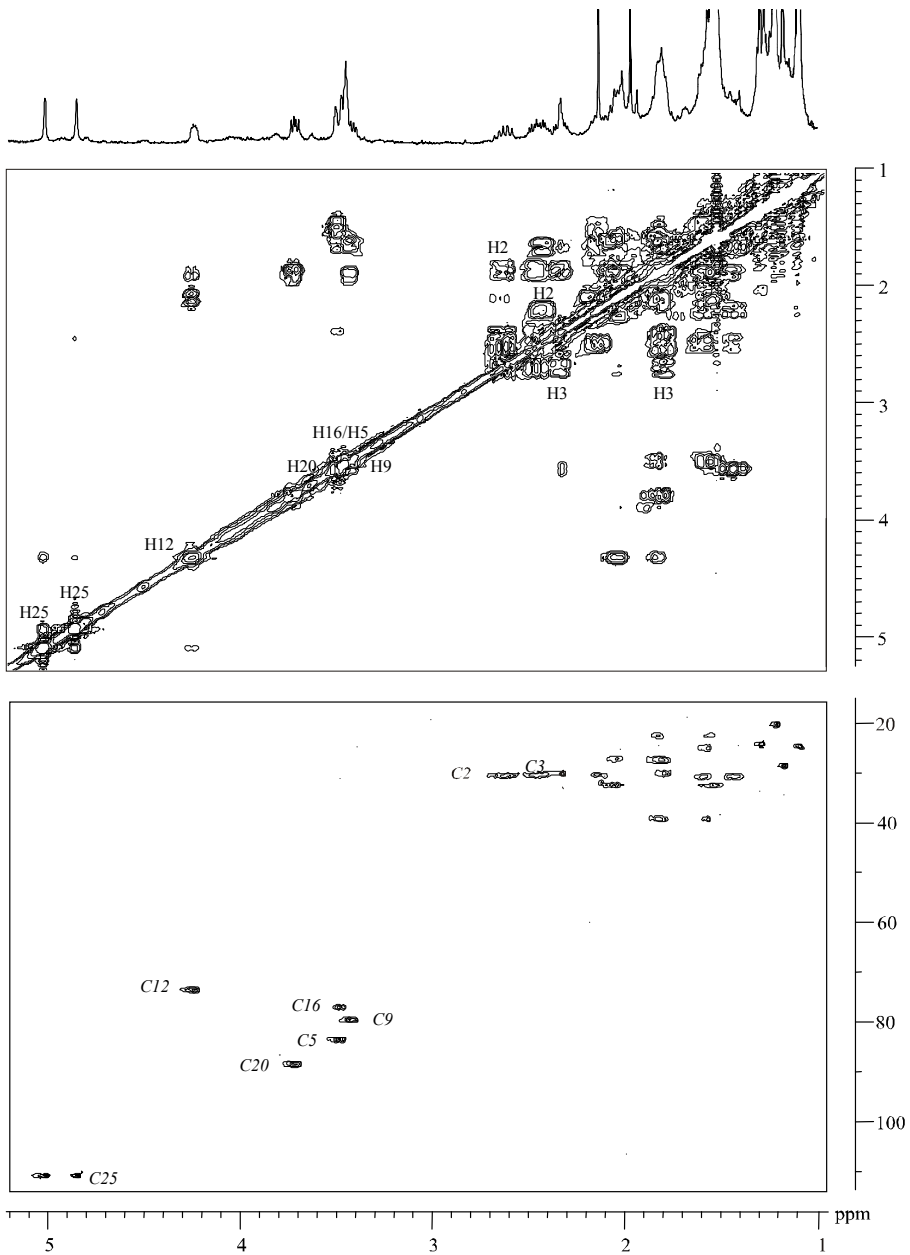


Figura 22.- COSY y HSQC del lactodehidrotirsiferol **73**.

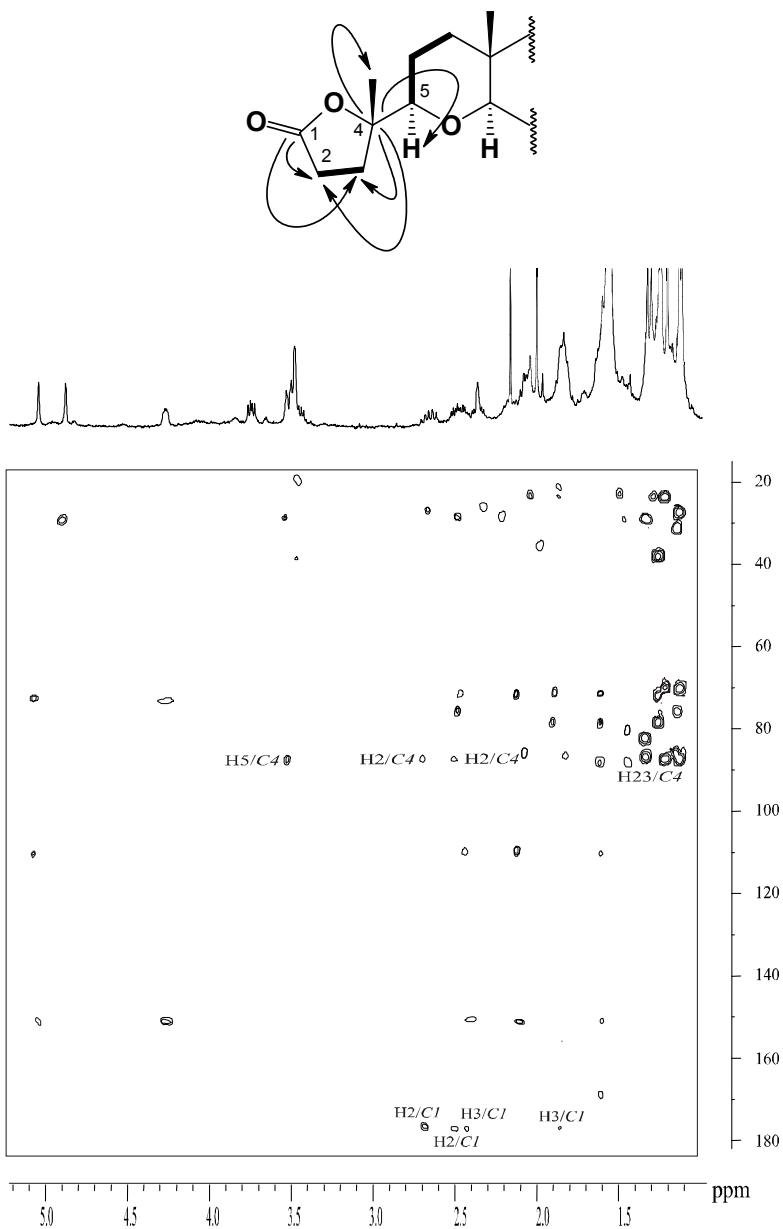
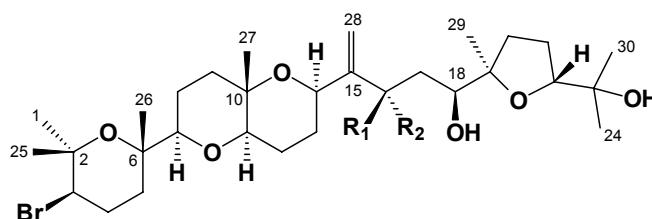


Figura 23.- Fragmento de la estructura del lactodehidotirsiferol **73** entre los carbonos C-1→C-9. En trazo grueso se distinguen las estructuras parciales que se pueden determinar mediante el estudio del espectro COSY. Las flechas indican las correlaciones HMBC más importantes observadas para los carbonos C-1 y C-4 que permiten confirmar la localización de la γ -lactona presente en dicho metabolito. Espectro de HMBC del compuesto **73**.

La estereoquímica relativa de los centros quirales presentes en el lactodehidrotirsiferol **73** fue propuesta basándonos en las correlaciones dipolares observadas en el experimento ROESY y que coinciden con la propuesta para el dehidrotirsiferol **3**.

II.3.8. 16-*epi*-Hidroxidehidrotirsiferol **74**

El 16-*epi*-hidroxidehidrotirsiferol **74**, resultó ser un isómero del 16-hidroxidehidrotirsiferol **20**, aislado anteriormente en nuestro laboratorio y publicado en 1997.²⁶



74 16-*epi*-Hidroxidehidrotirsiferol; R₁=OH; R₂=H
20 16-Hidroxidehidrotirsiferol; R₁=H; R₂=OH

La interpretación de los experimentos COSY, HMBC, HSQC y NOESY permitieron asignar las señales de ¹H y ¹³C, las cuales demuestran que la única diferencia entre estos dos metabolitos es la estereoquímica del grupo hidroxilo presente en C-16 (Tabla 10).

A partir de la multiplicidad del protón H-16 (δ_H 4.70, ddd, J=1.6, 6.3 y 10.0 Hz) (Figura 24), se deduce que el grupo alcohol está formando un enlace por puente de hidrógeno con el grupo hidroxilo presente en C-18, lo cual fue confirmado por las constantes de acoplamiento y las conectividades ROE observadas entre H-17 α (δ_H 1.73) y los protones H-16 (δ_H 4.70) y H-18 (δ_H 3.77), y a su vez, la de estos metinos con el protón del grupo hidroxilo presente en C-16 (δ_H 3.30, d, J=6.3 Hz) (Figuras 25 y 26).

n° C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	J (Hz)
1	31.0	1.26	s	
2	75.0			
3	59.0	3.89	dd	4.1; 12.3
4	28.2	2.11		
		2.24		
5	37.1	1.54		
		1.83		
6	74.4			
7	86.8	3.08	dd	1.6; 10.6
8	22.9	1.47		
		1.74		
9	38.6	1.51		
		1.75		
10	73.5			
11	79.3	3.38	dd	5.6; 11.5
12	21.7	1.65		
		1.76		
13	25.9	1.93		
		2.18		
14	70.8	4.35	dd	5.5; 5.7
15	152.9			
16	70.3	4.70	ddd	1.6; 6.3; 10.0
17	35.9	1.73	ddd	1.6; 1.6; 12.0
		1.86	ddd	10.0; 10.0; 12.0
18	73.8	3.77	dd	1.6; 10.0
19	85.6			
20	31.9	1.58		
		2.13		
21	26.5	1.84		
		2.07		
22	87.6	3.74	dd	6.0; 9.9
23	70.4			
24	24.0	1.12	s	
25	23.6	1.39	s	
26	20.1	1.19	s	
27	19.1	1.24	s	
28	110.4	5.17	bs	
		5.30	bs	
29	23.5	1.12	s	
30	27.7	1.20	s	
OH-16		3.30	d	6.3
OH-18		2.66	s	

Tabla 10.- RMN ^{13}C y ^1H del 16-*epi*-hidroxidehidrotirsiferol **74**.

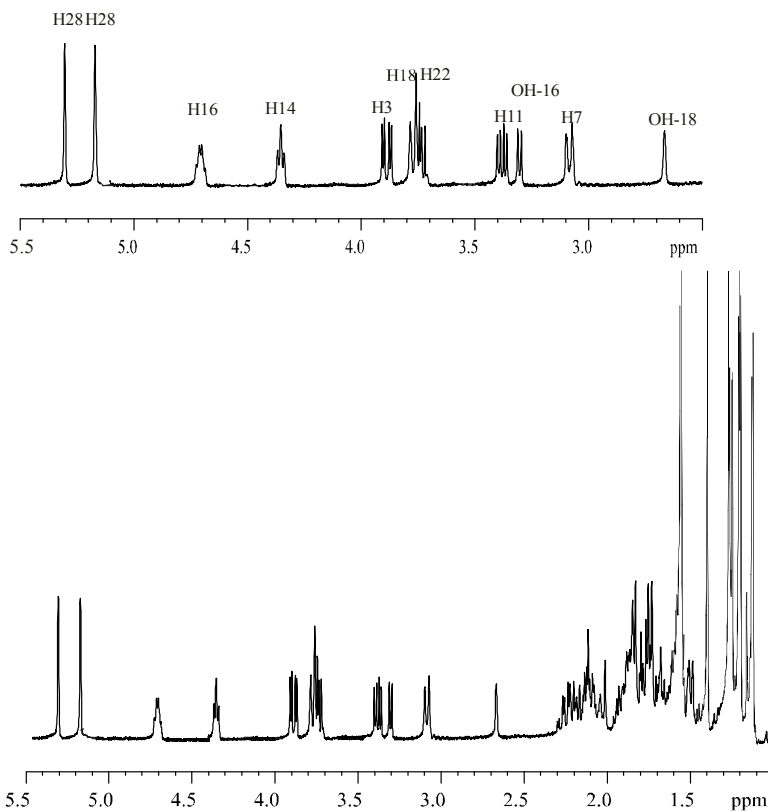


Figura 24.- RMN ^1H del 16-*epi*-hidroxidehidrotirsiferol **74**.

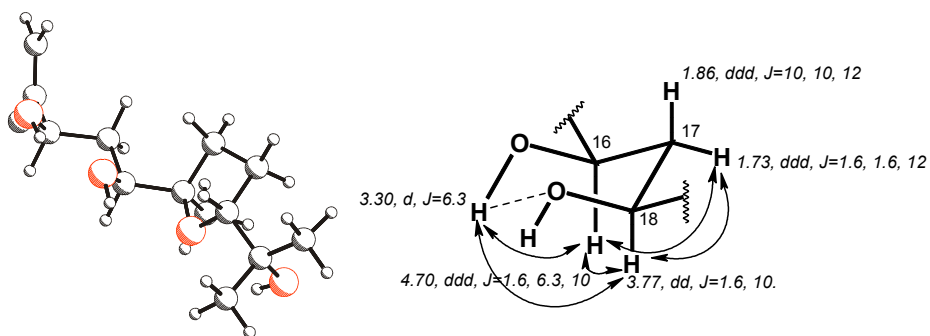


Figura 25.- Fragmento de la estructura del 16-*epi*-hidroxidehidrotirsiferol **74** correspondiente a los carbonos C-15→C-24 donde se puede apreciar la estereoquímica relativa propuesta en los carbonos C-16, C-17, C-18, C-22. Desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento más significativas del fragmento C-16→C-18.

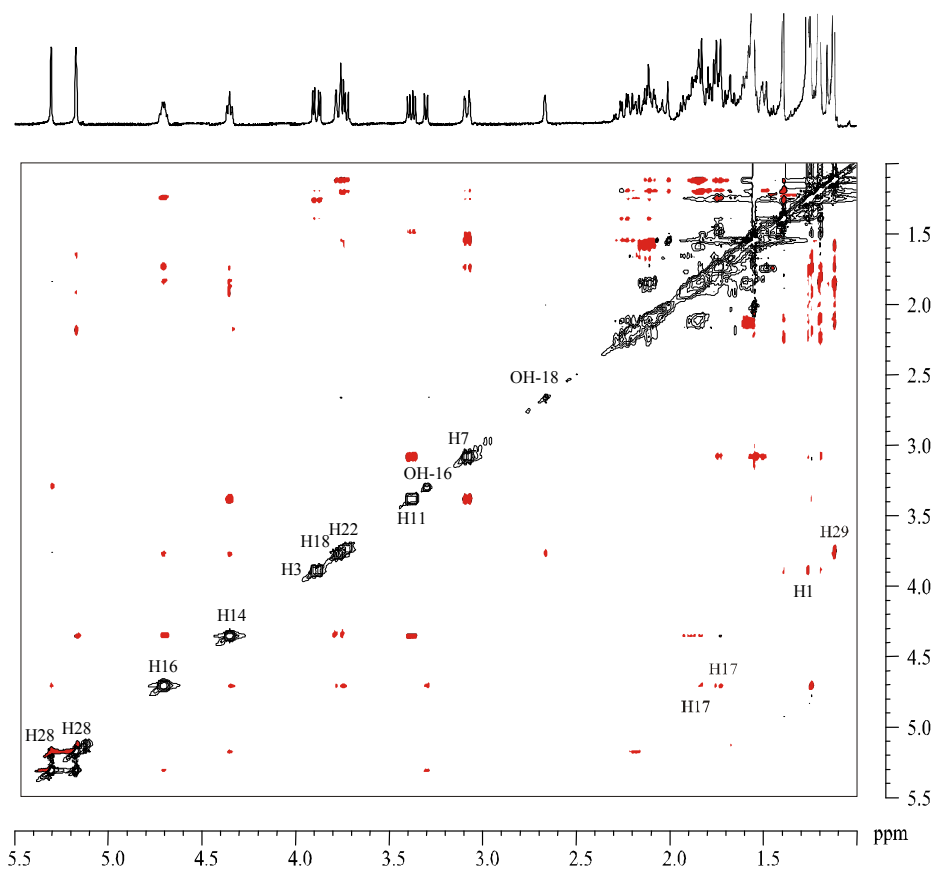
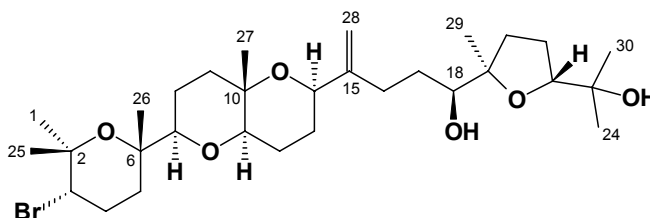


Figura 26.- ROESY del 16-*epi*-hidroxidehidrotirsiferol **74**.

II.3.9. 3-*epi*-Dehidrotirsiferol **75**

El 3-*epi*-dehidrotirsiferol **75**, resultó ser un isómero del dehidrotirsiferol **3**, en base al ión molecular observado en su espectro de masas FAB a m/z 587/589 (MH^+), siendo NBA la matriz utilizada. Sus datos espectroscópicos mostraron que su estructura estaba estrechamente relacionada con los valores observados para el compuesto **3**, hasta el punto de que las fragmentaciones obtenidas en su espectro de

masas, así como las absorciones en su espectro de infrarrojo fueron idénticas a las de éste.



75 3-*epi*-Dehidrotirsiferol

En el espectro de RMN ^1H , los desplazamientos químicos y los valores de las constantes de los grupos metino H-11, H-14, H-18 y H-22 junto con la de los protones vinílicos H₂-28 fueron también equivalentes (Tabla 11). Sin embargo, las señales de protón de los metinos H-3 (δ_{H} 4.09, dd, $J=3.3$ y 7.6 Hz) y H-7 (δ_{H} 3.43, dd, $J=1.8$ y 10.8 Hz), junto con las correspondientes al metileno H₂-5 (δ_{H} 1.52 y 2.12) y a los metilos H₃-1 (δ_{H} 1.31), H₃-25 (δ_{H} 1.33) y H₃-26 (δ_{H} 1.12) fueron diferentes en sus desplazamientos químicos, mostrando H-3 notables diferencias en las constantes de acoplamiento.

Estos desplazamientos químicos fueron asignados en base a las correlaciones observadas en el experimento de HMBC. Así el carbono C-3 (δ_{C} 59.4), identificado por su correlación HSQC con el protón H-3 (δ_{H} 4.09), mostró correlación con el metileno H₂-5 (δ_{H} 1.52 y 2.12) y éste a su vez con el grupo metilo C-26 (δ_{C} 19.9). La correlación HMBC entre el carbono de este grupo metilo y la señal entrada a δ_{H} 3.43 nos permitió identificar a H-7.

A la vista de estos resultados pudimos suponer que las notables diferencias que habíamos indicado entre los desplazamientos químicos de estas señales de protón y sus valores de constantes de acoplamiento, con las establecidas para el dehidrotirsiferol **3**, debían estar relacionadas con el cambio de configuración de alguno de los centros

quirales presentes en el anillo A, concretamente el centro quiral en C-3. En efecto, si consideramos que en el compuesto **3** la señal del protón H-3 se resuelve como doble doblete con valores de constante de acoplamiento $J_{3-4\alpha}=4.1$ Hz y $J_{3-4\beta}=12.6$ Hz y que éstas determinan la orientación ecuatorial para el átomo de bromo; el que en el compuesto **75** esa señal se resuelva también como doble doblete pero con valores de constante de acoplamiento inferiores, $J_{3-4\alpha}=7.6$ Hz y $J_{3-4\beta}=3.3$ Hz, nos hace suponer que ha tenido lugar un cambio de configuración en dicho centro. En este caso, el átomo de bromo debería disponerse en una disposición axial, tal y como se aprecia en la Figura 27.

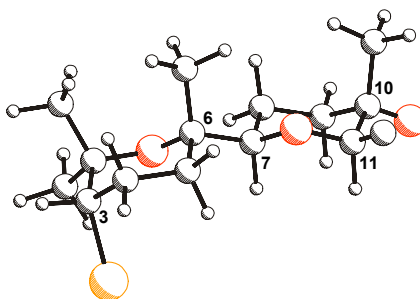


Figura 27.- Fragmento de la estructura del 3-*epi*-dehidrotirsiferol **75** entre los carbonos C-1→C-11 donde se puede apreciar la estereoquímica relativa propuesta en los carbonos C-3, C-6, C-7, C-10 y C-11. En dicho compuesto el bromo se dispone en posición axial en el carbono C-3.

Esto fue confirmado en el experimento ROESY por las correlaciones observadas de H-3 con H₃₋₂₅, H₂₋₄. Esta última establece la disposición ecuatorial del protón H-3, a diferencia de lo que sucedía en el dehidrotirsiferol **3**, en el que sólo se observaban correlaciones dipolares entre H-3 y uno de los protones del metileno H₂₋₄, concretamente con H-4 β . En base a todo lo expuesto, se propone una configuración relativa *R** para el centro quiral en el carbono C-3, y para el resto de los centros quirales presentes en la molécula se confirma la misma configuración relativa observada en el dehidrotirsiferol **3**.

n° C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	J (Hz)
1	27.9	1.31	s	
2	74.4			
3	59.4	4.09	dd	3.3; 7.6
4	26.5	2.12		
		2.20		
5	30.8	1.52		
		2.12		
6	73.2			
7	82.9	3.43	dd	1.8; 10.8
8	22.7	1.56		
		1.79		
9	38.2	1.55		
		1.80		
10	73.0			
11	78.8	3.46	dd	5.9; 10.0
12	21.3	1.62		
		1.83		
13	26.1	1.84		
		2.08		
14	72.0	4.27	dd	4.2; 7.6
15	150.8			
16	29.1	2.19		
		2.45		
17	29.4	1.46		
		1.63		
18	75.8	3.51	dd	1.5; 10.6
19	86.3			
20	31.2	1.56		
		2.12		
21	26.0	1.85 (2H)		
22	87.0	3.74	dd	5.7; 10.2
23	70.7			
24	23.2	1.11	s	
25	28.9	1.33	s	
26	19.9	1.12	s	
27	19.1	1.22	s	
28	109.4	4.86	bs	
		5.03	bs	
29	22.5	1.12	s	
30	27.2	1.20	s	

Tabla 11.- RMN ^{13}C y ^1H del 3-*epi*-dehidrotirsiferol **75**.

II.3.10. Peróxido de longileno 76

De fracciones seleccionadas de la parte más polar del extracto fueron identificados otros dos metabolitos. El primero de ellos, el peróxido de longileno 76, fue aislado como un sólido amorfo de color blanco cuya fórmula empírica $C_{30}H_{52}O_8$ fue establecida en base a su espectro de masas de alta resolución que presentó un $M^+ + Na$ a m/z 563.357155 (calc. 563.355989).

El espectro de RMN 1H (Figura 28) mostró a campo bajo unas señales centradas a δ_H 10.57 (s), 5.81 (ddd, $J=6.6, 8.5$ y 15.6 Hz), 5.75 (ddd, $J=6.8, 7.0$ y 15.6 Hz), 5.61 (d, $J=15.6$ Hz), 5.43 (d, $J=15.6$ Hz), 5.24 (s) y 5.03 (s) que integran todas para un protón. Asimismo, aparecen también dos señales más complejas cuyas integrales corresponden a dos protones cada una y que se encuentran centradas a δ_H 4.09 y 3.72.

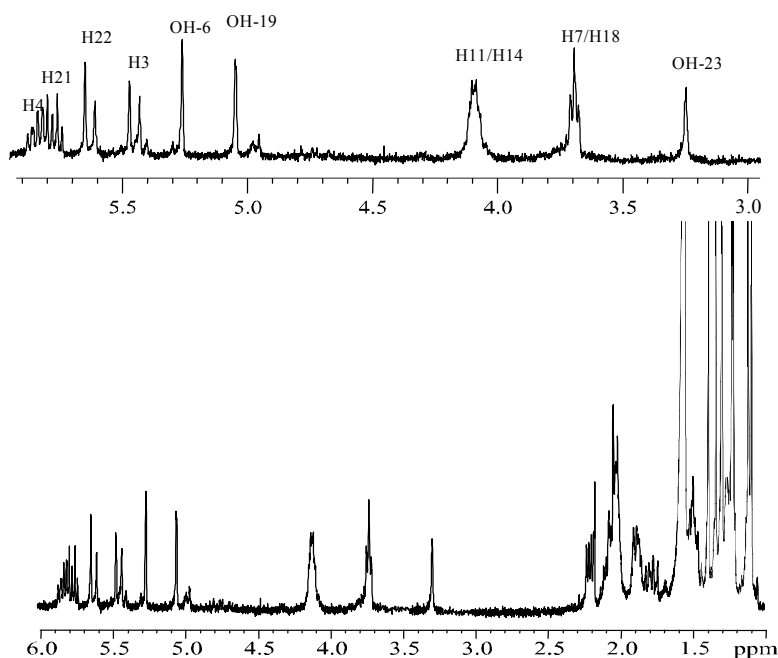


Figura 28.- RMN 1H del peróxido de longileno 76.

El experimento de HSQC nos permitió correlacionar las señales anteriores con sus respectivos carbonos excepto las centradas a δ_H 10.57, 5.24 y 5.03 que no presentaron correlación heteronuclear (Figura 29). Así se establecieron las siguientes correlaciones: δ_H 5.81 \rightarrow δ_C 125.8, δ_H 5.75 \rightarrow δ_C 122.2, δ_H 5.61 \rightarrow δ_C 141.2, δ_H 5.43 \rightarrow δ_C 137.0, δ_H 4.09 \rightarrow δ_C 85.4 y 85.8, y δ_H 3.72 \rightarrow δ_C 85.1 y 84.1.

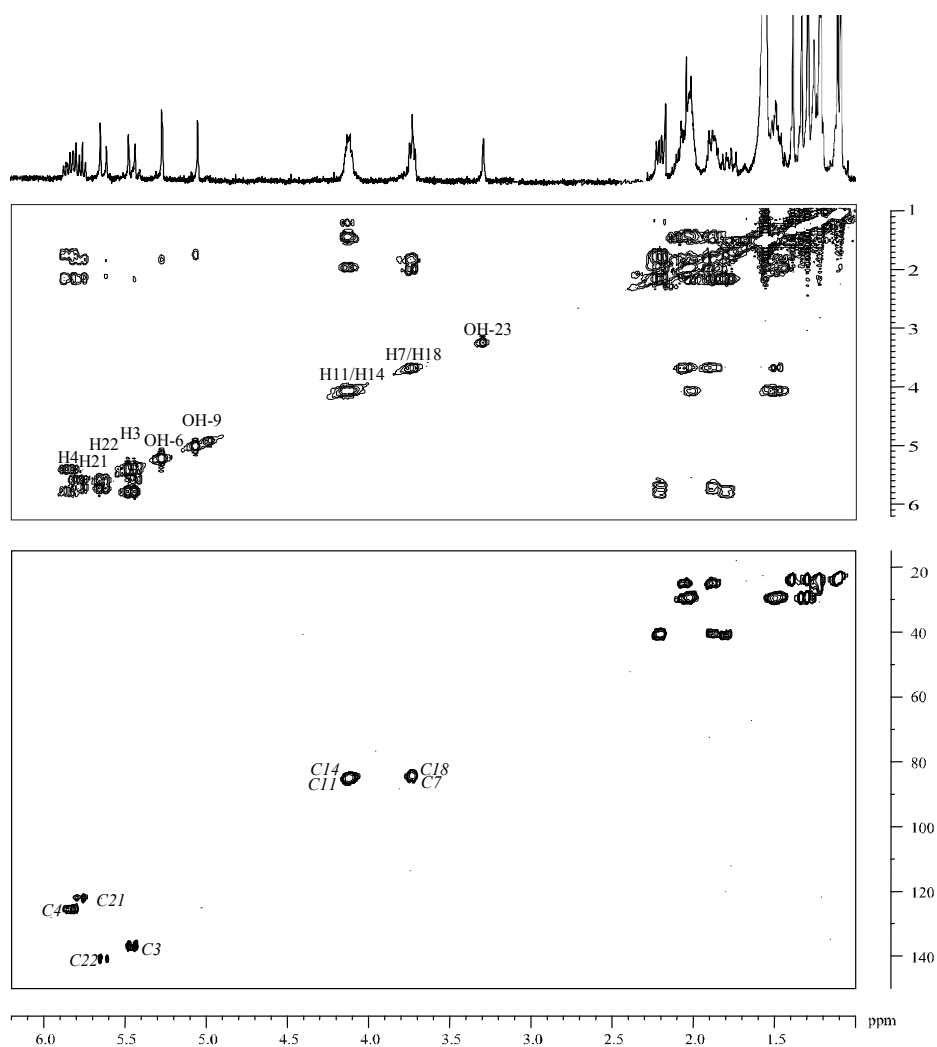
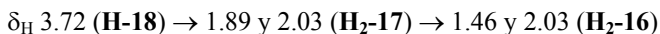
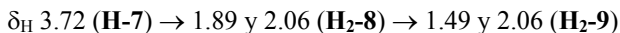
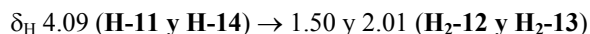


Figura 29.- COSY y HSQC del peróxido de longileno **76**.

El experimento COSY (Figura 29) nos permitió establecer los siguientes sistemas de conectividades equiparables:



Junto con las secuencias anteriores se observó también otro grupo de señales interconectadas que corresponden a protones que son prácticamente equivalentes:



Los fragmentos de estructuras parciales anteriores pueden ser interconectados mediante la secuencia de correlaciones observadas en el experimento HMBC a través de los carbonos cuaternarios C-6 (δ_{C} 73.9), C-10 (δ_{C} 85.8), C-15 (δ_{C} 85.4) y C-19 (δ_{C} 73.8) (Figuras 30 y 31).

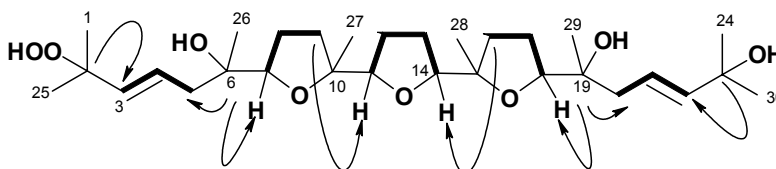


Figura 30.- Estructura plana propuesta para el metabolito **76**. Mediante flechas se representan las conectividades más importantes observadas en el experimento HMBC.

El resto de las conectividades observadas en este experimento, especialmente las correspondientes a los grupos metilo, nos permitieron completar la estructura plana de este compuesto tal como se muestra en la Figura 30 y en la Tabla 12.

n° C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	J (Hz)
1	26.9	1.19	s	
2	80.1			
3	137.0	5.43	d	15.6
4	125.8	5.81	ddd	6.6; 8.5; 15.6
5	41.3	1.78	dd	8.5; 13.3
		2.20	dd	6.6; 13.3
6	73.9			
7	85.1	3.72		
8	25.8	1.89		
		2.06		
9	29.7	1.49		
		2.06		
10	85.8			
11	85.8	4.09		
12	30.1	1.50		
		2.01		
13	29.9	1.50		
		2.01		
14	85.4	4.09		
15	85.4			
16	29.3	1.46		
		2.03		
17	25.2	1.89		
		2.03		
18	84.1	3.72		
19	73.8			
20	40.8	1.88	dd	6.8; 13.4
		2.20	dd	7.0; 13.4
21	122.2	5.75	ddd	6.8; 7.0; 15.6
22	141.2	5.61	d	15.6
23	70.0			
24	29.4	1.27	s	
25	24.2	1.37	s	
26	24.3	1.20	s	
27	24.2	1.09	s	
28	23.6	1.07	s	
29	24.3	1.27	s	
30	29.6	1.31	s	
-OOH		10.57	s	
OH-6		5.24	s	
OH-19		5.03	s	
OH-23		3.29	s	

Tabla 12.- RMN ^{13}C y ^1H del peróxido de longileno **76**.

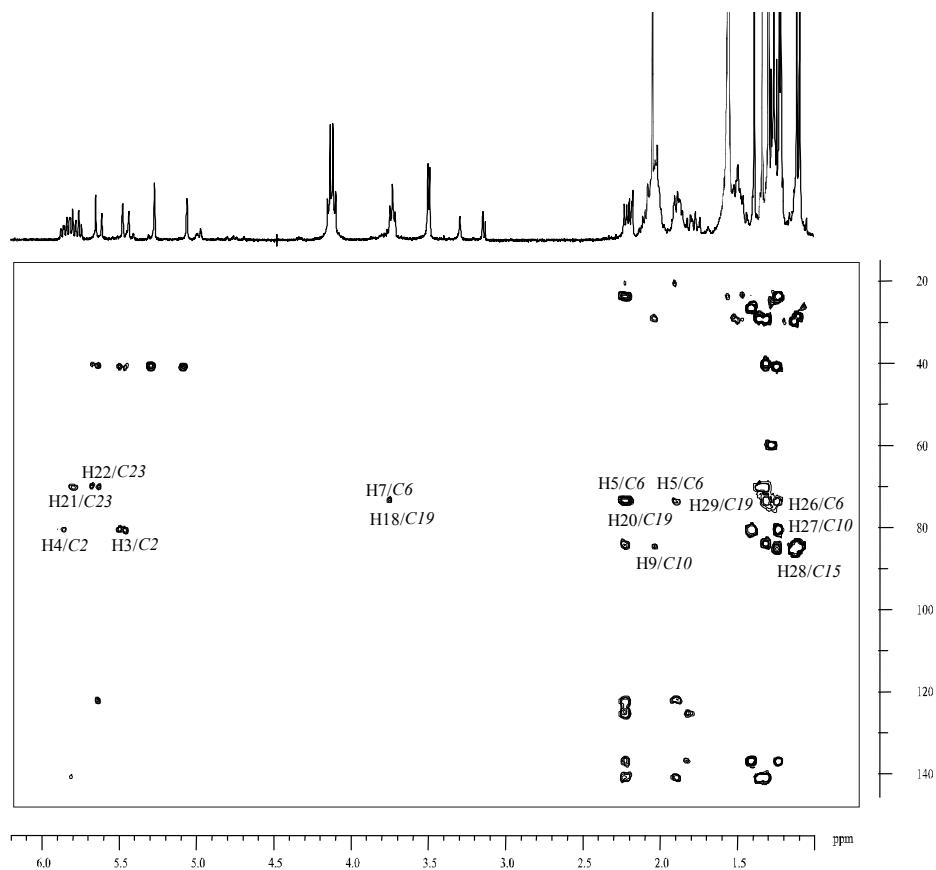
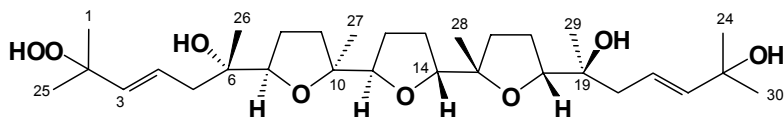


Figura 31.- HMBC del peróxido de longileno **76**.

Una vez determinada la estructura, mediante una búsqueda bibliográfica encontramos que Itokawa y *col.*,⁵⁵ publicaron en 1991 el aislamiento e identificación del peróxido de longileno como metabolito de la *Eurycoma longifolia* cuya estructura fue determinada mediante cristalografía de rayos X.

⁵⁵ H. Itokawa, E. Kishi, H. Morita, K. Takeya, Y. Itaka, *Chem. Lett.*, **1991**, 2221.



76 Peróxido de longileno

Sus datos espectroscópicos coincidieron plenamente con los de nuestro producto a excepción de la actividad óptica. Así el peróxido de longileno aislado de fuente terrestre posee un valor de $[\alpha]_D^{25} = -23.0$ (c 0.44, CHCl_3), mientras que el peróxido de longileno aislado de la *Laurencia viridis* presenta un valor de $[\alpha]_D^{25} = +46.6$ (c 0.31, CHCl_3). Dado que a partir de la interpretación de las correlaciones escalares observadas en el espectro ROESY parece que las estereoquímicas relativas de ambos compuestos son equivalentes, proponemos que ambas sustancias son enantiómeros. Por lo tanto, para nuestro metabolito **76**, y en base a las consideraciones biogenéticas que se analizan detalladamente en el siguiente capítulo, planteamos, una configuración S^* , R^* , S^* , R^* , R^* , S^* , R^* , S^* para los centros quirales presentes en los carbonos C-6, C-7, C-10, C-11, C-14, C-15, C-18 y C-19, respectivamente (Figura 32).

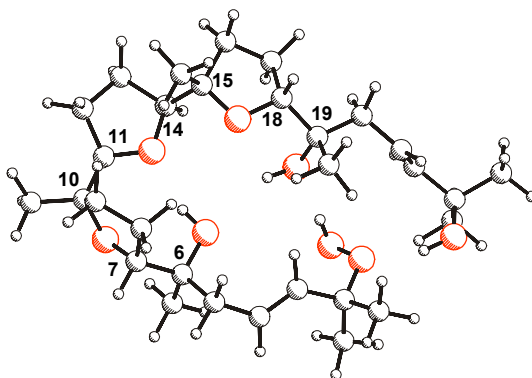
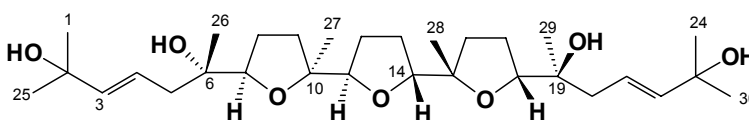


Figura 32.- Conformación de mínima energía calculada para el peróxido de longileno aislado de *Laurencia viridis*.

II.2.11. Longileno 77

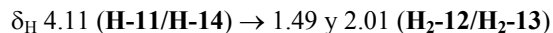
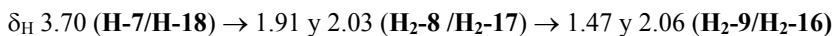
A partir de las mismas fracciones de las que se aisló el peróxido de longileno 76, se identificó otro metabolito nuevo que denominamos longileno 77. Éste fue aislado como un sólido cristalino amorfo con $[\alpha]_D^{25}=0.0$ (c 0.13, CHCl_3).



77 Longileno

La comparación de los espectros de RMN del compuesto 76 con los del longileno 77 mostraron una gran similitud, pero con la diferencia de que el número de señales que se observaban en el segundo caso, es la mitad que en el primero. Este hecho junto con la ausencia de actividad, nos sugirió que podía tratarse de una sustancia cuya estructura poseyera elementos de simetría.

Como en el caso del metabolito anterior, mediante la combinación de los datos obtenidos de los experimentos COSY y HSQC (Figura 33) se pudieron establecer tres fragmentos de estructuras parciales que se detallan a continuación:



Estas estructuras parciales se interconectaron también a través de los carbonos cuaternarios por interpretación de los datos obtenidos del experimento de HMBC (Figura 34) y que corresponden a las asignaciones recogidas en la Tabla 13 para la estructura plana que se muestra en la parte superior de la Figura 34.

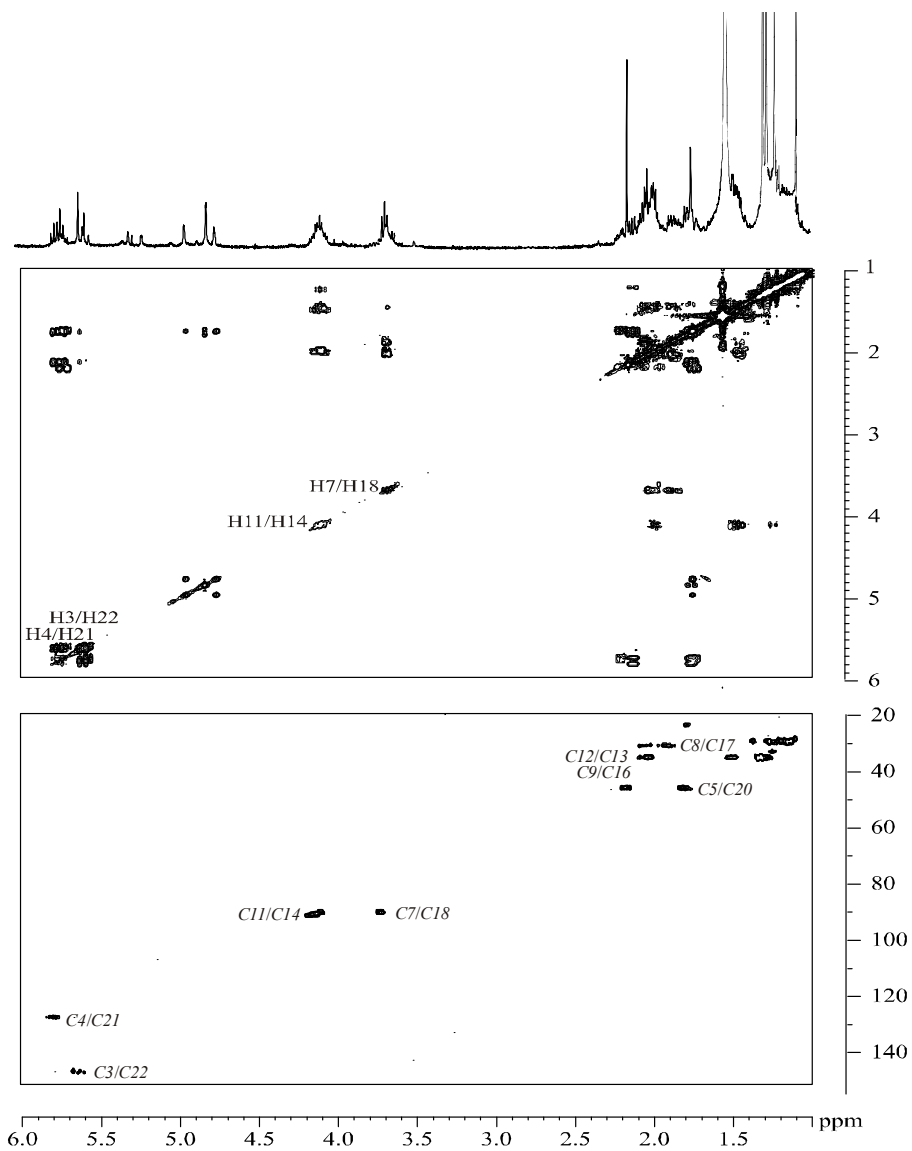


Figura 33.- COSY y HSQC del longileno **77**.

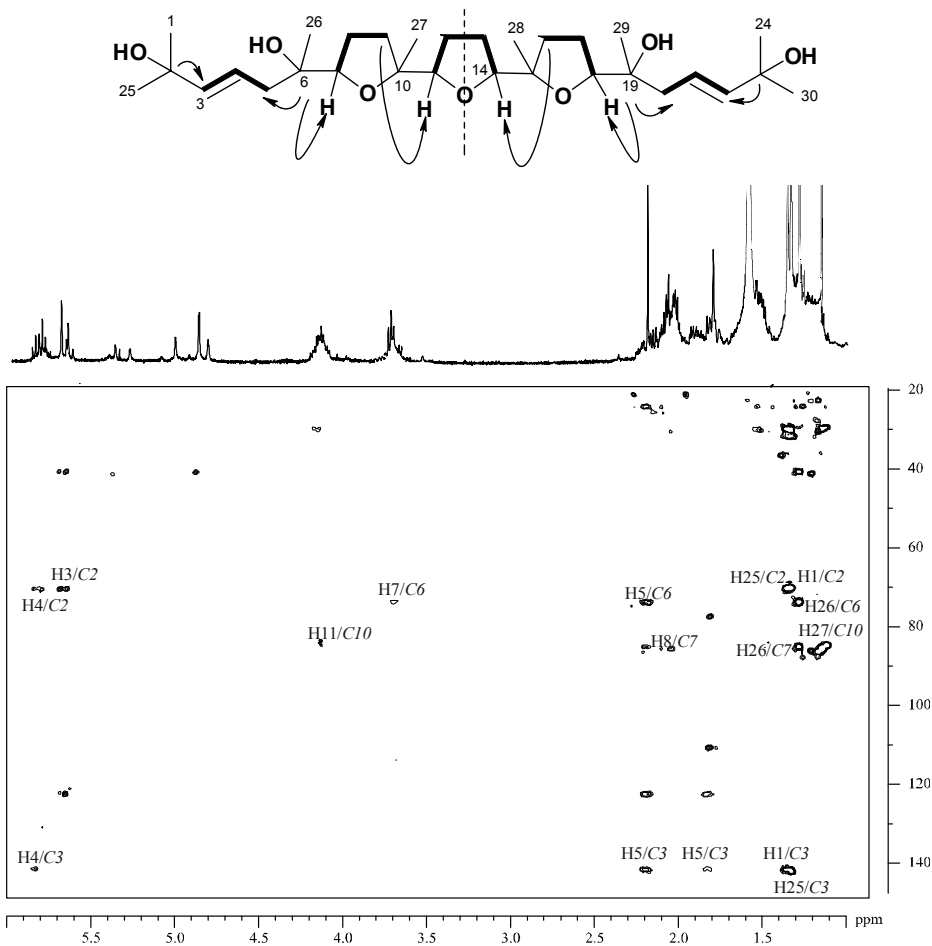


Figura 34.- Estructura plana propuesta para el longineno **77** donde los fragmentos parciales obtenidos mediante los experimentos COSY y HSQC aparecen interconectados a partir de las correlaciones observadas en el experimento HMBC (parte inferior de la figura), indicadas en éste sólo para una de las mitades equivalentes, C-1→C-12. Se ha representado con trazo discontinuo el elemento de simetría presente en la molécula.

Las conectividades observadas en el estudio del experimento ROESY nos condujeron a proponer una configuración relativa S^* , R^* , S^* , R^* , R^* , S^* , R^* , S^* para los centros quirales presentes respectivamente en los carbonos C-6, C-7, C-10, C-11, C-14, C-15, C-18 y C-19, equivalente a la establecida para el peróxido de longineno **76** (Figura 35).

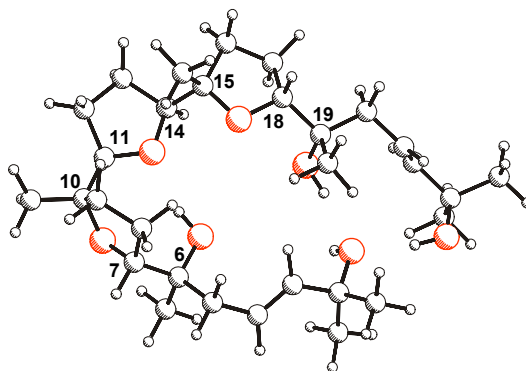


Figura 35.- Conformación de mínima energía calculada para el longileno **77**. La configuración propuesta está basada en las correlaciones ROE y en las consideraciones biogénicas.

n° C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	J (Hz)	
1	24	29.6	1.29	s	
2	23	70.4			
3	22	141.2	5.62	d	15.6
4	21	122.0	5.77	ddd	7.0; 7.4; 15.6
5	20	40.4	1.78	dd	7.0; 13.4
			2.15	dd	7.4; 13.4
6	19	74.0			
7	18	84.9	3.70	dd	6.4; 6.6
8	17	25.6	1.91		
			2.03		
9	16	30.0	1.47		
			2.06		
10	15	85.7			
11	14	85.4	4.11	dd	5.5; 5.6
12	13	30.0	1.49		
			2.01		
25	30	29.8	1.31	s	
26	29	24.1	1.24	s	
27	28	23.7	1.10	s	
OH-6	OH-19				

Tabla 13.- RMN ^{13}C y ^1H del longileno **77**.

III. ORIGEN BIOGENÉTICO DE LOS NUEVOS METABOLITOS

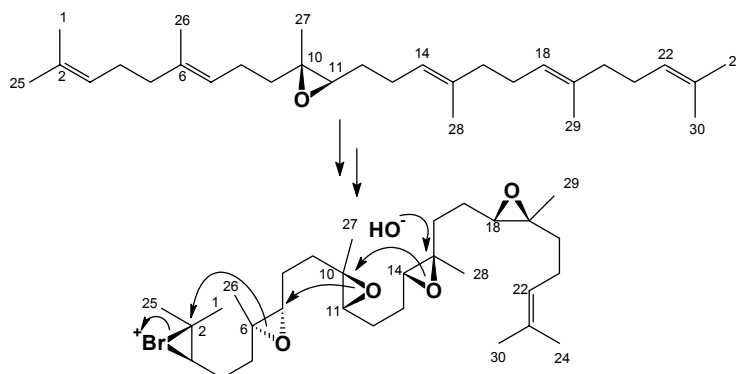
III.1. INTRODUCCIÓN

En el apartado I.2.2 del Capítulo I de esta memoria, se ha señalado que el origen de los poliéteres derivados del escualeno aislados de las algas del género de *Laurencia*, se puede considerar a partir de un precursor común. Este precursor consistiría en el (10*R*,11*R*) epóxido de escualeno, que ha sido obtenido de la *Laurencia okamurai*,³³ y que podría evolucionar hacia un intermedio también común, el (6*S*,7*S*,10*R*,11*R*,14*R*,15*R*,18*S*,19*S*) tetraepóxido de escualeno. Sin embargo, este intermedio todavía no ha sido identificado de fuente natural.

Fue precisamente, el aislamiento e identificación en nuestro laboratorio de metabolitos de *Laurencia viridis* tales como: el acetato de predehidrovenustatriol **21** con un anillo A abierto, ausencia del átomo de bromo y un doble enlace terminal entre los carbonos C-2–C-3; junto con los isómeros 10-*epi*-dehidrotirsiferol **14** y 10-*epi*-15,16-dehidrotirsiferol **19** con el cambio de estereoquímica en el carbono C-10; y los tirsenoles A **15** y B **16** con una unidad de enol-éter en los carbonos C-13–C-14, lo que nos llevó a cuestionar la propuesta clásica de biogénesis para estos poliéteres que implicaba una ciclación concertada de tres epóxidos después de la formación de un ión bromonio en los carbonos C-2–C-3, dando lugar al sistema de anillos A-B-C presente en la mayoría de los primeros metabolitos aislados (Esquema 7).

A la luz de los hechos anteriores, y con el aislamiento de compuestos con nuevas estructuras como el martiriol **67** con un grupo hidroxilo en la posición C-3, lo más lógico es pensar que el proceso de formación tenga lugar de manera secuencial y no de la forma en que se describe en la propuesta clásica mantenida hasta el momento para este tipo de sustancias. Nuestro propósito es intentar proponer, para los metabolitos más significativos que componen esta memoria, unas rutas biogenéticas que racionalicen su formación, tal y como lo hicimos en las consideraciones

biogénicas resumidas en los Esquemas 1-3 del Capítulo I para los compuestos recogidos allí.



Esquema 7

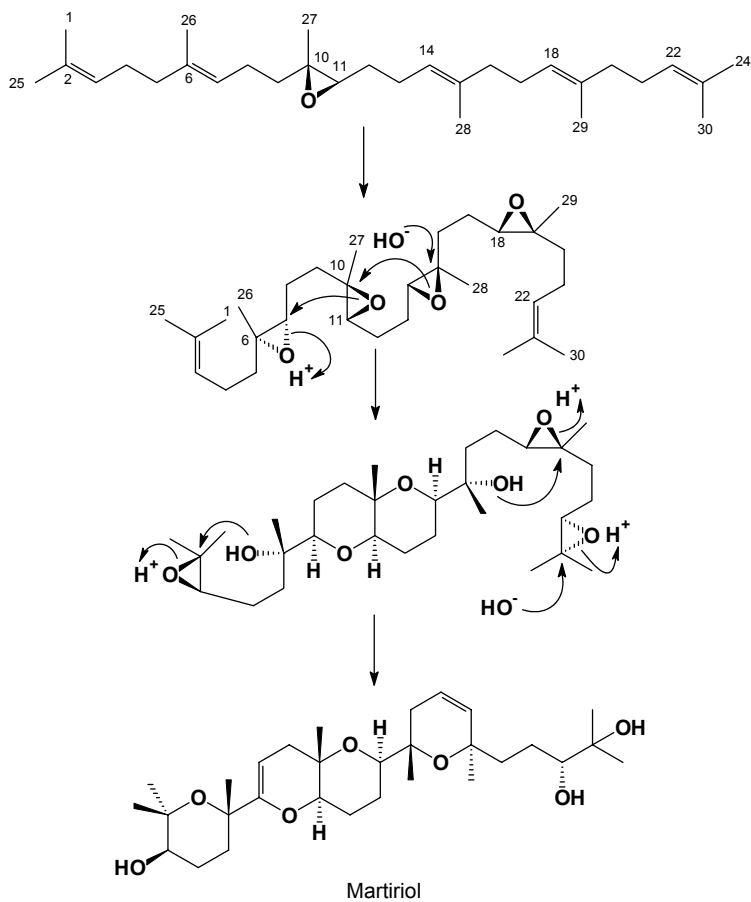
III.2. PROPUESTAS BIOGENÉTICAS

III.2.1. Martiriol **67** y dioxepandehidrotirsiferol **68**

En el caso del martiriol **67** o del dioxepandehidrotirsiferol **68**, el proceso se podría considerar que comienza con una protonación enzimática en el epóxido en las posiciones 6*S*,7*S*, seguida de una ciclación que evoluciona sobre el carbono C-7 o C-6, respectivamente, e hidroxilación en la posición C-15. De esta forma se generaría el sistema fusionado de anillos B-C con una configuración *trans* de los oxanos correspondientes según el metabolito en cuestión (Esquemas 8 y 9). Esta propuesta biogénica está apoyada en las correlaciones NOE observadas entre los protones H-11 y H-14 en muchos de los metabolitos aislados de este alga.

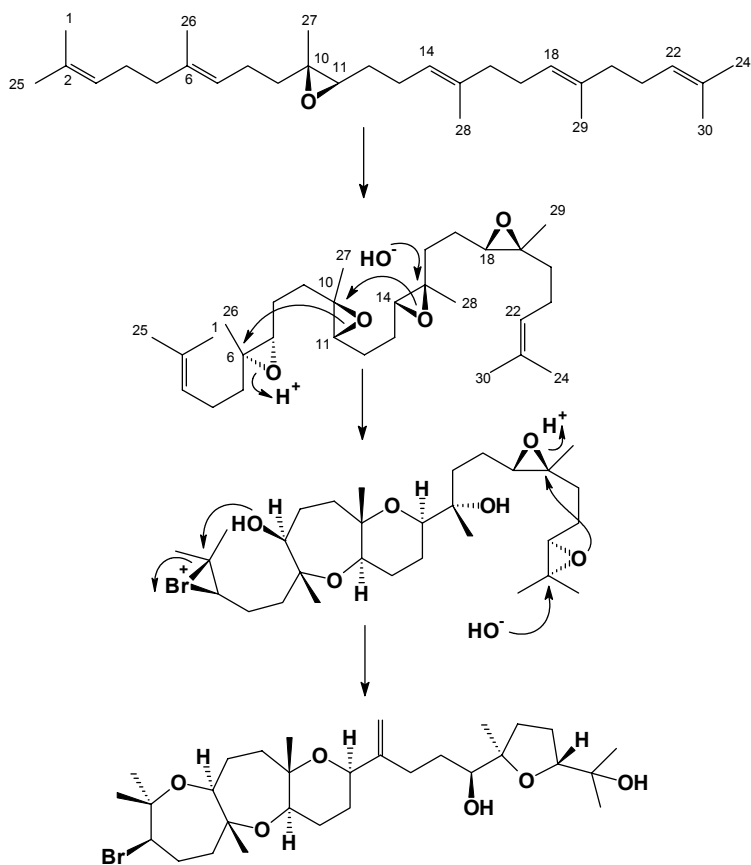
A continuación, los éteres cíclicos que constituyen los anillos A y D en el martiriol **67**, podrían formarse a partir de la protonación de los epóxidos en las posiciones 2,3*R* y 18*S*,19*S* y posterior reacción con los grupos hidroxilos presentes en los carbonos C-6 y C-15, respectivamente. El siguiente paso consistiría en la

hidroxilación en el carbono C-23, tal y como se describe en el Capítulo I de la presente memoria, y que entonces debería dar como resultado la configuración relativa propuesta como 15*S**, 19*R** y 22*R**, en base a estas consideraciones biogénicas (Esquema 8).



Esquema 8

Por otra parte, en el compuesto **68**, el dioxepandehidrotirsiferol, el anillo A podría formarse mediante la posterior ciclación del grupo hidroxilo en el carbono C-7 sobre el ión bromonio presente, evolucionando este intermedio según la ruta propuesta en el Esquema 9.



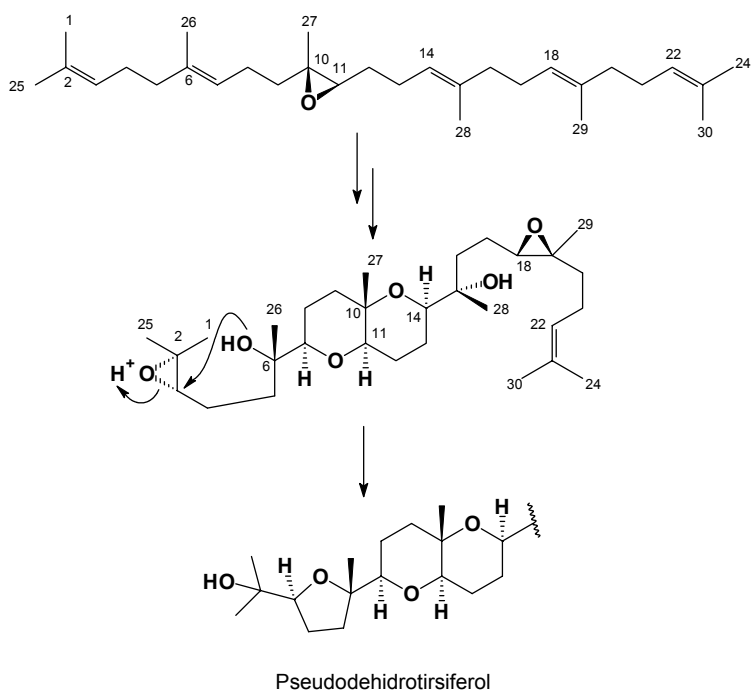
Dioxepandehidrotirsiferol

Esquema 9

III.2.2. Compuestos con el anillo A de cinco miembros 70-73

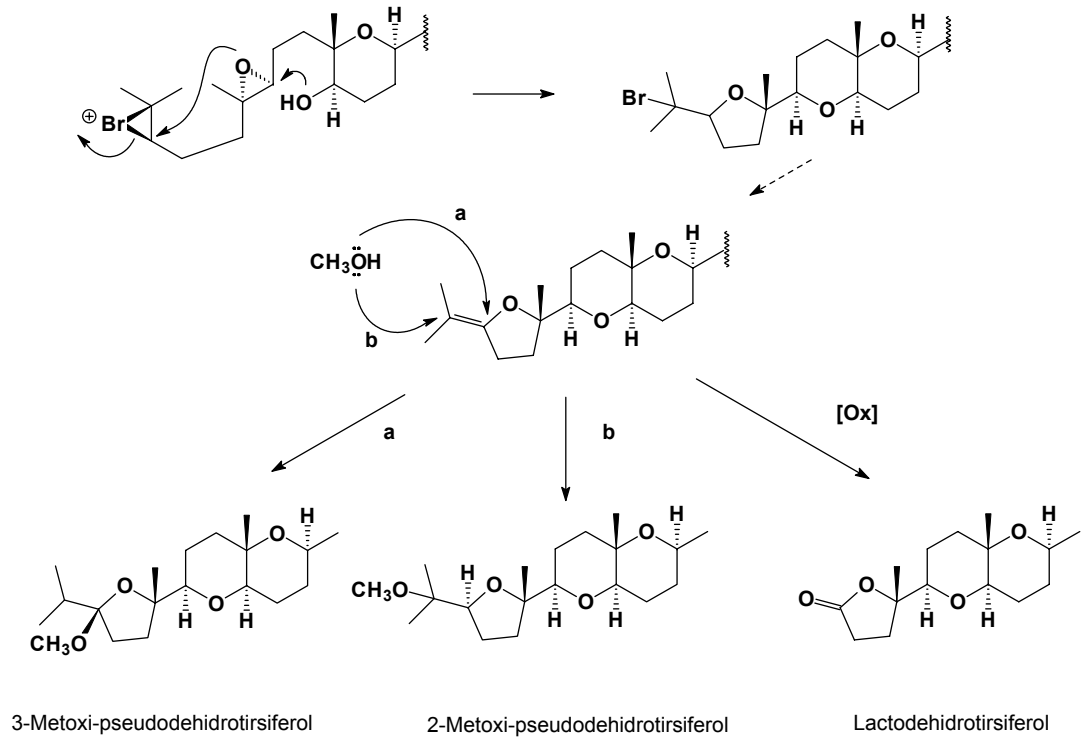
En el caso de compuestos donde el anillo A es un anillo de cinco miembros, se debe hacer una importante diferenciación entre el compuesto 70, el pseudodehidrotirsiferol, y el resto de los compuestos de esta serie, 71-73.

Así en el primer caso sería lógico suponer que la formación de este anillo se produce, una vez formado el sistema fusionado de anillos B-C como en el apartado anterior, vía la ciclación inducida por el grupo hidroxilo situado en el carbono C-6 sobre el epóxido protonado presente en las posiciones C-2-C-3, dando lugar al metabolito **70**, tal y como se describe en el Esquema 10.



Esquema 10

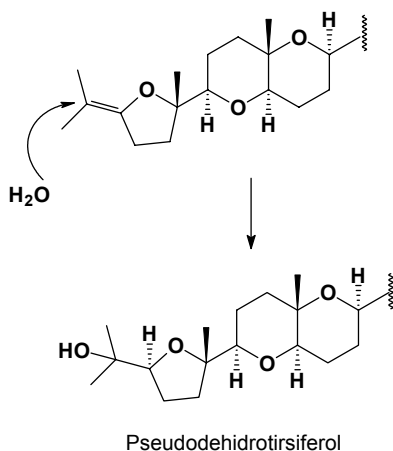
Sin embargo, para el otro grupo de metabolitos, los derivados **71-73**, podemos suponer que la ciclación sobre el ion bromonio se produce en el carbono C-3 dando lugar al intermedio **78**, aún sin identificar, que mediante pérdida de bromo daría lugar al compuesto **79**. A partir de este intermedio **79** con un sistema de enol-éter en el anillo A, se podría racionalizar el origen de los compuestos **71** y **72** por la incorporación de metanol en las posiciones 3 y 2, tal y como se describe en el Esquema 11 en las rutas a y b, respectivamente.



Esquema 11

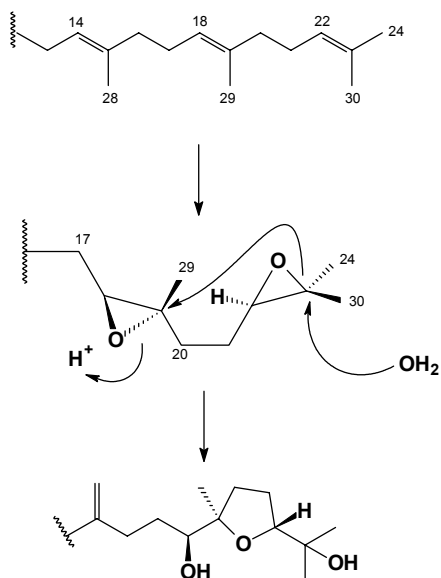
Por otra parte, la obtención de una γ -lactona en el anillo A tendría su origen en una fragmentación oxidativa que supusiera la pérdida de los carbonos C-1, C-2 y C-25 que se da en el lactodehidrotirsiferol **73** (Esquema 11).

Debido a que la incorporación de metanol se produce de forma selectiva dando lugar de forma mayoritaria a uno de los dos isómeros posibles, también cabe suponer que el pseudodehidrotirsiferol **70** podría tener su origen no en el epóxido formado en las posiciones C-2 y C-3 (Esquema 10), sino en el enol-éter **79** por una adición de agua similar a la que se describe para el metanol en la ruta b del Esquema 11 y que se muestra en el Esquema 12. Hasta el momento, y mientras no se aislen nuevos metabolitos en este género de algas rojas, no podemos discernir cuál de las dos alternativas es realmente la que conduce biogenéticamente al compuesto **70**.



Esquema 12

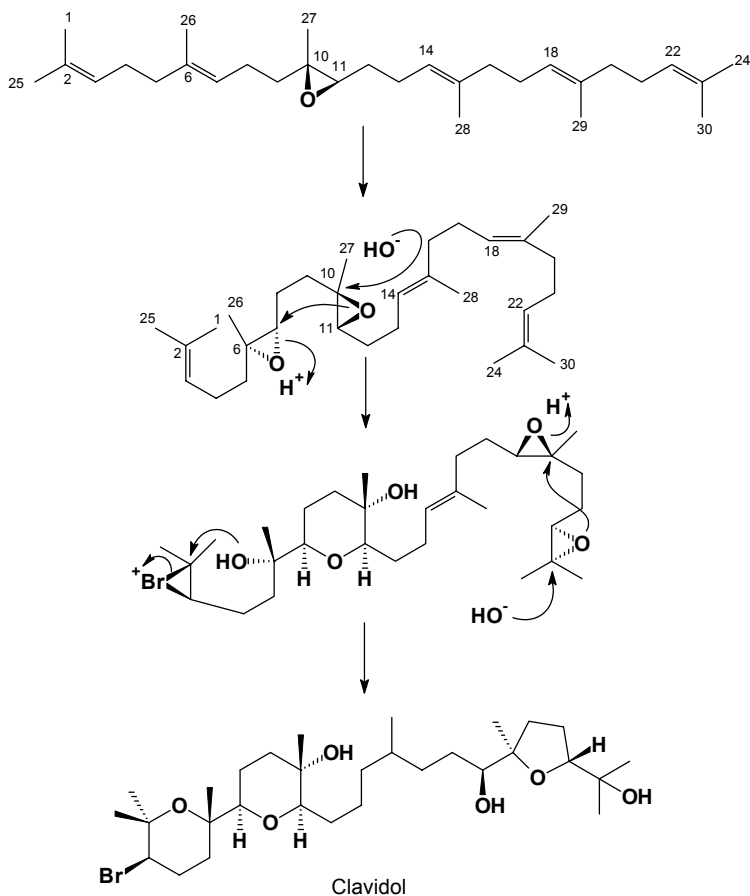
La propuesta biogenética de formación del anillo de tetrahidrofurano en estos metabolitos **70-73**, se resume en el Esquema 13, estando de acuerdo con la que recientemente hemos publicado¹ y que con más detalle se describió en el Capítulo I.



Esquema 13

III.2.3. Clavidol 69

Sin lugar a dudas, otro de los compuestos más interesantes desde el punto de vista biogénico es el clavidol 69. A la hora de intentar racionalizar el proceso de formación del mismo nos encontramos con la peculiaridad de la inexistencia del anillo C, además de la aparición del carbono C-15 totalmente hidrogenado. Con estos antecedentes y partiendo lógicamente del precursor común para todos los metabolitos de esta serie, el (10*R*,11*R*) epóxido de escualeno, este intermedio en un primer paso evolucionaría dando lugar a la formación del anillo B y posteriormente la ciclación sobre el ión bromonio daría lugar al anillo A, tal como se describe en el Esquema 14. La hidrogenación del doble enlace 14,15 nos conduce a la estructura propuesta aunque la configuración absoluta en el carbono C-15 permanece aún sin determinar. La propuesta biogénica para la formación del anillo tetrahydrofuránico como se ve es naturalmente la misma que en los casos anteriores.



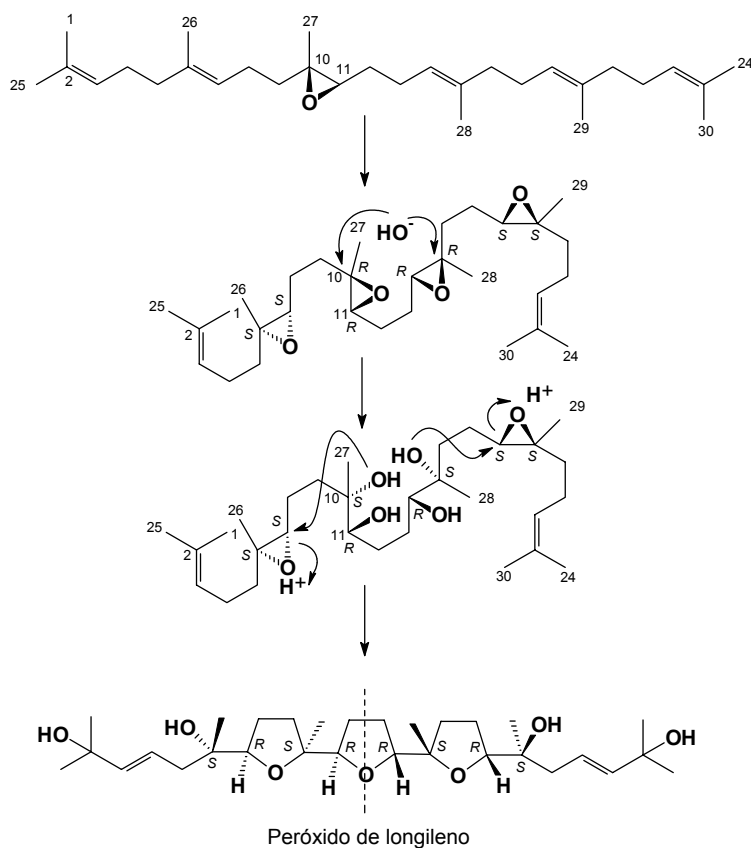
Esquema 14

III.2.4. Peróxido de longileno 76 y longileno 77

Otra singularidad de este género de algas es la presencia de compuestos triterpénicos meso. El primero de ellos fue el teurileno 24 aislado de *Laurencia obtusa*,⁸ que al igual que sucede en este alga, apareció junto a derivados del tirsiferol. En nuestro caso es si cabe aún más singular, ya que unido a la presencia de poliéteres triterpénicos con pautas de ciclación nuevas en la literatura, se suma el que un enantiómero del peróxido 76 hubiera sido aislado por Itokawa y col. de maderas de la

especie de origen terrestre *Eurycoma longifolia*,⁵⁷ y cuya estructura fue confirmada mediante difracción de rayos X; aunque su configuración absoluta quedó sin determinar. La diferencia entre ambas sustancias radica por lo tanto en el valor de la actividad óptica.

Obviamente, tanto para el peróxido de longileno **76**, como para el longileno **77**, proponemos una ruta de formación común comparable a la propuesta hecha por Suzuki y col.³¹ para el intricatetraol **25**, que daría lugar a dos fragmentos totalmente equivalentes en la molécula. El único paso que queda todavía sin explicación es la formación del anillo de tetrahidrofurano presente entre los carbonos C-11 y C-14 en el que ambos centros quirales siguen manteniendo la misma configuración (Esquema 15).



Esquema 15

IV. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE POLIÉTERES DE *L. VIRIDIS*

IV.1. ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE PROTEÍNA FOSFATASA PP2A

IV.1.1. Introducción

Los procesos de fosforilación-desfosforilación están considerados como las modificaciones más importantes que sufren las proteínas en el control de los procesos intracelulares. Se conoce además, que tienen lugar en una amplia variedad de organismos abarcando desde bacterias hasta mamíferos, y que están implicados en la regulación de múltiples funciones, incluyendo el control del ciclo celular, crecimiento y apoptosis, así como su metabolismo y las señales de transducción. La fosforilación de las proteínas ocurre en los hidroxiaminoácidos: serina (Ser, S), treonina (Thr, T) y tirosina (Tyr, Y); residuos que son modificados por las proteínas kinasas (PKs) dando origen a los *O*-fosfomonoésteres. Estos grupos fosfato en las proteínas fosforiladas, son hidrolizados por las proteínas fosfatasas (PPs). Por lo tanto, el estado de fosforilación de una proteína en particular es reversible, y está regulado por su correspondiente proteína kinasa y proteína fosfatasa.

Las proteínas fosfatasas (PPs) se dividen, según los residuos donde produzcan la desfosforilación, en: a) específicas para serina/treonina (PSPs), y b) específicas para tirosina (PTPs). Las PSPs fueron originariamente clasificadas como tipo 1 (PP1) y tipo 2 (PP2), sobre la base de la respectiva especificidad por la subunidad β o α de la fosforilasa kinasa correspondiente. Posteriormente, se demostró que las proteínas fosfatasas de tipo 1 (PP1) eran inhibidas por los inhibidores endógenos proteicos inhibidor-1 (I-1) e inhibidor-2 (I-2), mientras que las proteínas fosfatasas de tipo 2 (PP2) no se afectaban. La familia de proteínas fosfatasas PP2, por su parte, se subdividió en tres grupos en función de sus requerimientos iónicos: PP2A, que no depende de ningún metal para su actividad; PP2B o calcineurina, calmodulina dependiente de Ca^{2+} ; y PP2C, dependiente de Mg^{2+} o Mn^{2+} . Estudios de clonación

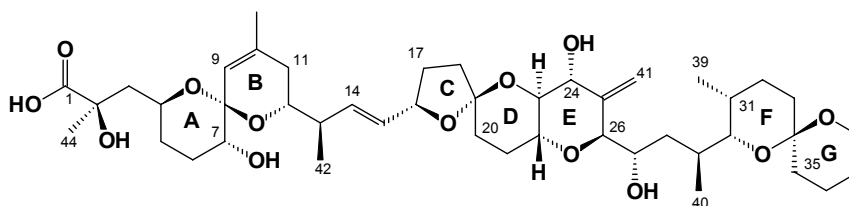
molecular han demostrado que PP1, PP2A y PP2B son productos de una misma familia de genes, denominados familia de genes PPP, mientras que por el contrario, PP2C tiene su origen en un gen totalmente diferente. Recientemente se han identificado las fosfatasas PP3, PP4, PP5, PP6 y PP7, también pertenecientes a la familia PPP. Los miembros de esta familia muestran un alto grado de homología en sus secuencias, y se encuentran dentro de las proteínas más conservadas durante la evolución.

PP1 y PP2A son las proteínas mayoritarias del grupo PSPs. Ambas tienen un amplio espectro de actividad y son capaces de desfosforilar un elevado número de sustratos cuando se realizan ensayos *in vitro*. Estudios más avanzados han demostrado que PP1 y PP2A existen como holoenzimas en la célula, con una subunidad catalítica (c) asociada a una o más proteínas reguladoras, las cuáles serían las responsables del reconocimiento específico del sustrato en el sitio catalítico.⁵⁸

IV.1.2. Tipos de inhibidores de proteínas fosfatasas

Los inhibidores selectivos de proteínas fosfatasas tienen su descubrimiento cuando en el año 1982, una molécula de origen marino y naturaleza polietérea, el ácido okadaico **80** (AO), causó contracción en las fibras aisladas de músculo liso en diferentes ensayos de laboratorio. Aunque se conocía que estas contracciones se iniciaban mediante un proceso de fosforilación de las cadenas ligeras de miosina se planteó la duda de que si se debían a una activación de la kinasa que fosforila la cadena ligera de miosina (MLCK), o a una inhibición de la fosfatasa correspondiente. Con posterioridad se demostró que la segunda suposición era la correcta, y el AO se convirtió en el primer inhibidor altamente selectivo de PSPs de la familia PPP, generando una nueva clase de inhibidores que ha sido ampliamente usada como una poderosa herramienta para el estudio de los procesos celulares mediados por fosforilación de proteínas.

⁵⁸ J. J. Fernández, M. L. Candenás, M. L. Souto, M. M. Trujillo y M. Norte, *Current Medicinal Chemistry*, **2001**, en prensa.



80 Ácido okadaico (AO)

Este grupo de inhibidores, conocidos como clase de inhibidores del ácido okadaico, desde el punto de vista estructural incluye: péptidos cíclicos como las microcistinas (microcistina LR **81**) y nodularinas (nodularina **82**), policétidos como la tautomicina **83** (TM) y caliculina-A **84** (CL-A), y terpenoides como la cantaridina **85** y el 23 acetato de tirsiferilo **4** (TA). La potencia de sus efectos sobre las proteínas fosfatasa está recogida en la Tabla 14.⁵⁹

	PP1	PP2A	PP2B
80 Acido okadaico, AO	20 nM	0.2-1 nM	>10 mM
81 Microcistina LR	0.1 nM	0.1 nM	
82 Nodularina	1.8 nM	0.03 nM	8.7 mM
83 Tautomicina, TM	0.7 nM	0.7 nM	70 mM
84 Caliculina A, CL-A	0.3-0.7 nM	0.2-1 nM	>10 mM
85 Cantaridina	0.5-2 mM	0.2 mM	>1 mM
4 23-Acetato de tirsiferilo, TA	>1 mM	4-16 μM	>10 mM

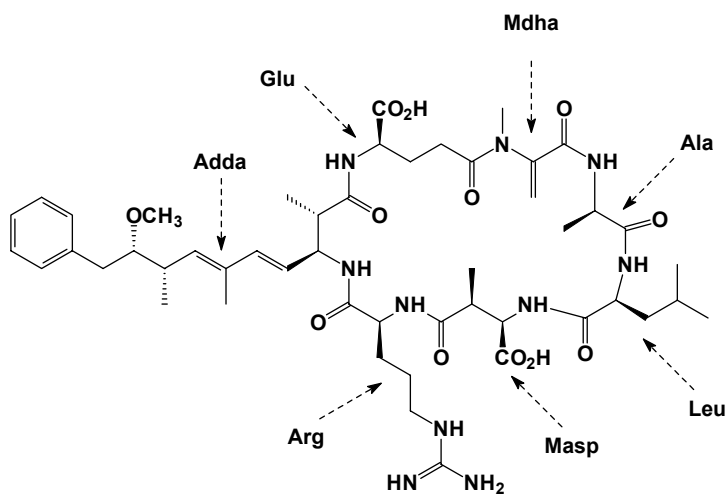
Tabla 14.- Valores de IC₅₀ de los inhibidores de la clase del AO.

IV.1.2.1. Péptidos cíclicos

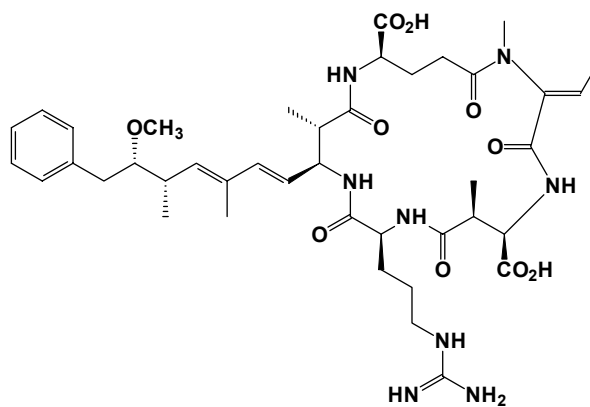
Éstas han sido aisladas de algas verde-azuladas que producen una gran variedad de péptidos relacionados. Los efectos tóxicos de estos compuestos se conocen desde hace siglos debido a los envenenamientos masivos que han producido

⁵⁹ J. E. Shepcke II, C. M. Gauss y R. Chamberlin, *Bioorg. Med. Chem.*, **1997**, *5*, 1739.

tanto en animales como en humanos. La familia de las microcistinas-XY (microcistina LR **81**) son heptapéptidos cíclicos, los cuales poseen varios D-aminoácidos, residuos de glutamato y β -metilaspártato, dehidroalanina y un raro aminoácido aromático, el ácido (2*S*,3*S*,8*S*,9*S*)-3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenil-4,6-deca-dienoico, que normalmente se abrevia como Adda. Muchos compuestos relacionados han sido identificados en los que las posiciones en el macrociclo denominadas X e Y han sido sustituidas por otro aminoácido de la serie L.



81 Microcistina LR



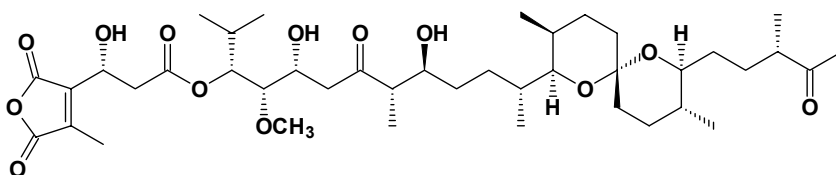
82 Nodularina

Las nodularinas son pentapéptidos cíclicos análogos a los anteriores, en el que los aminoácidos X y la alanina adyacente han sido eliminados del macrociclo.

IV.1.2.2. Policétidos

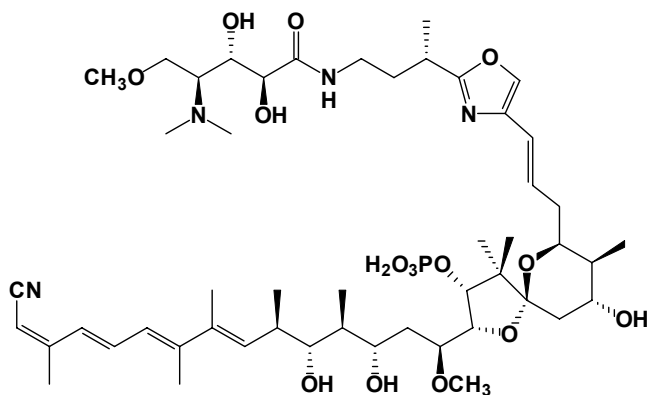
Las estructuras más interesantes de esta clase son, sin lugar a dudas, los policétidos. El ácido okadaico **80**, como ya hemos visto, fue el primero de todos ellos en ser descubierto. Muchas sustancias estructuralmente relacionadas con el ácido okadaico han sido aisladas e identificadas mostrando, en la mayoría de los casos, una potente actividad inhibitoria.

La tautomicina **83**, fue aislada a partir de cultivos de *Streptomyces spiroverticillatus* en el año 1987, y su estructura química fue resuelta con posterioridad, en 1993. Produce una considerable hepatotoxicidad, actividad antifúngica, y es también inductora de tumores como consecuencia de su potente inhibición de las proteínas fosfatasa de tipo PP1 y PP2A.



83 Tautomicina (TM)

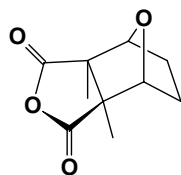
La caliculina-A **84** (CL-A) fue aislada de la esponja marina *Discodermia calyx*. Varios compuestos relacionados fueron también aislados de la misma y difieren fundamentalmente en la geometría de los dobles enlaces en las posiciones C-2 y C-6 y en el sustituyente en C-32. Sin embargo, todos ellos se mostraron igual de potentes en su efecto inhibitorio sobre PP1 y PP2A.



84 Caliculina A (CL-A)

IV.1.2.3. Terpenoides

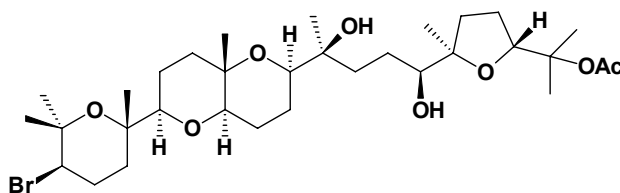
Dentro de los compuestos de naturaleza terpenoide, la cantaridina **85**, al igual que los péptidos cíclicos del apartado anterior, posee una historia amplia y rica. Es un poderosísimo vesicante usado en el siglo XIX para eliminar verrugas, pero su elevada toxicidad ha limitado su uso generalizado. Su aplicación más conocida ha sido por su uso como afrodisiaco y por sus propiedades abortivas. Este inhibidor simétrico meso es, con diferencia, el más sencillo y conformacionalmente rígido de todos los miembros del grupo de inhibidores de fosfatasa.



85 Cantaridina

El otro terpenoide a destacar es el 23-acetato de tirsiferilo **4** (TA), que como ya hemos dicho, fue aislado en 1985 de algas rojas del género *Laurencia*, concretamente

de la *L. obtusa*. Sin embargo, no fue hasta el año 1994 cuando se descubrió como un inhibidor selectivo de PP2A, con un $IC_{50}=4-16 \mu M$, dependiente de la concentración de enzima. Este compuesto no afecta a PP1, PP2B, PP2C o proteínas fosfatasa específicas para tirosina. Por este motivo puede ser una sustancia de elevado valor en los laboratorios para diferenciar claramente que procesos están regulados por PP2A.



4 23-Acetato de tirsiferilo (TA)

IV.1.3. Estudio preliminar sobre la inhibición de proteína fosfatasa tipo 2A por poliéteres de *Laurencia viridis*

Debido a que el 23-acetato de tirsiferilo **4** (TA) mostró ser una molécula con una elevada selectividad frente a PP2A con respecto al resto de las PPs de la misma familia, y que recientemente se ha descrito también para este compuesto efectos de inducción a la apoptosis,^{60,61,62} al disponerse de una serie importante de metabolitos aislados de *Laurencia viridis* con una gran variedad de estructuras relacionadas tanto los descritos en la presente memoria como los obtenidos con anterioridad en nuestro laboratorio,^{24,25,26} decidimos abordar, en colaboración con el Dr. Francisco Leira perteneciente a la Universidad de Vigo-ANFACO (Asociación Nacional de Conservas de Pescados y Mariscos), un estudio sobre la capacidad de inhibición sobre este enzima de las sustancias aisladas hasta el momento.

⁶⁰ S. I. Matsuzawa, T. Kawamura, S. Mitsuhashi, T. Suzuki, Y. Matsuo, M. Suzuki, Y. Mizuno y K. Kikuchi, *Bioorg. Med. Chem.*, **1999**, 7, 381.

⁶¹ K. Kikuchi, H. Shima, S. Mitsuhashi, M. Suzuki y H. Oikawa, *Int. J. Mol. Med.*, **1999**, 4, 395.

⁶² I. C. González y C. J. Forsyth, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 9099.

Desafortunadamente, metabolitos en principio muy interesantes como el acetato de predehidrovenustatriol **21**, el martiriol **67** y el 3-*epi*-dehidrotirsiferol **75**, debido a la poca cantidad de sustancia aislada y a la rápida descomposición que sufrieron, no se dispuso de la cantidad necesaria para realizar estos estudios preliminares.

Los ensayos de inhibición enzimática fueron realizados mediante una técnica de microplaca diseñada por Vieytes y col.⁶³ que consiste en medir mediante técnicas de fluorescencia la actividad enzimática de la proteína fosfatasa de tipo 2A utilizando como substrato difosfato de fluoresceína. Las disoluciones de las muestras a ensayar se prepararon a partir de una disolución matriz 10 mM en DMSO o en cloroformo:metanol (1:1) dependiendo de la solubilidad en cada uno de los casos. Los controles realizados en las condiciones de reacción para evaluar la influencia secundaria de estos disolventes orgánicos no revelaron la existencia de interferencias.

Los resultados de estos ensayos de inhibición enzimática sobre PP2A se resumen en las representaciones gráficas recogidas en el Capítulo V (apartado V.4.2) y en las Tablas 15 y 16. Así, en la Tabla 15 se recogen los porcentajes de inhibición de aquellas sustancias cuyo rango de actividad se encuentra entre 1 y 250 μM , mientras que en la Tabla 16 se describen los valores obtenidos para las sustancias menos activas y cuyo rango de inhibición se estableció para concentraciones que oscilan entre 100 y 250 μM .

De los resultados obtenidos destaca que prácticamente todos los poliéteres aislados de esta alga presentan actividad inhibitoria enzimática frente a proteína fosfatasa de tipo 2A. Si analizamos con más detalle la larga serie de modificaciones estructurales que se ensayaron, utilizando el compuesto mayoritario dehidrotirsiferol **3** como estructura base, se aprecian una serie de hechos, aunque la actividad de este metabolito en concreto es de las menos importantes.

⁶³ M. R. Vieytes, O. I. Fontal, F. Leira, J. M. V. Baptista de Sousa, y L. M. Botana, *Analytical Biochemistry*, **1997**, 248, 258.

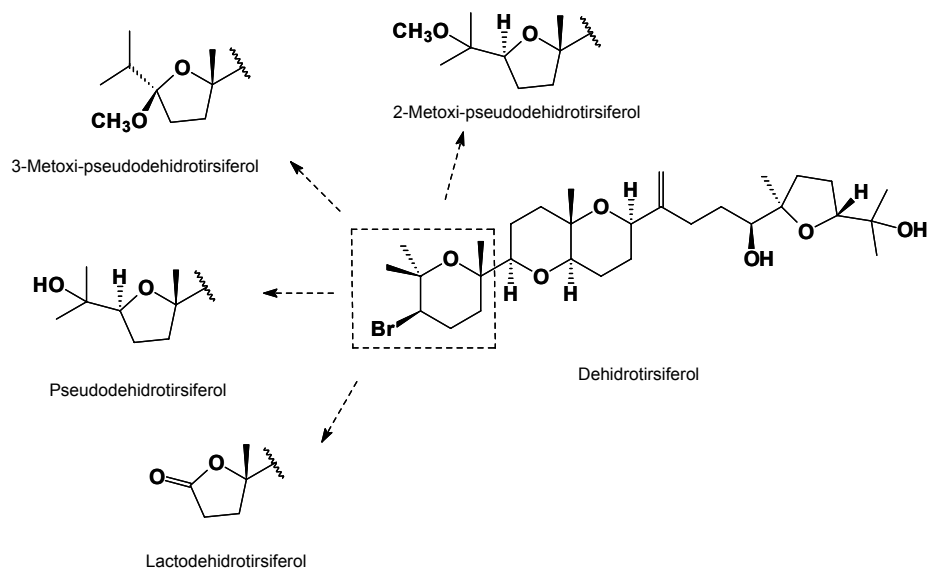
Compuestos	Concentraciones			
	1 μ M	10 μ M	100 μ M	250 μ M
68 Dioxepandehidrotirsiferol	18.9	20.4	59.7	66.5
69 ClavidoI	53.6	45.9	57.8	74.5
70 Pseudodehidrotirsiferol	0	0	40.4	55.4
71 3-Metoxi-pseudodehidrotirsiferol	0	2.7	43.1	55.4
72 2-Metoxi-pseudodehidrotirsiferol	0	4.7	65.1	57.2
73 Lactodehidrotirsiferol	33.7	40.1	49.4	63.2
74 16- <i>epi</i> -Hidroxidehidrotirsiferol	42.2	45.6	65.1	79.3
3 Dehidrotirsiferol	8.2	12.2	25.2	37.7
13 Isodehidrotirsiferol	0	6.2	74.7	81.3
15 Tirsenol A	15.2	31.8	89.6	97.8
16 Tirsenol B	52.8	93.2	99.1	100
17 Dehidrovenustatriol	7.5	23.7	66.8	95.3
19 10- <i>epi</i> -15,16-Dehidrotirsiferol	17.9	41.9	99.5	100
20 16-Hidroxidehidrotirsiferol	41.1	93.4	100	100
76 Peróxido de longileno	18.1	27.6	85.3	96.7

Tabla 15.- Porcentajes de inhibición de PP2A.

Compuestos	Concentraciones				
	100 μ M	125 μ M	150 μ M	200 μ M	250 μ M
14 10- <i>epi</i> -Dehidrotirsiferol	11.4	24.0	26.1	47.8	66.4
18 15,16-Dehidrovenustatriol	6.5	18.8	32.7	35.8	59.8

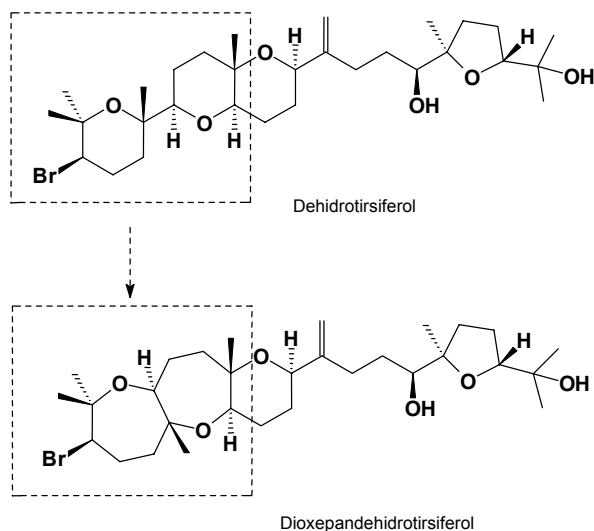
Tabla 16.- Porcentajes de inhibición de PP2A.

Por un lado, aquellos compuestos que poseen en el anillo A (Esquema 16) un sistema de tetrahydrofurano en lugar de un sistema de tetrahydropirano y que van acompañados por la pérdida del átomo de bromo presente en el carbono C-3 del dehidrotirsiferol **3**, casos del pseudodehidrotirsiferol **70**, 3-metoxi-pseudodehidrotirsiferol **71** y 2-metoxi-pseudodehidrotirsiferol **72**; o aquél con fragmentación en el esqueleto carbonado como es el caso del lactodehidrotirsiferol **73**; muestran unos porcentajes de inhibición parecidos, entre 40-65 %, a concentraciones de 100 μM . Destacar que la pendiente de actividad del metabolito **73** es más suave, por lo que este compuesto presenta una menor selectividad.



Esquema 16.- Metabolitos que presentan modificaciones en el fragmento de carbonos C-1 \rightarrow C-6 con respecto al dehidrotirsiferol **3**, producto mayoritario y estructura de referencia.

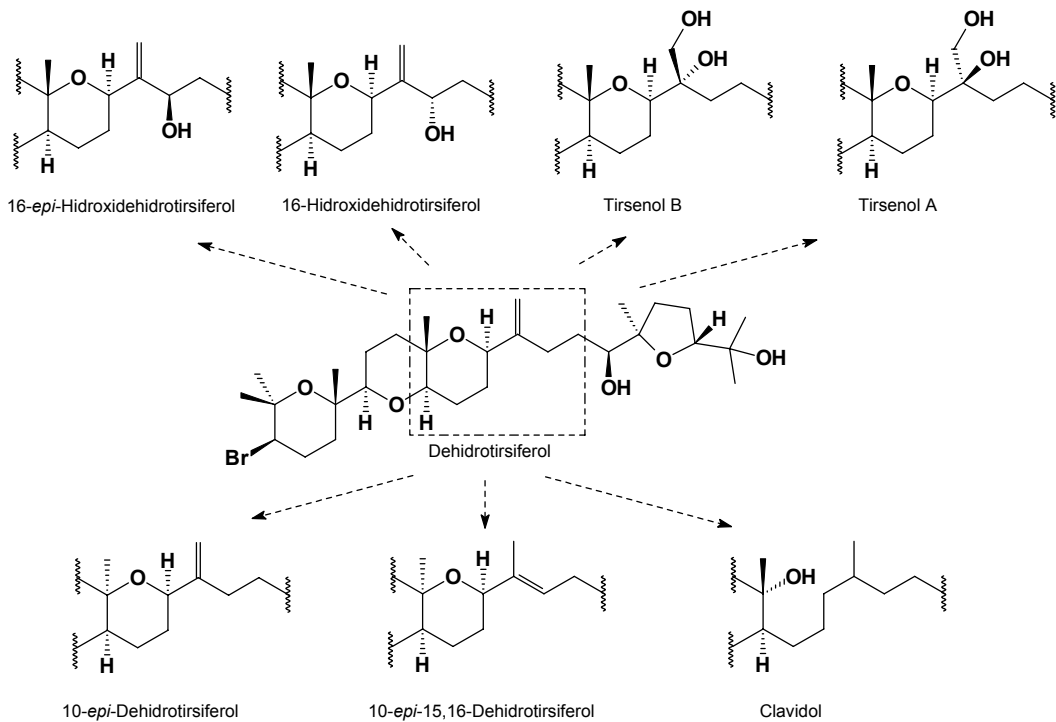
De igual forma que en el caso anterior, cuando la modificación se extiende a los anillos A y B, como es el caso del dioxepandehidrotirsiferol **68**, en el que aparecen dos anillos de oxepano fusionados en lugar de dos anillos de tetrahydropirano aislados, la actividad inhibitoria enzimática observada es también moderada y de baja selectividad (Esquema 17).



Esquema 17.- El dioxepandehidrotirsiferol **68** presenta modificaciones en el fragmento de carbonos C-1 → C-11.

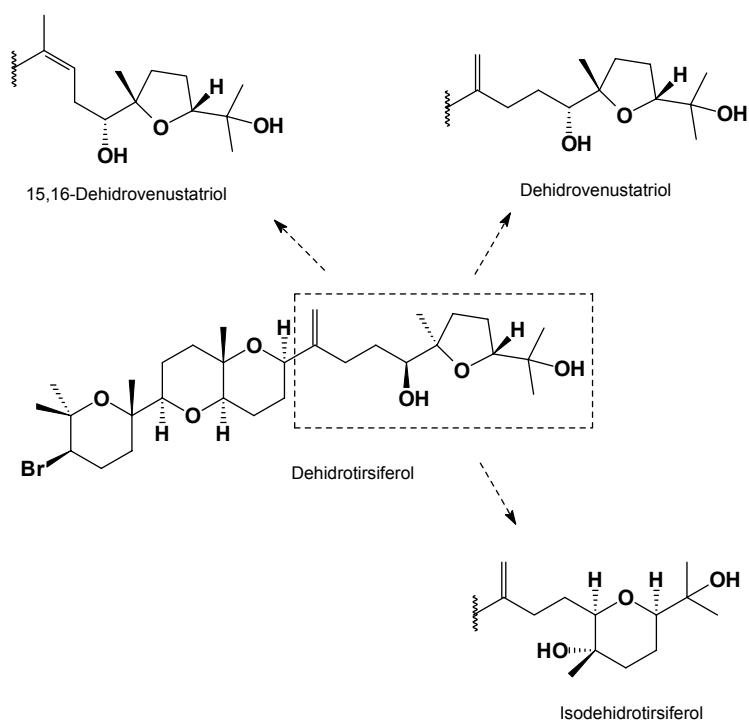
Tal vez donde se dispuso de un número mayor de modificaciones son las que comprenden el fragmento entre los carbonos C-11→C-16 (Esquema 18). De entre todas ellas podemos destacar tres grupos: un primer ejemplo que presenta simplificación en el número de anillos, otro en el que aparecen nuevos átomos de oxígeno en la molécula, y finalmente un tercer grupo que implica cambios en la configuración de un determinado carbono o posición de dobles enlaces.

En el primer caso, cuyo ejemplo es el clavidol **69**, la actividad observada para él es comparable al resto de los metabolitos analizados hasta el momento, aunque la pendiente de la recta parece aumentar ligeramente entre 100 y 250 μM . Sin embargo, en el caso de los otros dos grupos, existen algunas sustancias que se muestran como inhibidores de mayor potencia y que por similitudes estructurales se pueden analizar por parejas. Así, observando de forma detenida este fragmento podemos apreciar que tanto el tirsenol A **15** como el tirsenol B **16** son excelentes inhibidores a una concentración de 250 μM , pero el segundo, el tirsenol B, es unas 25 veces más activo, logrando un efecto de inhibición de un 93.2 % a concentración de 10 μM .



Esquema 18.- Modificaciones en el fragmento C-10 → C-16.

En el otro par de compuestos, el 16-hidroxi-dehidrotirsiferol **20** y el 16-*epi*-hidroxi-dehidrotirsiferol **74**, donde la variación se encuentra tan sólo en la quiralidad del carbono C-16, la diferencia es aún más manifiesta siendo el primero la sustancia que muestra una mayor potencia. Otra pareja de compuestos también estrechamente relacionada estructuralmente es la formada por el 10-*epi*-dehidrotirsiferol **14** y el 10-*epi*-15,16-dehidrotirsiferol **19**. El que el doble enlace esté presente entre los carbonos C-15–C-28 o entre los carbonos C-15–C-16, en este caso, supone que por ejemplo a concentraciones de 100 μM , el compuesto **14** sólo haya inhibido un 11 % de la actividad de la fosfatasa mientras que la inhibición producida por el compuesto **19** haya sido prácticamente total.



Esquema 19.- Modificaciones en el fragmento final de la cadena flexible entre los carbonos C-14 \rightarrow C-22, donde se produce un cambio en la estereoquímica y en el tamaño del anillo D.

Finalmente, el último grupo de modificaciones ensayadas están relacionadas principalmente con el anillo D, y presentan tanto cambios en la estereoquímica de los centros C-18 y C-19, como la sustitución de un sistema de tetrahidrofurano por uno de tetrahidropirano. En ambos casos los aumentos en la actividad inhibitoria que se aprecian no fueron tan significativos como en el caso anterior aunque superiores a los otros grupos. También se observa según se dé la isomerización del doble enlace de *exo* a *endo*, en la pareja de compuestos dehidrovenustatriol **17** y 15,16-dehidrovenustatriol **18**, una fuerte caída en la actividad de inhibición, aunque en sentido contrario a los metabolitos **14** y **19**.

Como ejemplo del otro grupo de sustancias con esqueleto totalmente diferente a los anteriores, fue ensayado el peróxido de longileno **76**, donde únicamente debemos resaltar que a concentraciones de 100 μM presenta un porcentaje de inhibición del 85.3%.

A la vista de estos resultados podemos concluir que todos los metabolitos estudiados hasta el momento presentan actividad como inhibidores de la enzima proteína fosfatasa de tipo 2A siendo los compuestos con mayor actividad el tirsenol B **16** y el 16-hidroxidehidrotirsiferol **20** con porcentajes de inhibición del 93.2% y 93.4%, respectivamente, a concentraciones 10 μM . Aunque ligeramente menos activo que los anteriores, debemos destacar el 10-*epi*-15,16-dehidrotirsiferol **19** que alcanza rangos altos de inhibición del 99.5% pero a concentraciones diez veces mayor. Hasta el momento, tal como se desprende de la lectura de la presente memoria, tan sólo hemos tenido la oportunidad de ensayar la actividad de un número particular y limitado de variaciones moleculares, aquellas que son obtenidas de fuente natural, y que nos han servido de base para obtener esta serie de datos preliminares. Del mismo se puede extraer que los mayores incrementos en la potencia de estas sustancias se presentan cuando se modifican por la introducción de un grupo hidroxilo las posiciones C-15 y C-16, y también que la configuración relativa de dichos centros condiciona en gran medida su potencia, tal y como podemos observar en los C-16 hidroxiderivados donde

el compuesto con configuración relativa S^* presenta un IC_{50} significativamente menor que el R^* .

IV.2. ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD

Son innumerables los agentes terapéuticos químicos que la investigación del siglo XX ha puesto a nuestra disposición, y esa cifra no cesa de incrementarse. El arsenal para combatir las enfermedades incluye también analgésicos, anestésicos, diuréticos, etc. De igual forma, se ha extendido la aplicación del concepto de quimioterapia para englobar los agentes antivíricos y anticancerígenos en los que se han incorporado adiciones sustanciales. El desarrollo de agentes antivíricos eficaces adquirió enorme importancia con la aparición del virus de la inmunodeficiencia adquirida, mientras que las sustancias anticancerígenas, debido a la gran diversidad de tipos de cáncer son siempre de interés prioritario.

Es evidente que todos los fármacos se descubren y desarrollan a través de los ensayos de actividad biológica. En la actualidad y a diferencia de lo que solía hacerse, los ensayos al azar de colecciones de sustancias potencialmente activas son cada vez menos frecuentes y se restringen a sustancias previamente escogidas. Sólo en los ensayos para la búsqueda de nuevos antibióticos y en los nuevos agentes anticancerígenos se suele seguir trabajando de esta manera. En cualquier caso, los ensayos de actividad originan generalmente unos pocos *cabezas de serie* que mediante modificaciones moleculares, generan nuevos candidatos para tales ensayos.

El caso de los poliéteres derivados del escualeno que se aíslan del género *Laurencia*, es tal vez un buen ejemplo de todo lo dicho. Es a finales de los años ochenta cuando se describen las primeras actividades citotóxicas potentes y selectivas para este tipo de metabolitos, que han marcado los ensayos biológicos posteriores ya que a todas las nuevas estructuras se le ha valorado su citotoxicidad.

Nuestros primeros trabajos en este campo comenzaron con el estudio de la actividad del dehidrotirsiferol **3** y de la primera serie de nuevos metabolitos aislados de *Laurencia viridis*, ya que en colaboración con la empresa PharmaMar S.A. se pudo determinar el IC₅₀ frente a cuatro líneas tumorales:

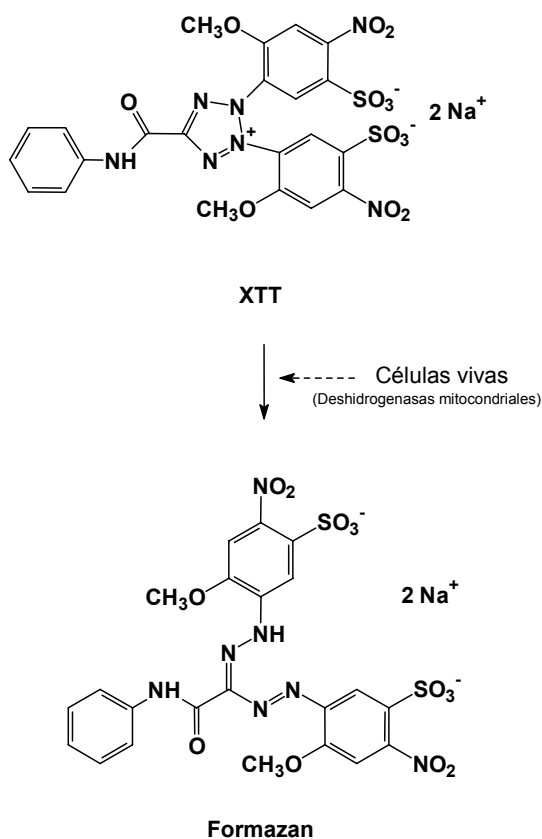
- Suspensión de células P-388 (ATCC CCL-46) de neoplasma linfoide de ratón BDA/2
- Líneas de células A-549 (ATCC CCL-185) de carcinoma de pulmón humano
- Líneas de células HT-29 (ATCC HTB-38) de carcinoma de colón humano
- Líneas de células MEL-28 (ATCC HTB-72) de melanoma humano

Siguiendo con esta pauta de trabajo, a algunos representantes de la nueva serie de compuestos que se recogen en la presente memoria, el martiriol **67**, el dioxepandehidrotirsiferol **68**, el pseudodehidrotirsiferol **70** y el 16-*epi*-hidroxidehidrotirsiferol **74**, se les realizó ensayos de citotoxicidad frente a las líneas celulares anteriores no mostrando actividad a concentraciones inferiores a 10 µg/mL.

Debido a que ninguno de los metabolitos ensayados había mostrado una potente actividad frente a las líneas de células descritas y como consecuencia de que el dehidrotirsiferol mostró unos excelentes resultados frente a líneas de células KB, decidimos evaluar los metabolitos disponibles frente a una línea celular de este tipo. Así, en colaboración con la Dra. Martina K. Pec, se realizaron los ensayos de citotoxicidad frente a células epidermoides humanas KB-3-1 con los nuevos compuestos dioxepandehidrotirsiferol **68**, clavidol **69**, pseudodehidrotirsiferol **70**, 2-metoxi-pseudodehidrotirsiferol **72**, lactodehidrotirsiferol **73** y peróxido de longileno **76**.

Los ensayos se realizaron utilizando el método de sal de tetrazolium XTT que consiste en la metabolización de esta sustancia de color amarillo a la sal de formazan de color naranja por deshidrogenasas mitocondriales cuya cuantificación nos da idea del porcentaje de las células con vitalidad. Este compuesto de metabolización es

cuantificado directamente mediante el uso de técnicas espectrofotométricas. Siguiendo las instrucciones del fabricante la medición de absorbancia se realizó en un lector ELISA Spectra SLT Rainbow a una longitud de onda de 490 nm/ref. 630 nm. Las determinaciones se realizaron por triplicado. Los efectos moduladores directos de los metabolitos sobre las enzimas mitocondriales responsables de reducir la tintura del XTT se excluyeron por comparación de los valores de absorbancia de células tratadas y no tratadas después de una hora de incubación. Los controles con los vehículos usados para las disoluciones a las concentraciones experimentales revelaron la ausencia de efectos secundarios (Esquema 20).



Esquema 20

Las curvas estándar fueron calculadas estadísticamente por regresión no lineal de los datos medidos a diferentes concentraciones. Las concentraciones de IC₅₀ se derivaron de las curvas de dosis-respuestas a la que se produce la inhibición del 50 % del crecimiento celular (Capítulo V, apartado V.5.3).

Todas las sustancias mostraron problemas para solubilizarse adecuadamente a la hora de preparar las disoluciones a las diferentes concentraciones de ensayo. El disolvente utilizado para la preparación de las mismas fue DMSO y en ningún caso superó los niveles de 10 µg/mL en las disoluciones finales ensayadas. Los valores correspondientes a los IC₅₀ obtenidos se recogen en la Tabla 17. Los compuestos que presentan una mayor actividad fueron el pseudodehidrotirsiferol **70** y el peróxido de longileno **76**, con IC₅₀ de 3.11 y 3.81 µg/mL, respectivamente.

Compuestos	IC₅₀ (µg/mL)
68 Dioxepandehidrotirsiferol	9.49
69 Clavidol	11.60
70 Pseudodehidrotirsiferol	3.11
72 2-Metoxi-pseudodehidrotirsiferol	12.08
73 Lactodehidrotirsiferol	21.29
76 Peróxido de longileno	3.81

Tabla 17.- Valores de IC₅₀ de los metabolitos de *Laurencia viridis* ensayados frente a células KB-3-1.

V. PARTE EXPERIMENTAL

V.1. TÉCNICAS EXPERIMENTALES GENERALES

a) Resonancia Magnética Nuclear

Para la realización de los experimentos de RMN, los productos fueron disueltos en CDCl_3 , usando la señal del CHCl_3 residual (7.26 ppm) como referencia interna. Dichos espectros, tanto de ^1H como de ^{13}C , fueron realizados en espectrómetros BRUKER[®], AMX 400 y 500 MHz, AVANCE 300 y 400 MHz según las necesidades. Se utilizaron los programas ^1H , ^{13}C , DEPT, TOCSY-1D, GOESY, COSY, COSY DQF, TOCSY, ROESY, HMBC, HMQC, HSQC, HSQC-TOCSY que fueron suministrados por la casa BRUKER[®]. Los datos de adquisición obtenidos en el espectrómetro fueron procesados en un PC usando el programa WIN-NMR.

b) Infrarrojo

Los espectros de IR fueron realizados usando el producto en disolución de cloroformo seco. Se utilizó un espectrofotómetro BRUKER[®], modelo IFS 55 (F.T.I.R.).

c) Masas

Los espectros de masas de baja y alta resolución fueron realizados en un espectrómetro VG-Autospec FISIONS.

FAB (Bombardeo con Átomos Acelerados): Se utilizó el mismo espectrómetro de masas donde las muestras se introdujeron mediante sonda de sólidos calentada de 30 a 280°C. La temperatura de la fuente de ionización se fijó entre 150-250°C según la experiencia realizada. Como gas se usó xenon. Como matriz se usó *m*-nitrobenzol (NBA) que se salinizó con NaI.

d) Rotación óptica

Las determinaciones de las actividades ópticas se realizaron en un polarímetro PERKIN-ELMER[®], modelo 241, a 25°C, usando la línea D del sodio y en disolución de cloroformo seco usando células de 1 dm.

e) Cromatografía de gel-filtración

Para este tipo de cromatografía se usó como soporte Sephadex LH-20, de PHARMACIA FINE CHEMICALS[®], y las columnas se montaron siguiendo las instrucciones del fabricante usando como disolvente metanol. La mezcla eluyente utilizada fue en todos los casos *n*-hexano:cloroformo:metanol en las proporciones 2:1:1.

f) Cromatografía en columna

Las cromatografías de los productos en columna fueron realizadas sobre gel de sílice 60, tipos G y H, de diferentes tamizados, de la casa MERCK[®]. La preparación de las columnas se realizó por dos procedimientos:

a.- Aplicando vacío por el extremo inferior de la columna, se vierte gel en su interior al tiempo que se somete a vibración. Luego se añade la mezcla de elución hasta que se humedezca totalmente el lecho. Cuando se ha eliminado todo el aire del soporte de sílice, se adiciona la mezcla a separar, ya sea disuelta en el mismo eluyente o bien impregnada en gel de sílice de tamizado superior al usado para formar el lecho. La relación de peso de producto/peso de gel de sílice, fue siempre superior a 1/100.

b.- Se forma una papilla con gel de sílice y el eluyente a utilizar. Una vez formada una mezcla homogénea, se vierte en la columna y se deja depositar por gravedad. A continuación se aplica presión con una bomba de émbolo, FLUID METERING[®] modelo RP-SY. En este procedimiento, la relación peso de mezcla de productos/peso de gel de sílice, fue como mínimo de 1/200.

En los últimos estadios del aislamiento, la cromatografía se realizó en columnas preempaquetadas LOBAR[®] GRÖBE B (310-25) LICHROPREP Si 60 y RP 18 (40-63 μm) de la casa MERCK[®] y bombas de media presión.

g) Cromatografía HPLC

En este tipo de cromatografía se utilizó un sistema de HPLC compuesto por una bomba HPLC LKB[®], modelo 2248, con columnas μ -Bondapak C-18 (D.I. 1.9 cm, longitud 15 cm) y μ -Porasil (D.I. 1.9 cm, longitud 15 cm) usando un detector de fotodiodo 2MD RAPID SPECTRAL, LKB[®]. El flujo empleado en todas las cromatografías nunca fue superior a 2.5 mL/min.

h) Cromatografía en capa fina

La evolución de las cromatografías en columna se siguió mediante cromatografía en capa fina con placas de la casa MERCK[®], tipo F-1500/LS254. Para el revelado se siguieron diversos procedimientos:

- a) Pulverización sobre la placa de una disolución de H₂SO₄:H₂O:AcOH (1:4:20) y posterior calentamiento a 140°C.
- b) Pulverización sobre la placa de una disolución de vainillina (3g):AcOH (40mL):H₂SO₄ (30mL):EtOH (450mL), y posterior calentamiento a 140°C.
- c) Visualización de la placa a la exposición de luz UV (254nm).

Las cromatografías en general fueron eluidas en sistemas formados por mezclas de *n*-hexano:acetato de etilo.

V.2. RECOLECCIÓN Y EXTRACCIÓN DEL ALGA *LAURENCIA VIRIDIS*

La recolección principal del alga fue realizada en Paraíso Floral, Tenerife, durante los meses de Abril-Mayo de 1999. La recolección se realizó a mano durante la bajamar, tras lo cual se llevó inmediatamente en neveras a nuestro laboratorio. Una vez separada de otros organismos con los que es inevitablemente recogida, la muestra fue macerada con una mezcla de cloroformo:metanol (1:1) a temperatura ambiente durante cuatro días. La muestra no fue pesada en fresco y después de macerada dio lugar a 5.2 Kg de residuo seco y molido, que posteriormente fue extraído hasta agotamiento en un aparato soxhlet con diclorometano. La reunión de los extractos así

obtenidos fue evaporada al vacío obteniéndose un extracto de aspecto oleoso y de color marrón verdoso que pesó 77.5 g.

V.3. MARCHA CROMATOGRÁFICA DEL EXTRACTO

El extracto fue cromatografiado en tres porciones en una columna de gel de sílice de D.I. 9 cm x 40 cm de longitud, usando como eluyente mezclas de *n*-hexano y acetato de etilo de polaridad creciente. Se recogieron fracciones de 250 mL, correspondiendo los metabolitos descritos en esta memoria a la reunión de fracciones de una polaridad aproximada de 3:2 (fracción 1), 2:3 (fracción 2) y 1:4 (fracción 3).

Después de la evaporación del disolvente, el residuo obtenido en los tres casos, fue cromatografiado en una columna de Sephadex LH-20 (D.I. 7 cm, longitud 60 cm) eluida con la mezcla cloroformo:metanol:*n*-hexano (1:1:2), y a continuación, en una columna pre-empaquetada Lobar (D.I. 2.5 cm, longitud 31 cm), fase normal (Lichroprep Si 60) para las fracciones iniciales 1 y 2, y fase reversa (Lichroprep RP 18) en MeOH:H₂O (9:1) para el caso de la más polar.

Estudio de la fracción 1

Como resultado de las cromatografías anteriores, en el caso de la fracción 1, se obtuvo el clavidol **69** y el dioxepandehidrotirsiferol **68**, cuya purificación final fue realizada a través de HPLC en columna, respectivamente, de fase normal μ -Porasil en *n*-hexano:acetato de etilo (1:1), y fase reversa μ -Bondapak C-18 en acetonitrilo:agua (9:1).

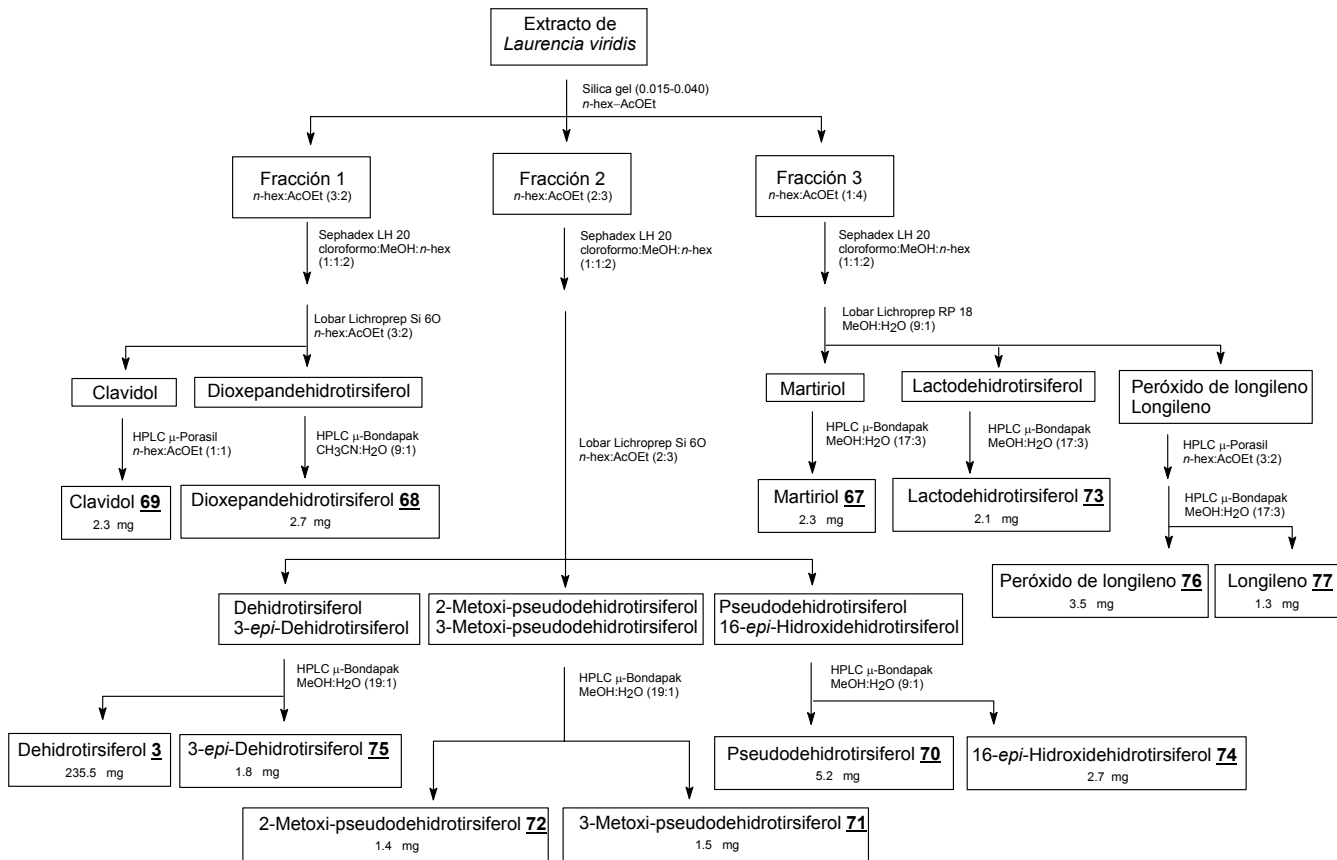
Estudio de la fracción 2

A partir de esta fracción se obtuvieron tres mezclas de triterpenos. Para la purificación de estos metabolitos fue necesario recurrir en todos los casos a la cromatografía HPLC de fase reversa usando una columna μ -Bondapak C-18 variando la composición de la fase móvil según las necesidades en cada caso. La pareja de

triterpenos que eluye en primer lugar en la cromatografía de gel de sílice, está formada por el dehidrotirsiferol **3** (incluimos este compuesto conocido en la descripción cromatográfica a modo de referencia ya que es el mayoritario) y el 3-*epi*-dehidrotirsiferol **75**, utilizándose para su separación la mezcla binaria metanol:agua (19:1). Para separar la segunda mezcla, el 2-metoxi-pseudodehidrotirsiferol **72** y el 3-metoxi-pseudodehidrotirsiferol **71**, la fase móvil fue idéntica al caso anterior. La tercera mezcla está compuesta por el pseudodehidrotirsiferol **70** y el 16-*epi*-hidroxidehidrotirsiferol **74**, que fue separada usando la mezcla binaria MeOH:H₂O (9:1) como fase móvil.

Estudio de la fracción 3

A partir de esta fracción se obtuvieron cuatro poliéteres, para cuya separación en una primera etapa se procedió, como indicamos anteriormente, al uso de una columna Lobar Lichroprep RP 18 y MeOH:H₂O (9:1) como eluyente. Para la purificación final de los componentes de esta fracción fue necesario el uso del HPLC, en unos casos a través de fase reversa μ -Bondapak C-18 en MeOH:H₂O, y en otros casos mediante una columna de μ -Porasil de gel de sílice utilizando *n*-hexano:acetato de etilo, en las proporciones que se indican en el Esquema 21



Esquema 21

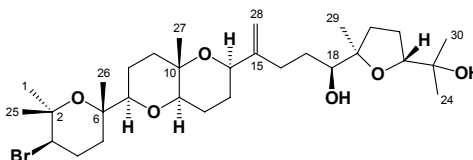
DATOS FÍSICOS DEL DEHIDROTIRSIFEROL 3

Cristales en forma de agujas blancas

$[\alpha]_D^{25} = -203$ (c 0.64, CHCl_3)
p.f. = 103 °C

IR ν_{max} (CHCl_3): 3450, 3100, 1640, 1450,
1370 y 1320 cm^{-1}

RMN ^1H y ^{13}C (CDCl_3)



n° C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	J (Hz)
1	31.0	1.27	s	
2	74.9			
3	59.0	3.89	dd	4.1; 12.6
4	28.2	2.13		
5	37.1	2.26 1.52 1.80		
6	74.4			
7	86.7	3.08	dd	2.5; 11.0
8	22.9	1.49 1.76 1.44 1.77		
9	38.7			
10	72.9			
11	78.9	3.43	dd	5.7; 11.3
12	21.8	1.60 1.81 1.86 2.11		
13	26.6			
14	72.5	4.28	dd	4.0; 8.1
15	151.3			
16	29.9	2.12 2.43		
17	30.3	1.45 1.63		
18	76.2	3.52	dd	1.7; 10.4
19	86.0			
20	31.7	1.60 2.12		
21	26.3	1.84 (2H)		
22	87.6	3.76	dd	6.0; 9.9
23	70.5			
24	24.0	1.12	s	
25	23.6	1.39	s	
26	20.1	1.20	s	
27	19.4	1.23	s	
28	109.8	4.88 5.05	bs bs	
29	23.7	1.14	s	
30	27.7	1.21	s	

HRMS: $[\text{M}^+]$ no observado
506.360610 (Calc. 506.36074, $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_6$ $[\text{M}^+ - \text{HBr}]$)

MS a m/z: 529, 527, 506, 445, 443, 401, 363, 319, 207, 205, 143, 125, 59

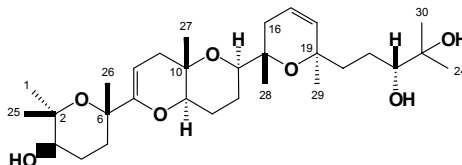
DATOS FÍSICOS DEL MARTIRIOL 67

Sólido amorfo de color blanquecino

$[\alpha]_D^{25} = +4$ (c 0.03, CHCl₃)

IR ν_{\max} (CHCl₃): 3688, 3456, 3022, 2929, 2855, 1731 y 1602 cm⁻¹

RMN ¹H y ¹³C (CDCl₃)



n° C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	J (Hz)
1	29.7	1.21	s	
2	85.7			
3	82.8	3.99	dd	6.0; 10.0
4	28.1	1.52		
		1.93		
5	35.0	1.78		
		2.06		
6	85.2			
7	170.5			
8	98.8	5.34	dd	2.0; 6.0
9	35.2	1.90	dd	2.0; 12.0
		2.05	dd	6.0; 12.0
10	85.9			
11	84.5	3.96	dd	6.0; 10.0
12	21.2	1.78		
		2.03		
13	29.1	1.55		
		1.98		
14	85.7	4.06	dd	5.7; 10.3
15	73.8			
16	41.5	2.07	dd	5.3; 13.0
		2.23	dd	2.7; 13.0
17	122.2	5.66	ddd	5.3; 2.7; 11.0
18	141.1	5.64	d	11.0
19	70.6			
20	31.4	1.56		
		2.07		
21	25.8	1.92		
		2.06		
22	84.3	3.85	dd	4.5; 7.5
23	70.6			
24	24.0	1.12	s	
25	24.9	1.16	s	
26	21.2	1.20	s	
27	29.8	1.12	s	
28	24.8	1.19	s	
29	29.7	1.30	s	
30	28.0	1.18	s	

HRMS: 524.37147 (Calc. 524.371304, C₃₀H₅₂O₇ [M⁺])

MS a m/z: 524, 436, 365, 322, 277, 237

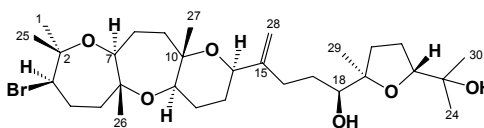
DATOS FÍSICOS DEL DIOXEPANDEHIDROTIRSIFEROL 68

Sólido amorfo de color blanquecino.

$[\alpha]_D^{25} = +39$ (c 0.07, CHCl₃)

IR ν_{\max} (CHCl₃): 3439, 2972, 2855, 1644, 1455, 1377 y 1085 cm⁻¹

RMN ¹H y ¹³C (CDCl₃)



n° C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	J (Hz)
1	24.6	1.32	s	
2	77.8			
3	59.5	4.16	dd	2.0; 10.2
4	31.6	2.10		
		2.20		
5	40.1	1.60		
		1.76		
6	78.9			
7	76.0	3.53	dd	1.0; 10.3
8	28.4	1.43		
		1.83		
9	41.1	1.50		
		1.69		
10	78.0			
11	71.2	3.49	dd	5.1; 11.5
12	24.3	1.51		
		1.73		
13	26.8	1.84		
		2.04		
14	70.2	4.10	dd	5.5; 5.7
15	150.5			
16	29.8	2.23		
		2.44		
17	30.0	1.40		
		1.63		
18	76.1	3.50	dd	1.7; 9.9
19	86.1			
20	31.6	1.81		
		2.10		
21	26.6	1.57		
		1.86		
22	87.6	3.73	dd	5.8; 10.2
23	70.5			
24	24.0	1.11	s	
25	25.4	1.34	s	
26	20.6	1.10	s	
27	19.0	1.15	s	
28	109.8	4.86	bs	
		4.98	bs	
29	23.8	1.12	s	
30	27.7	1.20	s	
OH-18		2.35	s	

HRMS: 588.28241 (Calc. 588.28485, C₃₀H₅₁O₆ ⁸¹Br [M⁺])

MS a m/z: 588, 586, 571, 569, 529, 527, 445, 443, 291, 289

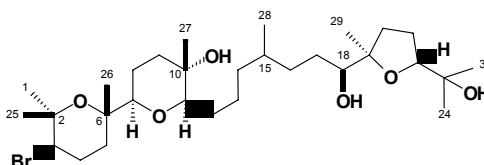
DATOS FÍSICOS DEL CLAVIDOL 69

Sólido amorfo de color blanquecino.

$[\alpha]_D^{25} = +1.1$ (c 0.18, CHCl₃)

IR ν_{\max} (CHCl₃): 2955, 2922, 2752, 1736 y 1654 cm⁻¹

RMN ¹H y ¹³C (CDCl₃)



nº C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	J (Hz)
1	31.6	1.23	s	
2	75.1			
3	59.2	3.83	dd	4.0; 12.3
4	28.3	2.08		
		2.22		
5	37.0	1.47		
		1.75		
6	74.9			
7	85.9	3.04	dd	2.5; 11.5
8	23.2	1.45		
		1.75		
9	38.7	1.57		
		1.77		
10	70.1			
11	75.5	3.95	dd	8.0; 9.8
12	20.0	1.36		
		1.88		
13	27.7	1.55		
		2.14		
14	28.9	1.25 (2H)		
15	38.7	1.35		
16	27.3	1.39		
		1.53		
17	27.0	1.20		
		1.54		
18	74.5	3.76	dd	2.2; 13.0
19	84.9			
20	32.8	1.50		
		2.11		
21	26.6	1.79 (2H)		
22	87.0	3.73	dd	6.0; 10.0
23	71.9			
24	24.3	1.10	s	
25	23.6	1.37	s	
26	20.1	1.17	s	
27	30.9	1.24	s	
28	16.9	0.82	d	6.4
29	24.3	1.10	s	
30	29.3	1.24	s	

HRMS: 592.316719 (Calc. 592.316155, C₃₀H₅₅O₆⁸¹Br [M⁺])
615.312607 (Calc. 615.305925, C₃₀H₅₅O₆⁸¹Br Na [M⁺+Na])

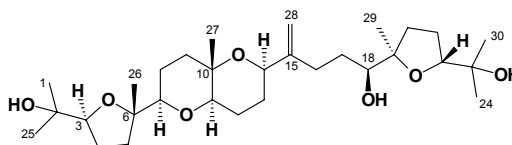
FAB (NBA) MS a m/z: 615, 613, 592, 590, 533, 531

DATOS FÍSICOS DEL PSEUDODEHIDROTIRSIFEROL 70

Sólido amorfo de color blanquecino.

$[\alpha]_D^{25} = -13.1$ (c 0.13, CHCl_3)

IR_{vmax} (CHCl_3): 3427, 2971, 2870, 1723, 1461, 1375 y 1217 cm^{-1}



$\text{RMN } ^1\text{H y } ^{13}\text{C}$ (CDCl_3)

n° C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	J (Hz)
1	24.0	1.11	s	
2	70.6			
3	86.7	3.76	dd	5.8; 9.1
4	26.3	1.84 (2H)		
5	35.2	1.66		
		2.04		
6	84.0			
7	84.0	3.32	dd	2.6; 11.4
8	24.5	1.51		
		1.66		
9	38.7	1.57		
		1.81		
10	72.8			
11	78.9	3.46	dd	5.6; 11.7
12	21.8	1.65		
		1.84		
13	26.4	1.85		
		2.08		
14	72.5	4.29	dd	4.2; 7.1
15	151.3			
16	29.7	2.20		
		2.46		
17	29.9	1.48		
		1.64		
18	76.2	3.53	dd	1.5; 10.8
19	86.1			
20	31.6	1.58		
		2.10		
21	26.5	1.83 (2H)		
22	87.6	3.76	dd	6.5; 9.8
23	70.4			
24	23.9	1.13	s	
25	27.5	1.19	s	
26	22.7	1.14	s	
27	19.4	1.25	s	
28	109.9	4.89	bs	
		5.05	bs	
29	23.7	1.14	s	
30	27.7	1.21	s	
OH-18		2.38	s	

HRMS: 524.37107 (Calc. 524.37130, $\text{C}_{30}\text{H}_{52}\text{O}_7$ [M^+])

MS a m/z: 524, 506, 488, 470, 447, 429, 403, 381, 363

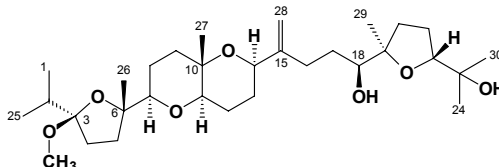
DATOS FÍSICOS DEL 3-METOXI-PSEUDODEHIDROTIRSIFEROL 71

Sólido amorfo de color blanquecino.

$[\alpha]_D^{25} = +3.6$ (c 0.03, CHCl_3)

IR_{Vmax} (CHCl_3): 3400, 2960, 2926, 2854, 1731, 1671 y 1461 cm^{-1}

$\text{RMN } ^1\text{H y } ^{13}\text{C}$ (CDCl_3)



n° C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	J (Hz)
1	17.8	0.88	d	6.9
2	29.5	2.20		
3	112.8			
4	34.4	1.65		
		2.20		
5	32.6	1.80		
		2.07		
6	84.9			
7	79.0	3.50	d	10.0
8	24.7	1.57		
		1.65		
9	38.9	1.58		
		1.83		
10	72.8			
11	78.6	3.45	dd	5.4; 11.4
12	21.7	1.64		
		1.84		
13	26.3	1.84		
		2.09		
14	72.6	4.29	dd	3.9; 7.6
15	151.3			
16	29.9	2.18		
		2.46		
17	30.1	1.46		
		1.64		
18	76.5	3.53	dd	1.5; 9.5
19	86.1			
20	31.7	1.58		
		2.10		
21	26.6	1.85 (2H)		
22	87.6	3.76	dd	6.0; 10.0
23	70.5			
24	24.0	1.13	s	
25	17.8	0.92	d	6.8
26	23.8	1.24	s	
27	19.6	1.25	s	
28	109.9	4.88	bs	
		5.05	bs	
29	23.8	1.14	s	
30	27.7	1.21	s	
$\text{CH}_3\text{O}-$	47.2	3.19	s	

HRMS: $[\text{M}^+]$ no observado

506.361053 (Calc. 506.360740, $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_6$ $[\text{M}^+ - \text{CH}_3\text{O}]$)

488.355728 (Calc. 488.350175, $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_5$ $[\text{M}^+ - \text{CH}_3\text{O} - \text{H}_2\text{O}]$)

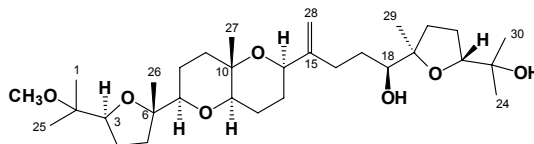
MS a m/z : 506, 488, 470, 363, 319, 143

DATOS FÍSICOS DEL 2-METOXI-PSEUDODEHIDROTIRSIFEROL 72

Sólido amorfo de color blanquecino.

$[\alpha]_D^{25} = +44.7$ (c 0.07, CHCl₃)

IR ν_{\max} (CHCl₃): 3434, 2926, 1461, 1376 y 1095 cm⁻¹



RMN ¹H y ¹³C (CDCl₃)

n° C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	J (Hz)
1	20.9	1.09	s	
2	76.6			
3	84.9	3.91	dd	6.1; 8.8
4	27.5	1.70		
5	31.7	1.85 1.58 2.10		
6	84.2			
7	83.9	3.36	dd	2.7; 11.5
8	24.7	1.48 1.66 1.80		
9	38.8	1.56 1.80		
10	72.8			
11	78.7	3.46	dd	5.5; 11.3
12	21.9	1.63 1.84 1.85 2.09		
13	26.3	1.85 2.09		
14	72.6	4.28	dd	3.4; 7.1
15	151.3			
16	29.7	2.18 2.46		
17	30.0	1.46 1.65 1.85		
18	76.2	3.52	dd	1.2; 10.3
19	86.1			
20	34.4	1.59 2.05		
21	26.6	1.85 (2H)		
22	87.6	3.76	dd	6.0; 10.0
23	70.4			
24	24.0	1.12	s	
25	20.9	1.14	s	
26	22.8	1.15	s	
27	19.5	1.25	s	
28	109.9	4.88 5.05	bs bs	
29	23.8	1.13	s	
30	21.7	1.21	s	
CH ₃ O-	49.8	3.25	s	
OH-18		2.38	s	

HRMS: M⁺ no observado

506.358086 (Calc. 506.360740, C₃₀H₅₀O₆ [M⁺-CH₃O])

488.352097 (Calc. 488.350175, C₃₀H₄₈H₅ [M⁺-CH₃O-H₂O])

447.312706 (Calc. 447.311050, C₂₇H₄₃O₅ [M⁺-CH₃O-C₃H₇O])

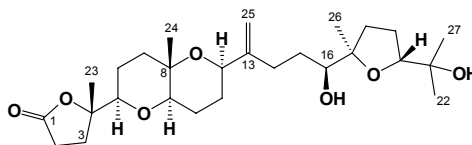
MS a m/z: 506, 488, 470, 447, 429, 363, 143

DATOS FÍSICOS DEL LACTODEHIDROTIRSIFEROL 73

Sólido amorfo de color blanquecino.

$[\alpha]_D^{25} = +4.3$ (c 0.21, CHCl₃)

IR ν_{\max} (CHCl₃): 2924, 2852, 2776, 2712, 1771, 1457 y 1376 cm⁻¹



RMN ¹H y ¹³C (CDCl₃)

n° C	δ ¹³ C	δ ¹ H	Multiplicidad	J (Hz)
1	[3]	177.4		
2	[4]	29.7		
3	[5]	29.1		
			1.75	
4	[6]	87.1		
			2.46	
5	[7]	82.7	dd	1.7; 11.8
6	[8]	24.3		
7	[9]	1.67		
			1.63	
8	[10]	1.87		
			1.87	
9	[11]	72.2	dd	5.6; 11.7
10	[12]	78.8		
11	[13]	21.6		
			1.60	
12	[14]	26.2		
			1.88	
13	[15]	18.5		
			1.85	
14	[16]	20.6		
			2.06	
15	[17]	4.28		
			4.28	
16	[18]	72.7	dd	1.5; 11.7
17	[19]	151.1		
18	[20]	29.3		
			2.18	
19	[21]	2.47		
			2.47	
20	[22]	29.8		
			1.50	
21	[23]	1.65		
			1.65	
22	[24]	76.2	dd	1.5; 11.7
			3.53	
23	[26]	86.1		
			1.60	
24	[27]	31.6		
			2.13	
25	[28]	26.6	dd	6.6; 10.6
			1.87 (2H)	
26	[29]	87.7		
			3.76	
27	[30]	70.5	dd	6.6; 10.6
			1.13	
28	[31]	24.0	s	
			1.13	
29	[32]	23.3	s	
			1.34	
30	[33]	19.5	s	
			1.26	
31	[34]	110.0	bs	
			4.89	
32	[35]	5.05	bs	
			5.05	
33	[36]	23.8	s	
			1.14	
34	[37]	27.7	s	
			1.22	

HRMS: 503.299731 (Calc. 503.298474, C₂₇H₄₄O₇ Na [M⁺+Na])
481.317825 (Calc. 481.316529, C₂₇H₄₅O₇ [MH⁺])

FAB (NBA) MS a m/z: 503, 481, 479, 463

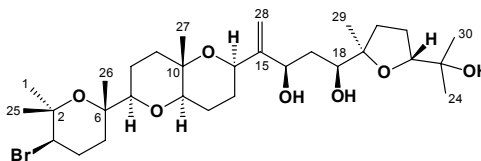
DATOS FÍSICOS DEL 16-*EPI*-HIDROXIDEHIDROTIRSIFEROL 74

Sólido amorfo de color blanquecino.

$[\alpha]_D^{25} = +12$ (c 0.07, CHCl₃)

IR ν_{\max} (CHCl₃): 3417, 2928, 1644, 1455, 1377 y 1096 cm⁻¹

RMN ¹H y ¹³C (CDCl₃)



n° C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	J (Hz)
1	31.0	1.26	s	
2	75.0			
3	59.0	3.89	dd	4.1; 12.3
4	28.2	2.11		
		2.24		
5	37.1	1.54		
		1.83		
6	74.4			
7	86.8	3.08	dd	1.6; 10.6
8	22.9	1.47		
		1.74		
9	38.6	1.51		
		1.75		
10	73.5			
11	79.3	3.38	dd	5.6; 11.5
12	21.7	1.65		
		1.76		
13	25.9	1.93		
		2.18		
14	70.8	4.35	dd	5.5; 5.7
15	152.9			
16	70.3	4.70	ddd	1.6; 6.3; 10.0
17	35.9	1.73	ddd	1.6; 1.6; 12.0
		1.86	ddd	10.0; 10.0; 12.0
18	73.8	3.77	dd	1.6; 10.0
19	85.6			
20	31.9	1.58		
		2.13		
21	26.5	1.84		
		2.07		
22	87.6	3.74	dd	6.0; 9.9
23	70.4			
24	24.0	1.12	s	
25	23.6	1.39	s	
26	20.1	1.19	s	
27	19.1	1.24	s	
28	110.4	5.17	bs	
		5.30	bs	
29	23.5	1.12	s	
30	27.7	1.20	s	
OH-16		3.30	d	6.3
OH-18		2.66	s	

HRMS: 604.27967 (Calc. 604.27976, C₃₀H₅₁O₆ ⁸¹Br [M⁺])

MS a m/z: 604, 602, 568, 566, 529, 527, 469, 451

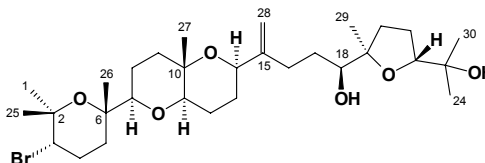
DATOS FÍSICOS DEL 3-EPI-DEHIDROTIRSIFEROL 75

Sólido amorfo de color blanquecino.

$[\alpha]_D^{25} = +3.85$ (c 0.18, CHCl_3)

IR ν_{max} (CHCl_3): 3438, 2978, 1644, 1455, 1374 y 1320 cm^{-1}

RMN ^1H y ^{13}C (CDCl_3)



n° C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	J (Hz)
1	27.9	1.31	s	
2	74.4			
3	59.4	4.09	dd	3.3; 7.6
4	26.5	2.12		
		2.20		
5	30.8	1.52		
		2.12		
6	73.2			
7	82.9	3.43	dd	1.8; 10.8
8	22.7	1.56		
		1.79		
9	38.2	1.55		
		1.80		
10	73.0			
11	78.8	3.46	dd	5.9; 10.0
12	21.3	1.62		
		1.83		
13	26.1	1.84		
		2.08		
14	72.0	4.27	dd	4.2; 7.6
15	150.8			
16	29.1	2.19		
		2.45		
17	29.4	1.46		
		1.63		
18	75.8	3.51	dd	1.5; 10.6
19	86.3			
20	31.2	1.56		
		2.12		
21	26.0	1.85 (2H)		
22	87.0	3.74	dd	5.7; 10.2
23	70.7			
24	23.2	1.11	s	
25	28.9	1.33	s	
26	19.9	1.12	s	
27	19.1	1.22	s	
28	109.4	4.86	bs	
		5.03	bs	
29	22.5	1.12	s	
30	27.2	1.20	s	

HRMS: 588.286931 (Calc. 588.284851, $\text{C}_{30}\text{H}_{51}\text{O}_6$ ^{81}Br [M^+])

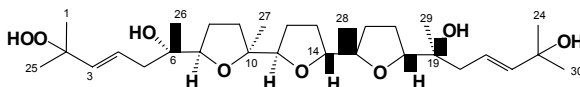
FAB (NBA) MS a m/z : 611, 609, 529, 329, 279, 176, 143

DATOS FÍSICOS DEL PERÓXIDO DE LONGILENO 76

Sólido amorfo de color blanquecino.

$[\alpha]_D^{25} = +46.6$ (c 0.31, CHCl_3)

IR_{vmax} (CHCl_3): 3360, 2969, 2926, 1732, 1455, 1373, 1077 y 755 cm^{-1}



$\text{RMN } ^1\text{H y } ^{13}\text{C}$ (CDCl_3)

n° C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	J (Hz)
1	26.9	1.19	s	
2	80.1			
3	137.0	5.43	d	15.6
4	125.8	5.81	ddd	6.6; 8.5; 15.6
5	41.3	1.78	dd	8.5; 13.3
		2.20	dd	6.6; 13.3
6	73.9			
7	85.1	3.72		
8	25.8	1.89		
		2.06		
9	29.7	1.49		
		2.06		
10	85.8			
11	85.8	4.09		
12	30.1	1.50		
		2.01		
13	29.9	1.50		
		2.01		
14	85.4	4.09		
15	85.4			
16	29.3	1.46		
		2.03		
17	25.2	1.89		
		2.03		
18	84.1	3.72		
19	73.8			
20	40.8	1.88	dd	6.8; 13.4
		2.20	dd	7.0; 13.4
21	122.2	5.75	ddd	6.8; 7.0; 15.6
22	141.2	5.61	d	15.6
23	70.0			
24	29.4	1.27	s	
25	24.2	1.37	s	
26	24.3	1.20	s	
27	24.2	1.09	s	
28	23.6	1.07	s	
29	24.3	1.27	s	
30	29.6	1.31	s	
-OOH		10.57	s	
OH-6		5.24	s	
OH-19		5.03	s	
OH-23		3.29	s	

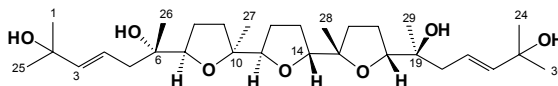
HRMS: 563.357155 (Calc. 563.355989, $\text{C}_{30}\text{H}_{52}\text{O}_8 \text{ Na}$ [$\text{M}^+ + \text{Na}$])

DATOS FÍSICOS DEL LONGILENO 77

Sólido amorfo de color blanquecino.

$[\alpha]_D^{25} = 0.0$ (c 0.13, CHCl_3)

IR ν_{max} (CHCl_3): 3365, 2971, 2929, 2872, 1455, 1373, 1085, 755 cm^{-1}



RMN ^1H y ^{13}C (CDCl_3)

n° C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	J (Hz)	
1	24	29.6	1.29	s	
2	23	70.4			
3	22	141.2	5.62	d	15.6
4	21	122.0	5.77	ddd	7.0; 7.4; 15.6
5	20	40.4	1.78	dd	7.0; 13.4
			2.15	dd	7.4; 13.4
6	19	74.0			
7	18	84.9	3.70	dd	6.4; 6.6
8	17	25.6	1.91		
			2.03		
9	16	30.0	1.47		
			2.06		
10	15	85.7			
11	14	85.4	4.11	dd	5.5; 5.6
12	13	30.0	1.49		
			2.01		
25	30	29.8	1.31	s	
26	29	24.1	1.24	s	
27	28	23.7	1.10	s	
OH-6	OH-19		4.83	s	

HRMS: 524.371553 (Calc. 524.371304, $\text{C}_{30}\text{H}_{52}\text{O}_7$ [M^+])

V.4. ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE PP2A

V.4.1. Preparación de las disoluciones de las muestras de poliéteres

Las disoluciones de los metabolitos a ensayar fueron preparadas, según el caso, partiendo de una disolución “stock” 10 mM en DMSO (compuestos [13](#), [16](#), [68](#), [70](#), [71](#), [72](#) y [76](#)) o en CHCl₃:MeOH (1:1) (compuestos [3](#), [15](#), [17](#), [19](#), [20](#), [69](#), [73](#) y [74](#)), y por dilución con el tampón de ensayo (50 mM Tris-HCl, 0.1 mM CaCl₂, pH 7.0) hasta obtener un rango de concentraciones de 1 μM a 250 μM. La concentración del disolvente orgánico en la mezcla de reacción fue <10% (v/v).

V.4.2. Ensayo de inhibición de fosfatasa

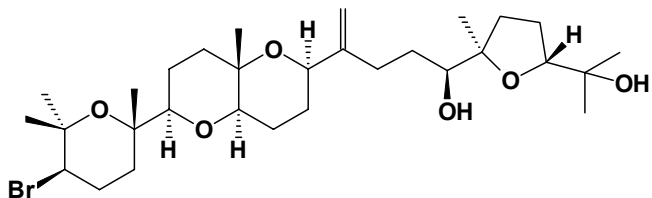
Los ensayos enzimáticos fueron realizados en placas de 96 pocillos. En cada pocillo se añadió primeramente 5 μL de NiCl₂ (40 mM), 5 μL de suero de albúmina bovina (BSA, 5 mg/mL), 40 μL de tampón de ensayo (50 mM Tris-HCl, 0.1 mM CaCl₂, pH 7.0), y por último 20 μL de la muestra de PP2A diluida en Tris-HCl pH 7 (0.025 unidades/pocillo) preparada justo antes de la adición. Las muestras *blanco* se prepararon de forma equivalente pero en lugar del enzima y la disolución de la muestra a evaluar se colocó 30 μL de Tris-HCl pH 7, mientras que en los pocillos *control*, esta última se sustituyó por 10 μL del mismo tampón (Esquema 22). La mezcla de reacción fue incubada durante 10 minutos a 37°C con agitación y entonces se le añadió 10 μL de muestra problema a cada pocillo, exceptuando evidentemente tanto a los pocillos *blanco* como a los *control*. Cada determinación se realizó por triplicado y cada muestra se ensayó al menos en cuatro concentraciones distintas. Después de otros 10 minutos de incubación en condiciones equivalentes a la anterior, se le adicionó el substrato fluorogénico en un volumen de 120 μL para que en el volumen final de 200 μL, la concentración de FDP fuese 15 μL (Esquema 22). A continuación se incubó a

37°C y a los 30 minutos se midió la fluorescencia con un fluorómetro lector de microplacas a 430-560 nm.

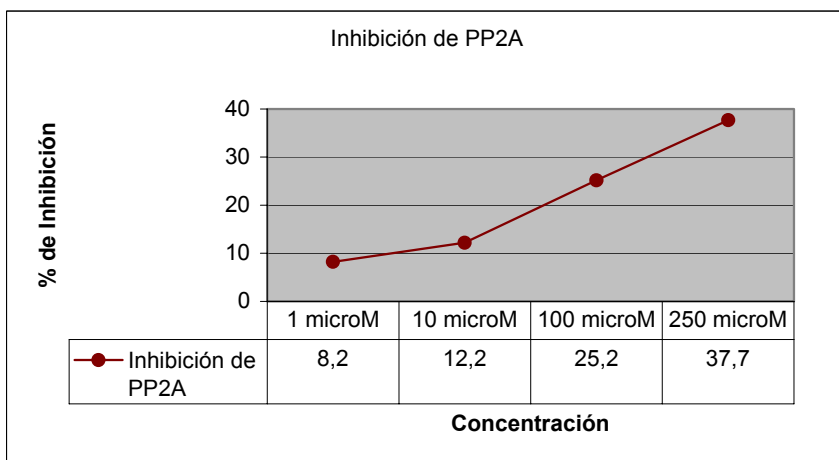
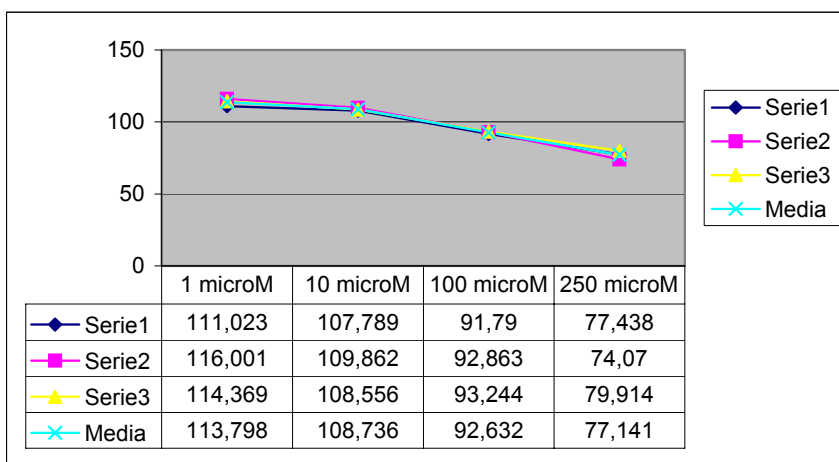
Reactivos	Volumen por pocillo (μL)		
	Control	Pocillos-Muestra	Blanco
NiCl ₂	5	5	5
BSA	5	5	5
Tampón pH 7	50	40	70
PP2A	20	20	
	<i>Incubación a 37°C durante 10 minutos</i>		
Muestra	10		
	<i>Incubación a 37°C durante 10 minutos</i>		
Substrato F	120	120	120
	<i>Incubación a 37°C durante 30 minutos → Lectura de datos</i>		

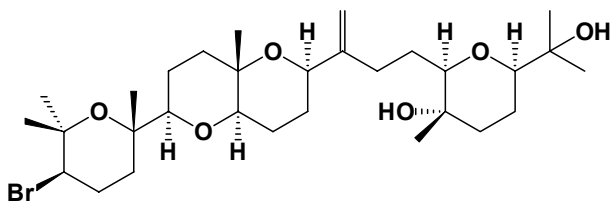
Esquema 22.- Esquema de adición e incubación.

Los valores de inhibición de PP2A resultantes para cada compuesto ensayado se representan a continuación.

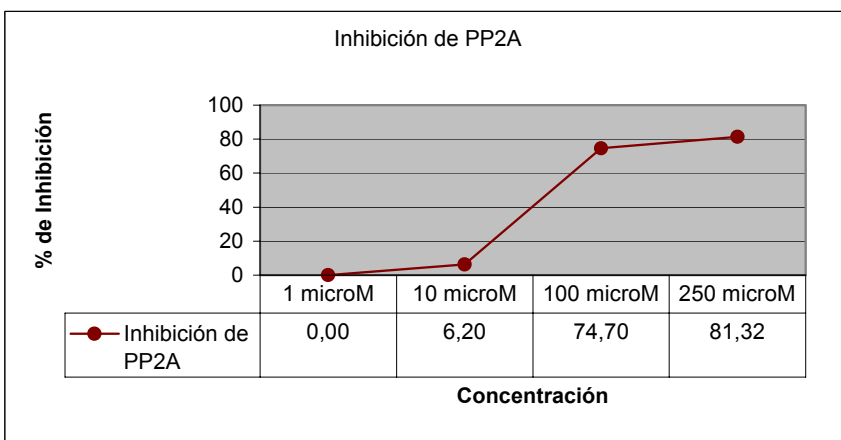
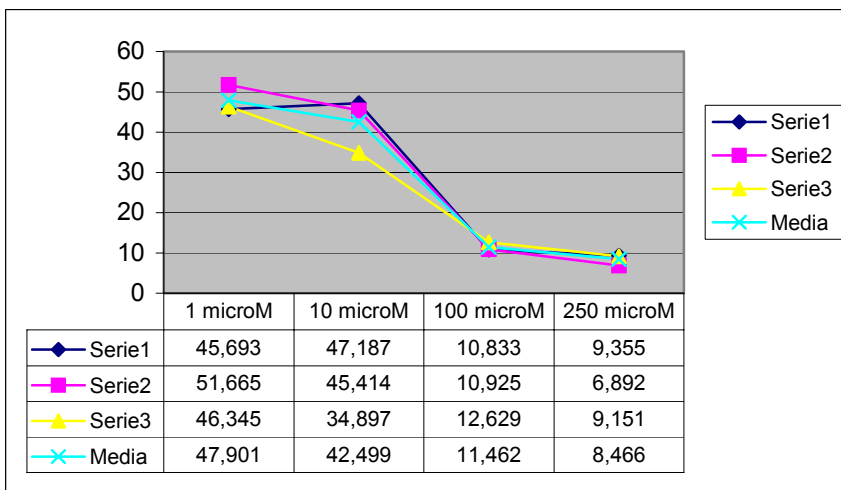


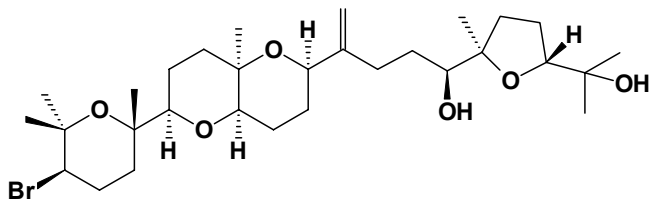
3 Dehidrotirsiferol



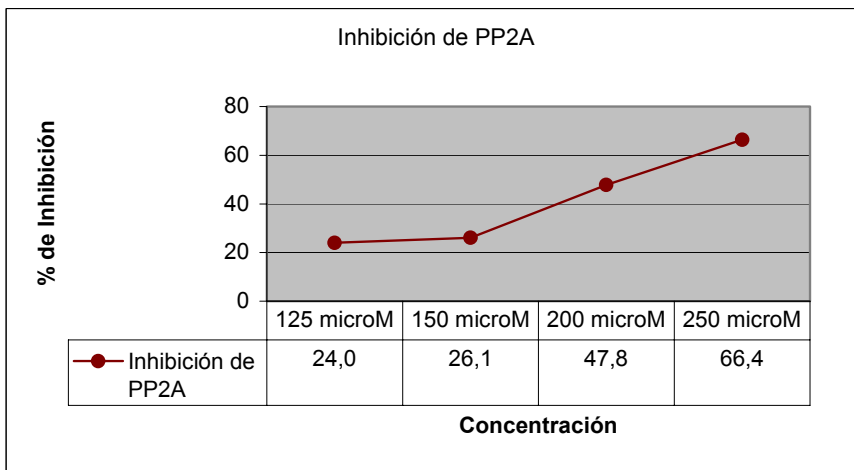
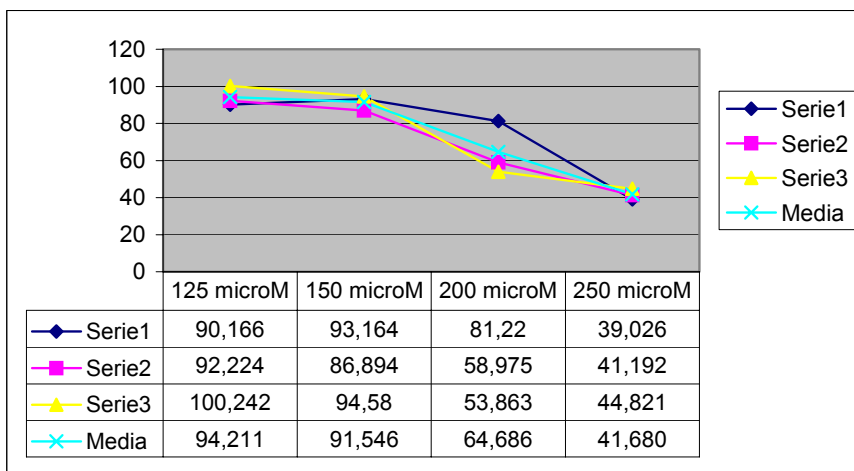


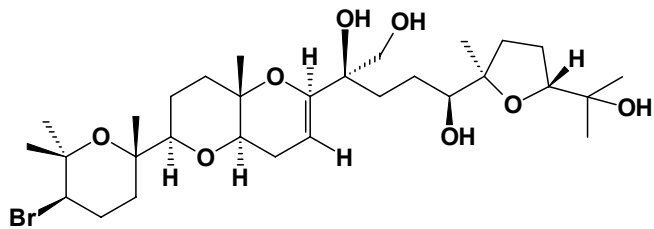
13 Isodehidrotirsiferol



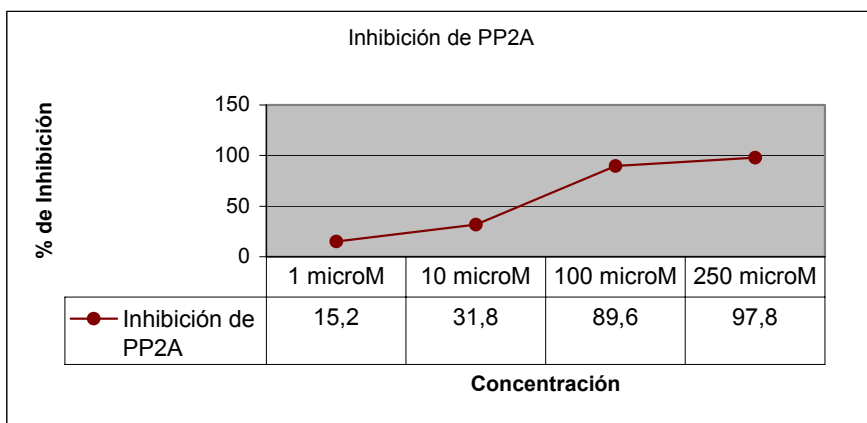
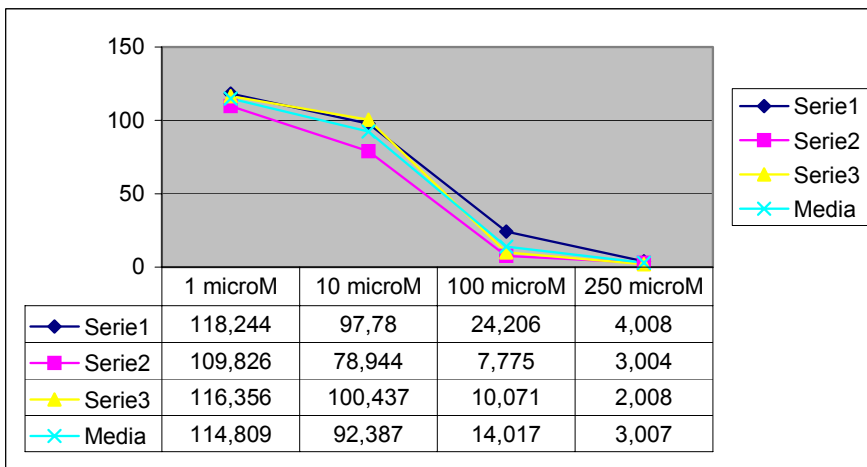


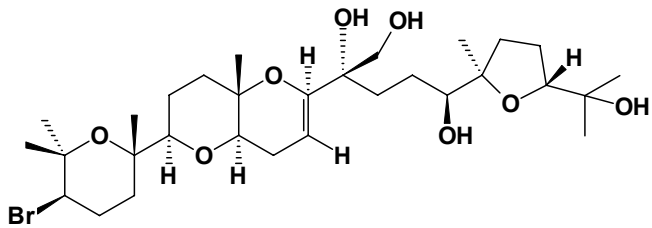
14 10-*epi*-Dehidrotirsiferol



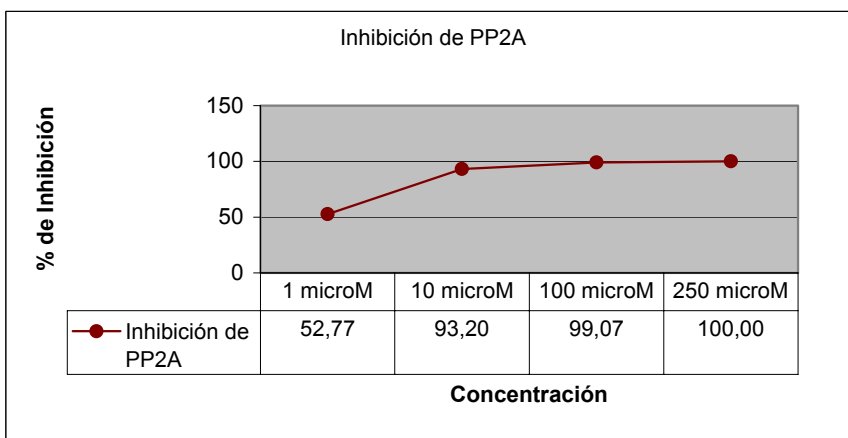
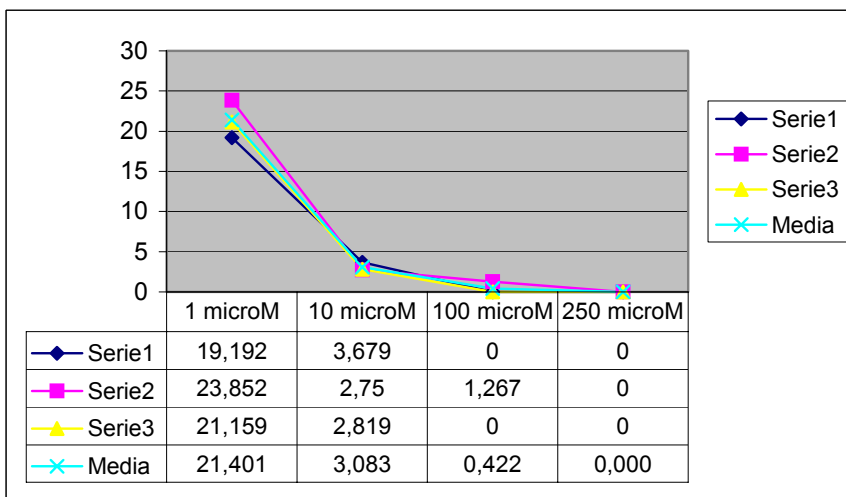


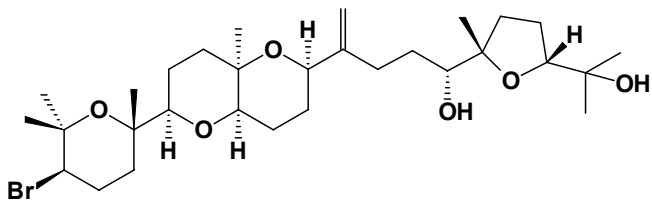
15 Tirsenol A



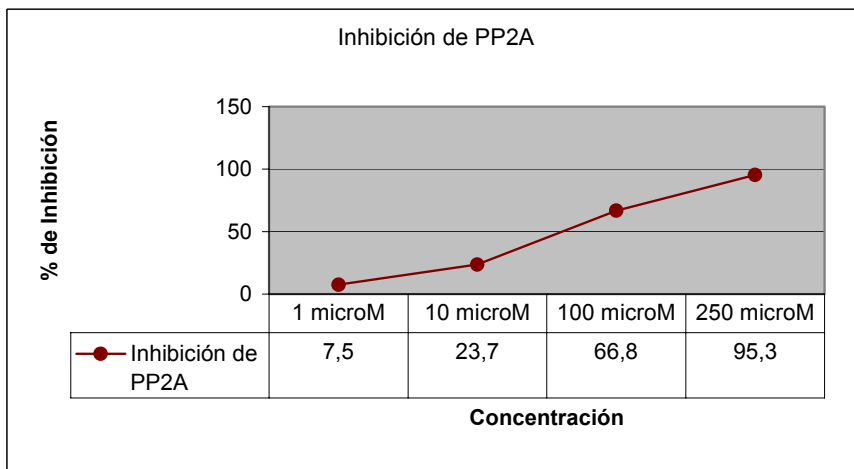
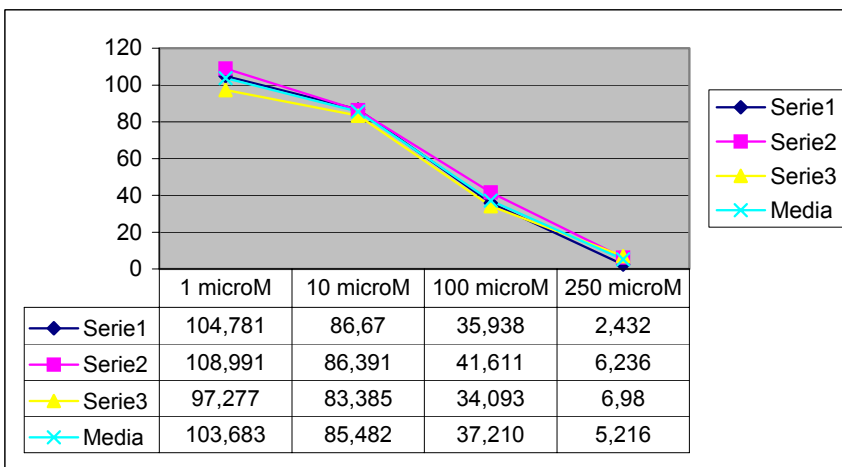


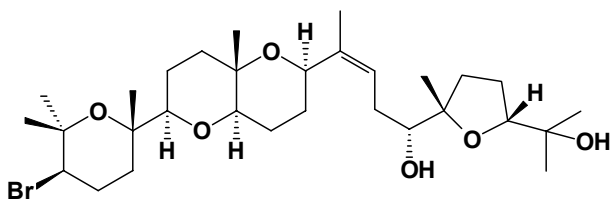
16 Tirsenol B



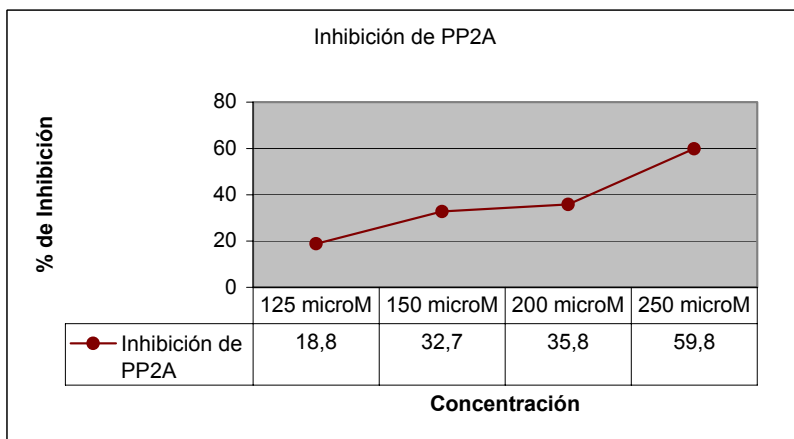
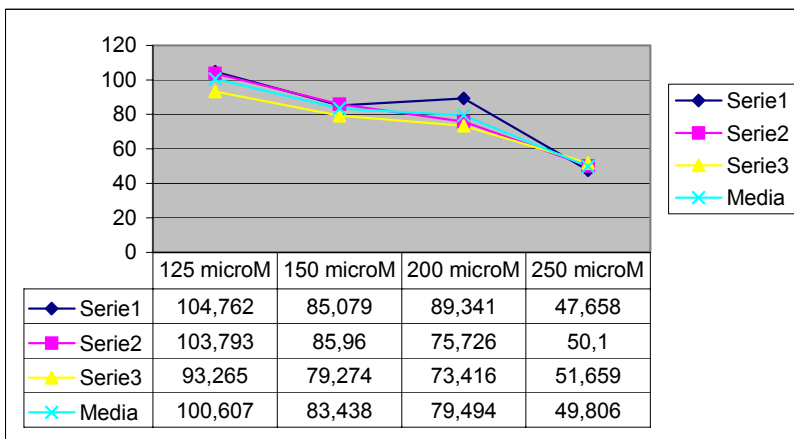


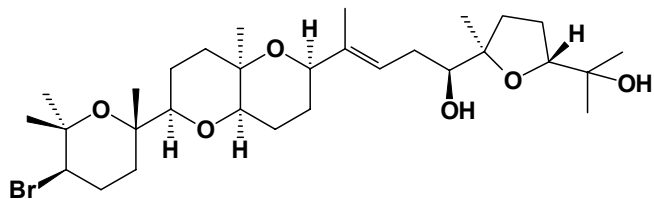
17 Dehidrovenustatriol



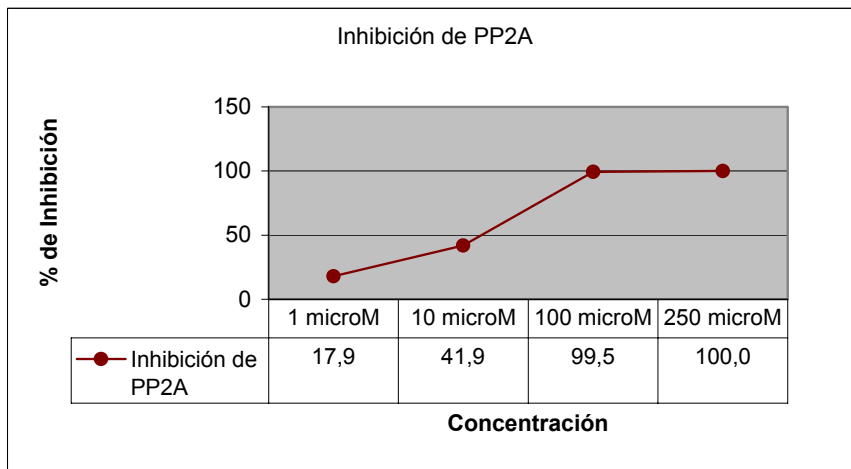
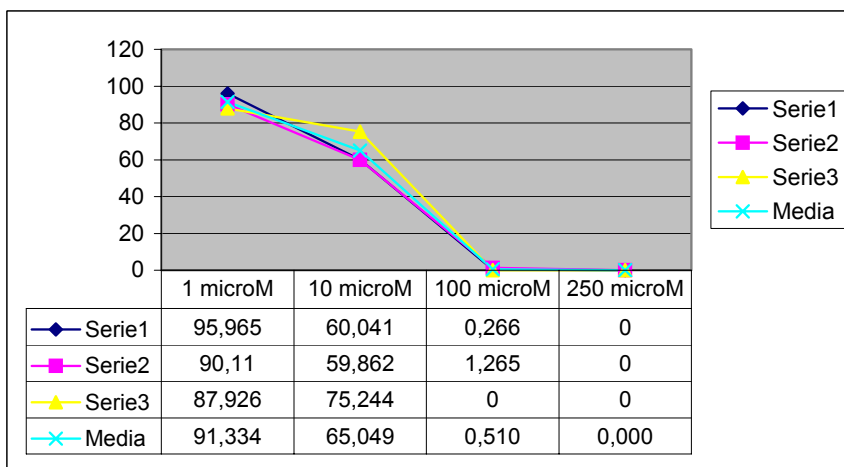


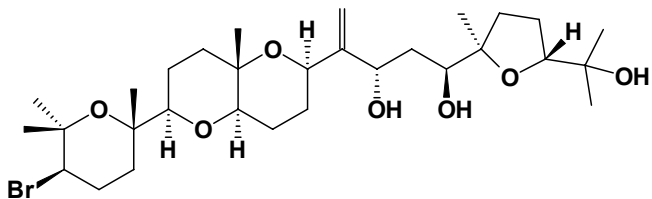
18 15,16-Dehidrovenustatriol



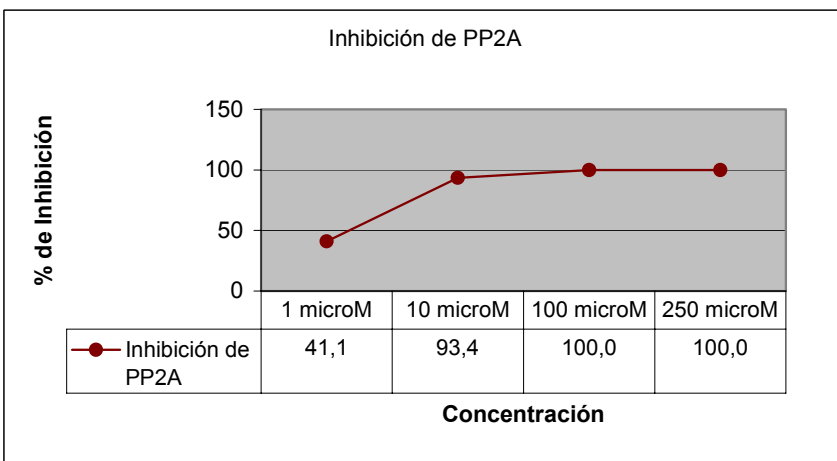
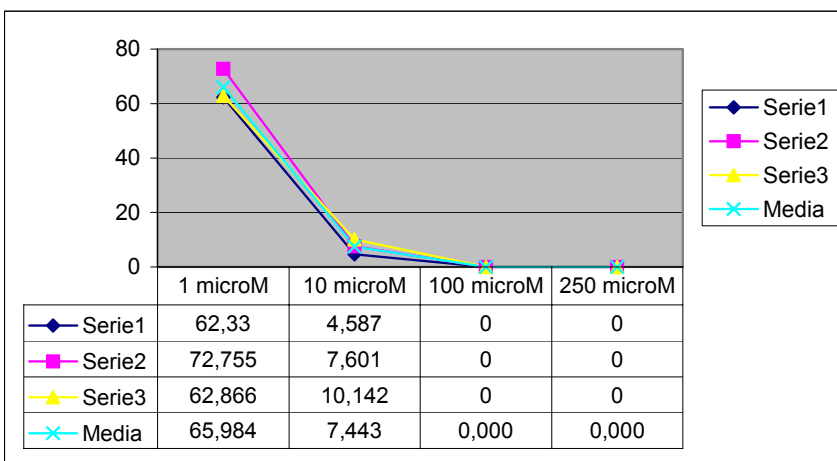


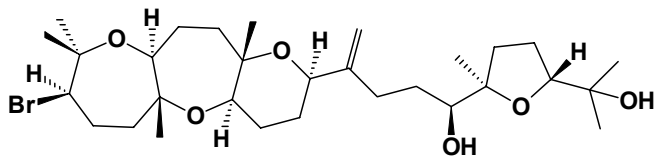
19 10-*epi*-15,16-Dehidrotirsiferol



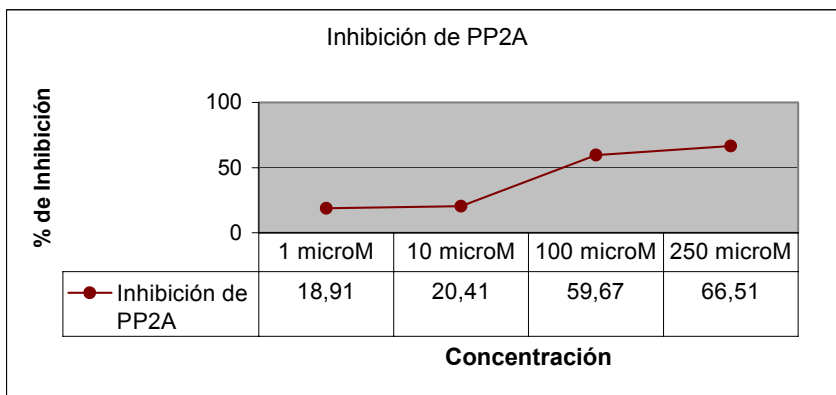
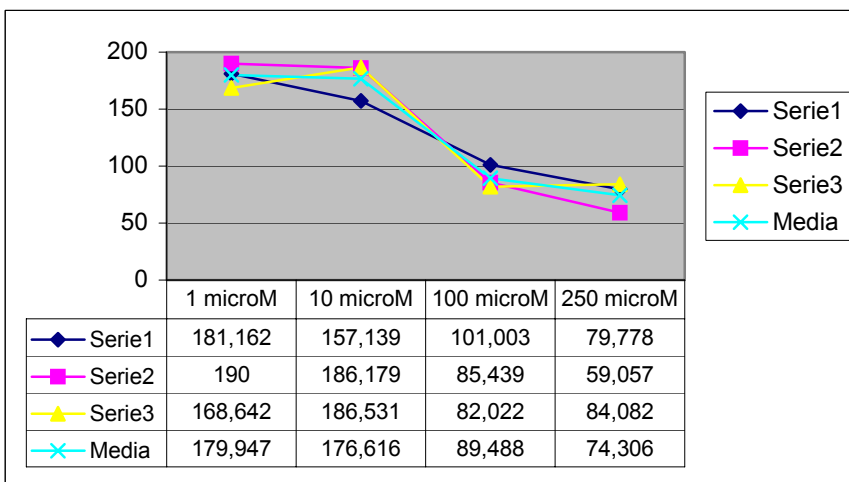


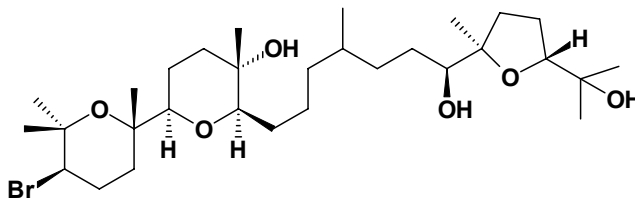
20 16-Hidrosidehidrotirsiferol



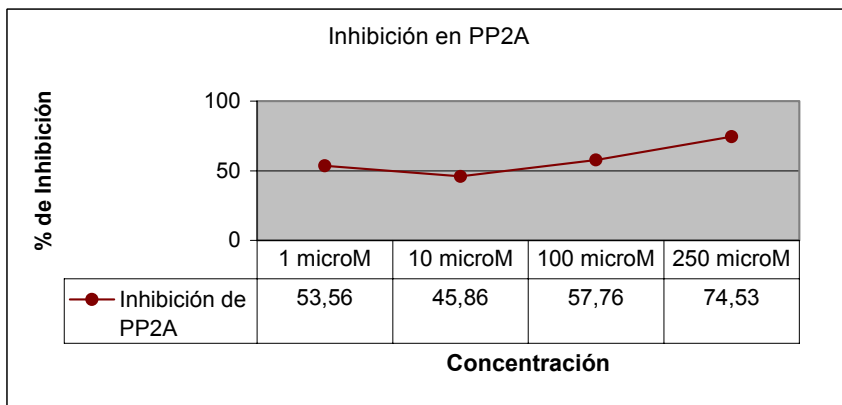
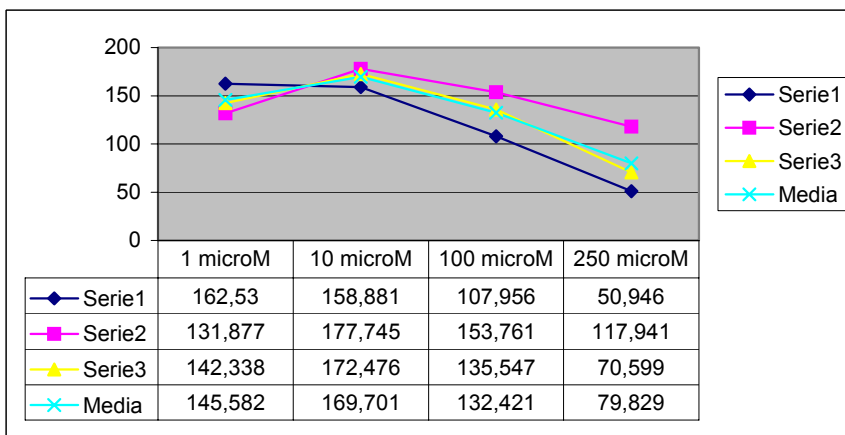


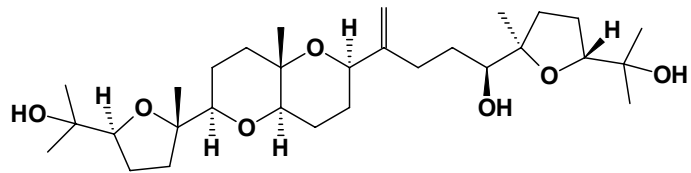
68 Dioxepandehidrotirsiferol



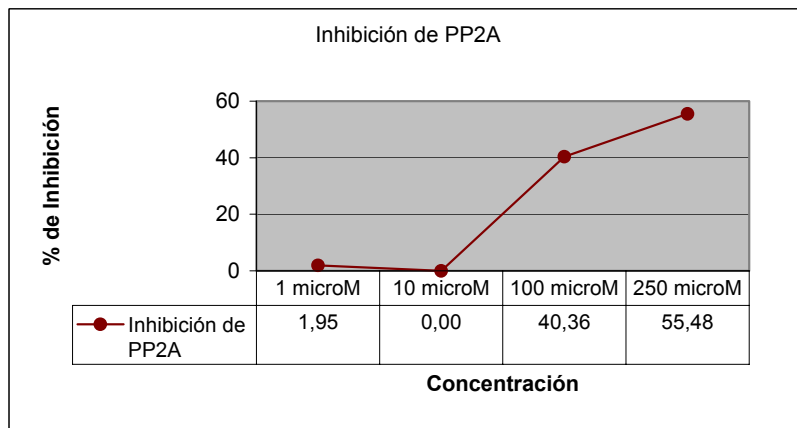
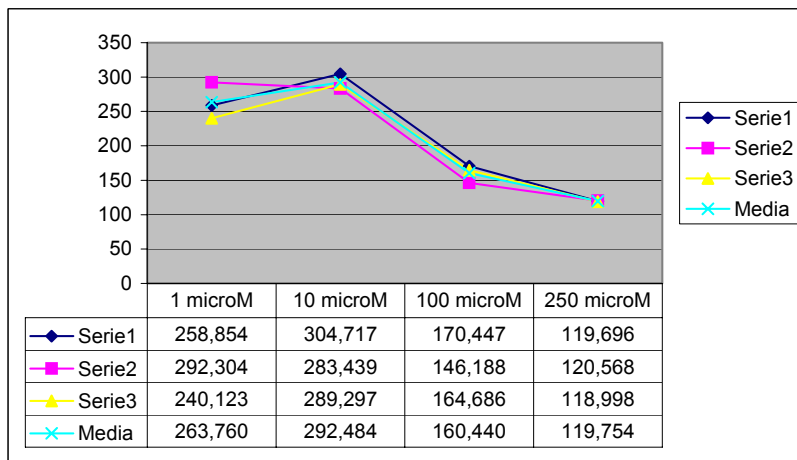


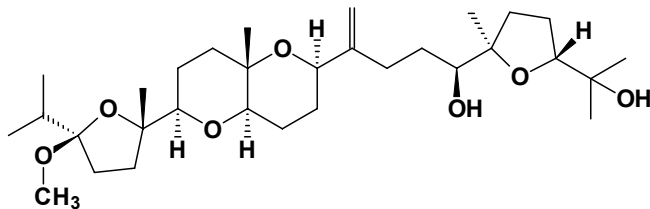
69 Clavido



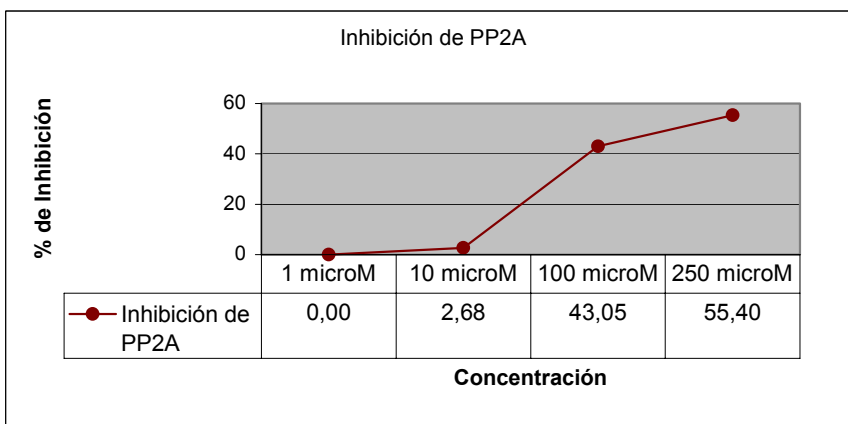
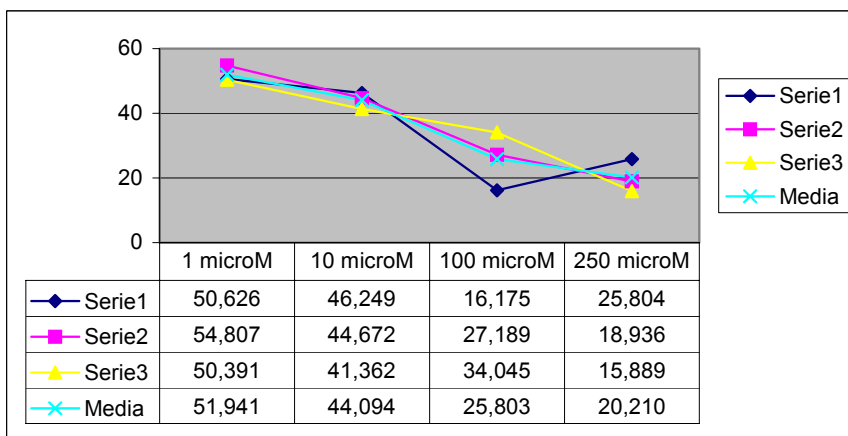


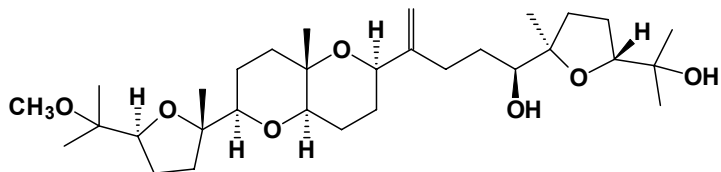
70 Pseudodehidrotirsiferol



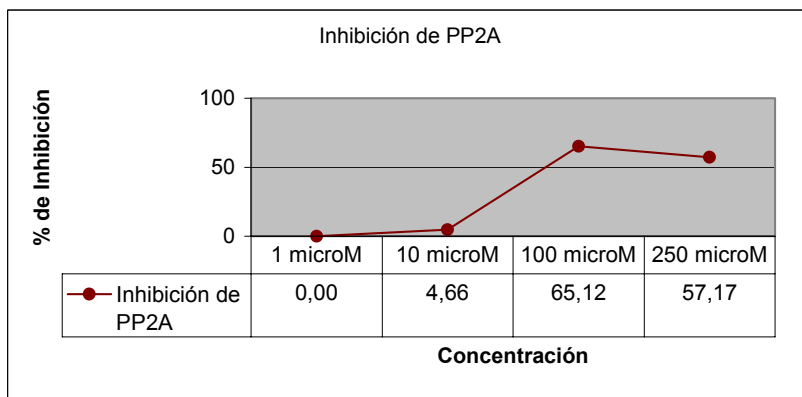
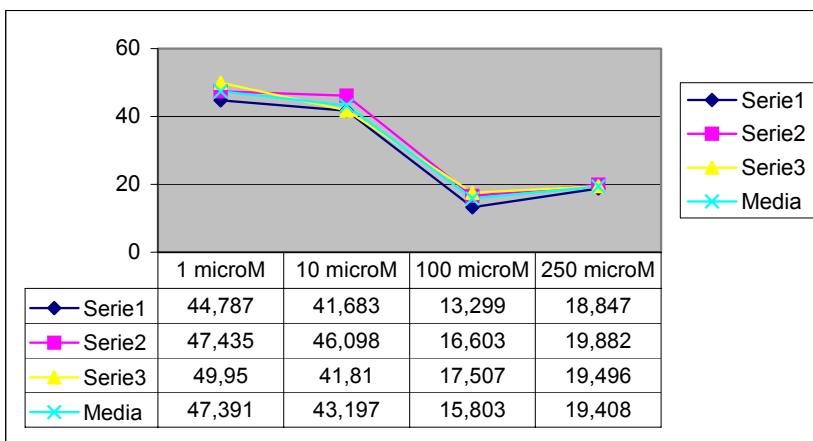


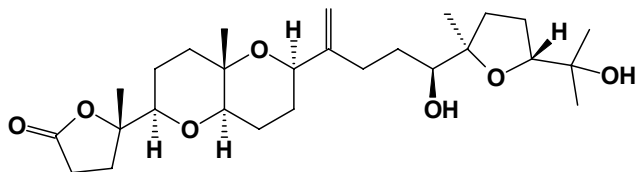
71 3-Metoxi-pseudodehidrotirsiferol



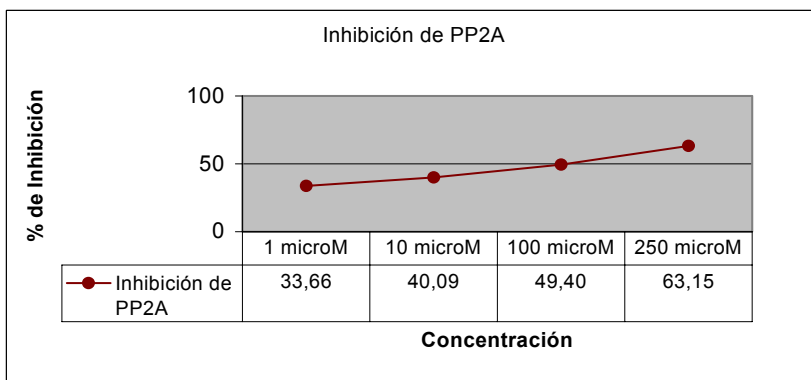
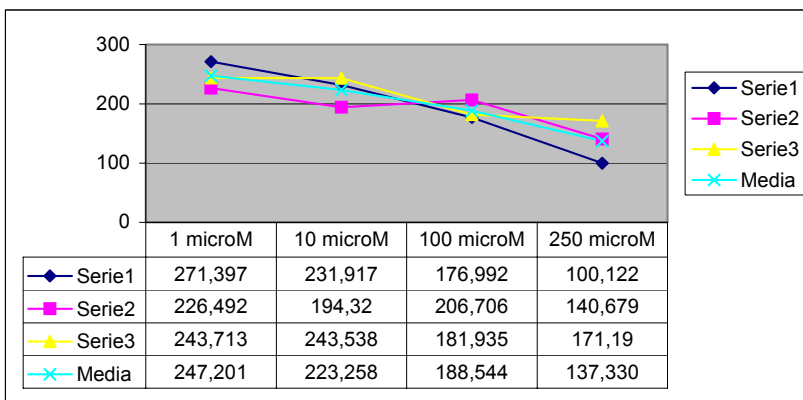


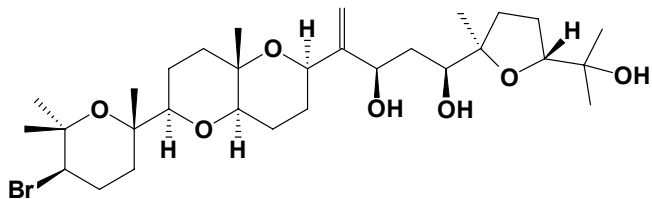
72 2-Metoxi-pseudodehidrotirsiferol



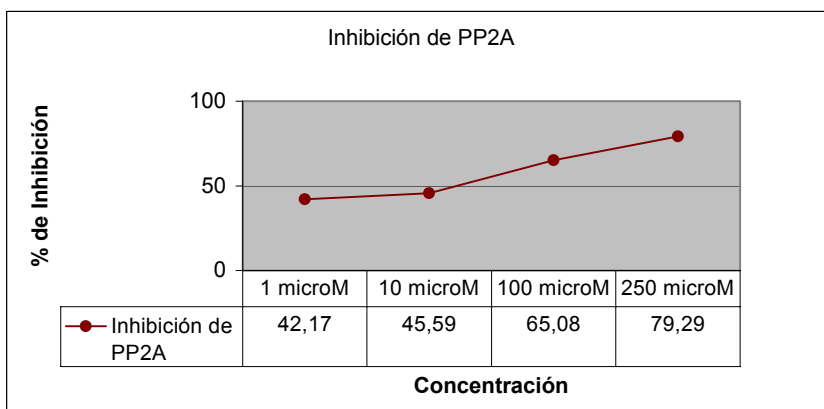
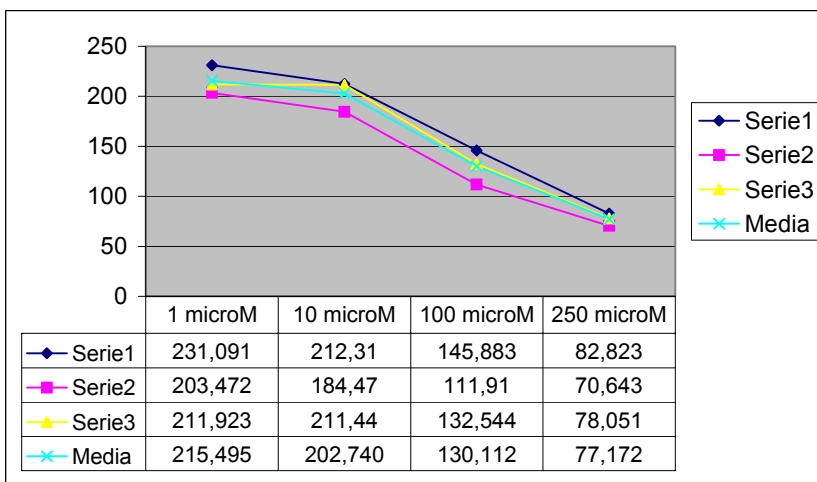


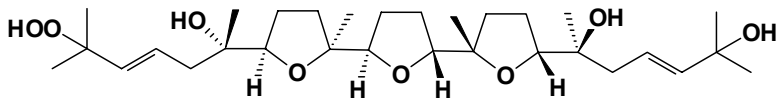
73 Lactodehidrotirsiferol



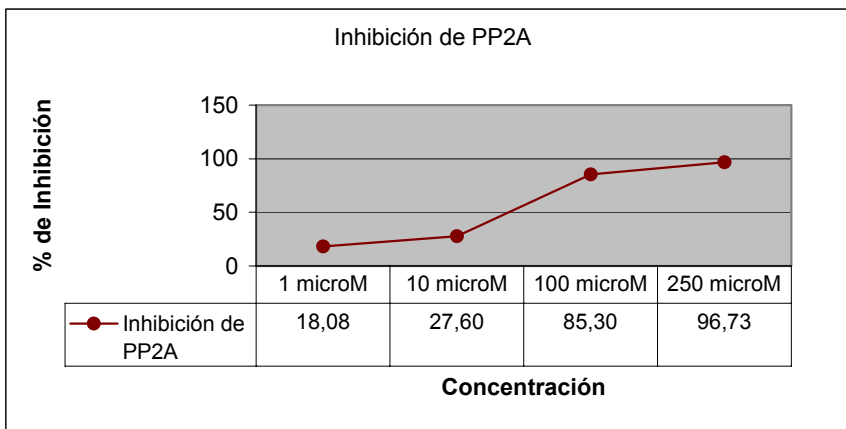
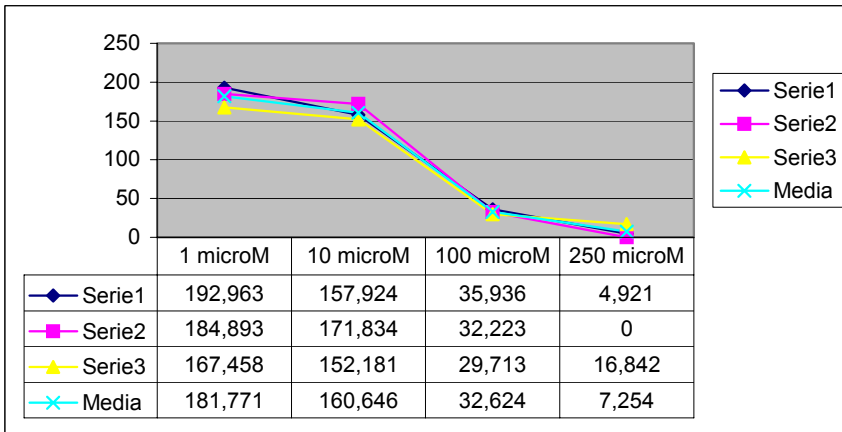


74 16-*epi*-Hidroxiidehidrotirsiferol





76 Peróxido de longileno



V.5. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA

V.5.1. Cultivos celulares

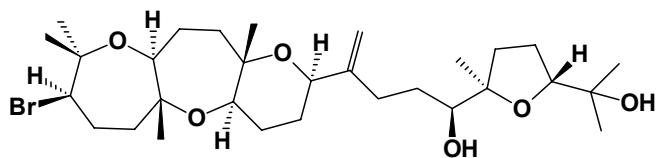
Los ensayos de inhibición de crecimiento de varios de los poliéteres aislados de *Laurencia* se realizaron sobre cultivos *in vitro* de células epidermoides humanas de tipo KB-3-1.

V.5.2. Ensayo de proliferación celular

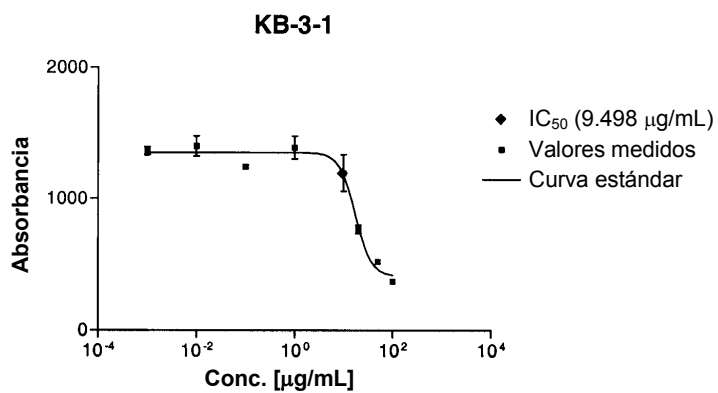
Los ensayos se realizaron utilizando el método de sal de tetrazolium XTT (Roche®) siguiendo las instrucciones del fabricante y consiste en la metabolización de esta sustancia de color amarillo a formazan de color naranja por el metabolismo de las células en estudio. Este compuesto de metabolización es cuantificado directamente mediante el uso de técnicas espectrofotométricas. La medición de absorbancia se realizó en un lector ELISA Spectra SLT Rainbow a una longitud de onda de 490 nm/ref. 630 nm. Las determinaciones se realizaron por triplicado. Los efectos moduladores directos de los metabolitos sobre las enzimas mitocondriales responsables de reducir la tintura del XTT se excluyó por comparación de los valores de absorbancia de células tratadas y no tratadas después de una hora de incubación. Los controles con los vehículos usados para las disoluciones a las concentraciones experimentales revelaron la ausencia de efectos secundarios.

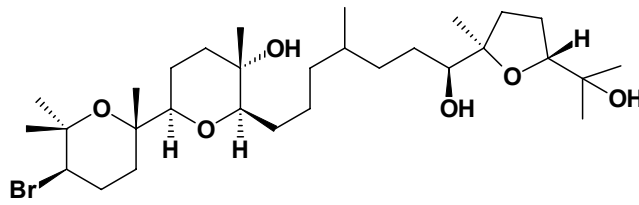
V.5.3. Inhibición del crecimiento celular

Las curvas estándar fueron calculadas estadísticamente por regresión no lineal de los datos medidos a diferentes concentraciones. Las concentraciones de IC₅₀ se derivaron de las curvas de dosis-respuestas a la que se produce la inhibición del 50% del crecimiento celular y se muestran a continuación:

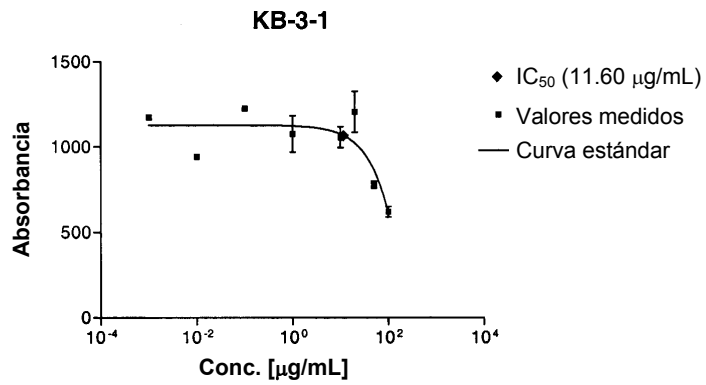


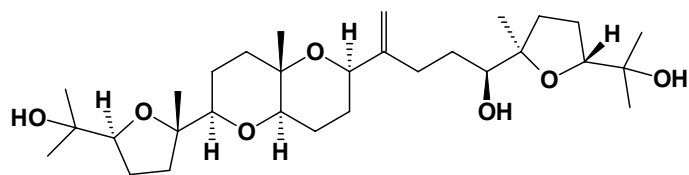
68 Dioxepandehidrotirsiferol



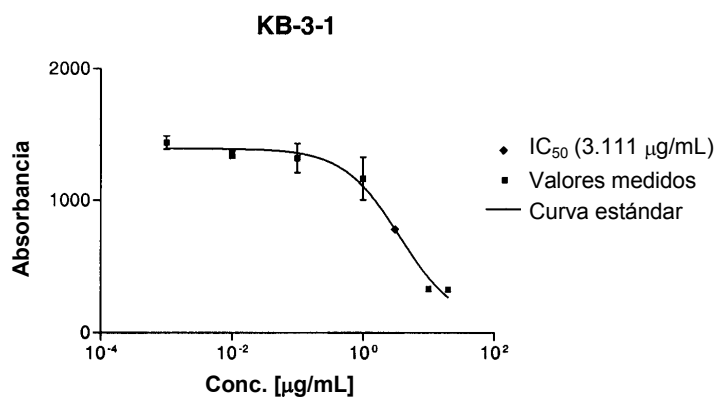


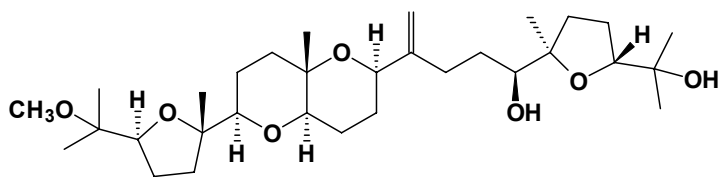
69 Clavido



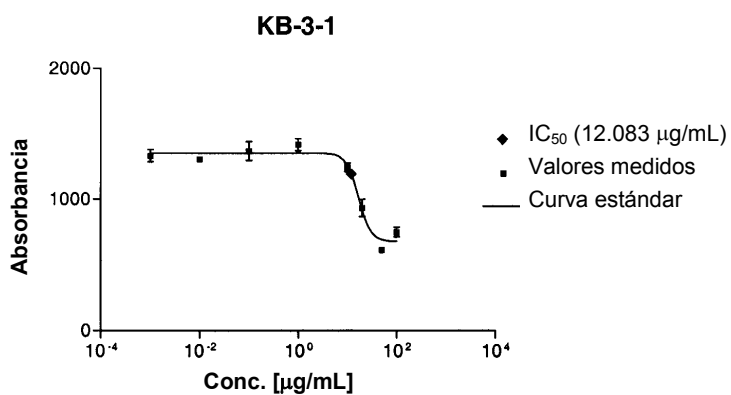


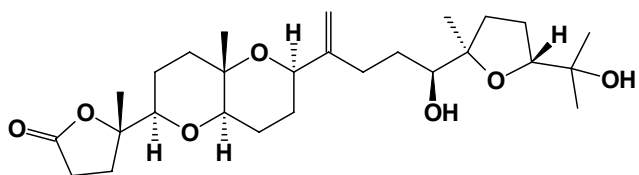
70 Pseudodehidrotirsiferol



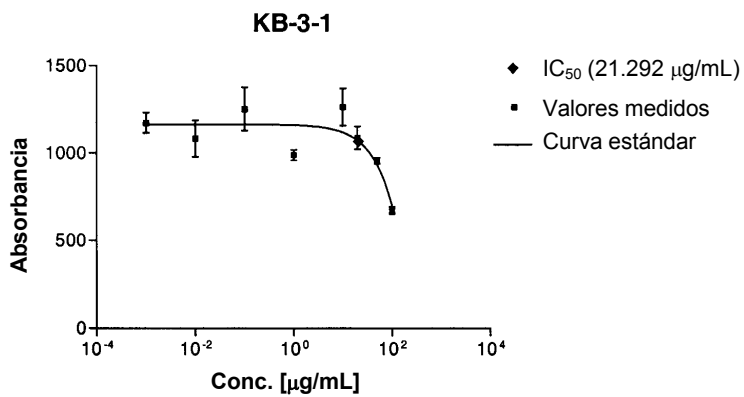


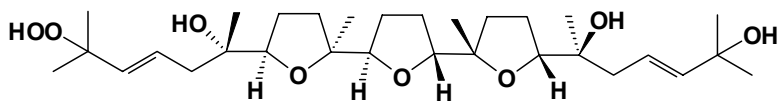
72 2-Metoxi-pseudodehidrotirsiferol



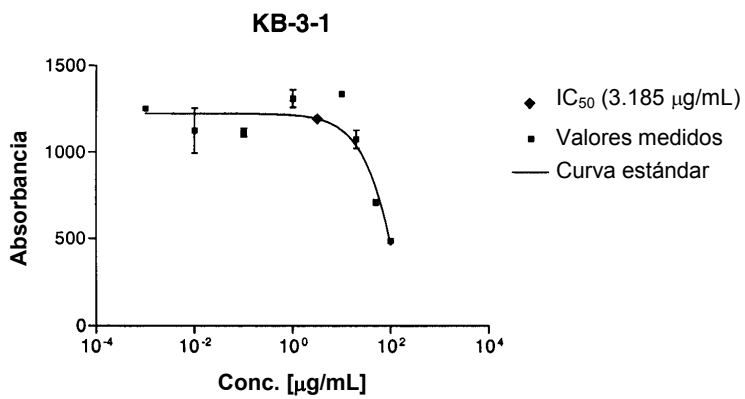


73 Lactodehidrotirsiferol





76 Peróxido de longileno



CONCLUSIONES

Se estudia el alga roja *Laurencia viridis*, recolectada en el Paraíso floral (Tenerife). De dicho estudio cromatográfico se aíslan e identifican nuevos poliéteres derivados del escualeno, cuyas estructuras fueron determinadas mediante estudios espectroscópicos. Estos metabolitos presentan importantes variaciones estructurales respecto de los triterpénicos aislados previamente tanto de este alga como de otras fuentes marinas, los cuales fueron denominados martiriol 67, dioxepandehidrotirsiferol 68, clavidol 69, pseudodehidrotirsiferol 70, 3-metoxi-pseudodehidrotirsiferol 71, 2-metoxi-pseudodehidrotirsiferol 72, lactodehidrotirsiferol 73, 16-*epi*-hidroxidehidrotirsiferol 74, 3-*epi*-dehidrotirsiferol 75, peróxido de longileno 76 y longileno 77.

En el martiriol 67 destaca la presencia de un inusual sistema enol-éter en el anillo B en los carbonos C-7-C-8, además de un cuarto sistema de anillo D formado por un enlace éter entre los carbonos cuaternarios C-15 y C-19. En el compuesto 68 dioxepandehidrotirsiferol, encontramos un agrupamiento de tres éteres cíclicos fusionados (anillos A, B, C), fragmentos observados sólo en las toxinas de origen marino tales como brevetoxinas, hemibrevetoxinas y ciguatoxinas. El tercer metabolito, el clavidol 69, destaca por la ausencia del anillo C y la presencia única de sistemas de anillos aislados. El pseudodehidrotirsiferol 70, el 3-metoxi-pseudodehidrotirsiferol 71 y el 2-metoxi-pseudodehidrotirsiferol 72 presentaron como modificación la sustitución del anillo tetrahidropirano A por un sistema de anillo tetrahidrofuránico formado por un puente éter entre los carbonos C-3 y C-6, con la consiguiente pérdida del átomo de bromo presente en todos los metabolitos que habían sido aislados hasta el momento. El lactodehidrotirsiferol 73 es el único de los metabolitos con menos de 30 átomos de carbono. El anillo A está formado por un sistema de γ -lactona producto de una fragmentación oxidativa del escualeno precursor. Los compuestos 16-*epi*-Hidroxidehidrotirsiferol 74 y 3-*epi*-Dehidrotirsiferol 75

resultaron ser unos nuevos isómeros del 16-hidroxi-dehidrotirsiferol **20** y del dehidrotirsiferol **3**, aislados y publicados anteriormente en nuestro laboratorio.

De la fracción más polar del extracto de *Laurencia viridis* se identifican dos sustancias estructuralmente relacionadas, el peróxido de longileno **76** y longileno **77**, destacando el elemento de simetría del compuesto **77**. El enantiómero del peróxido de longileno **76** había sido descrito de fuente terrestre.

La propuesta clásica mantenida hasta el momento para la formación de poliéteres triterpénicos derivados del escualeno supone un proceso de ciclación concertada. A la vista de los resultados obtenidos y de los metabolitos aislados que se recogen en la presente memoria parece más lógico que los precursores biogénicos evolucionen mediante ciclaciones que transcurren de forma secuencial. Así, se realizan propuestas de rutas de formación para los poliéteres cuyos nuevos esqueletos son los más significativos de los descritos en el Capítulo II.

Debido a la importancia que representan los procesos de fosforilación-desfosforilación que sufren las proteínas en el control de los procesos intracelulares, y los estudios realizados anteriormente con el 23-acetato de tirsiferilo **4**, una molécula con una elevada selectividad frente a proteína fosfatasa de tipo 2A, decidimos evaluar la capacidad de inhibición de esta serie de compuestos frente a este enzima. Los resultados son bastante alentadores puesto que todos los poliéteres aislados presentan actividad inhibitoria frente a PP2A. Del estudio de relación estructura-actividad realizado con este grupo de compuestos podemos concluir que las sustancias con mayor actividad son aquellas en las que se encuentra la presencia de un grupo hidroxilo en los carbonos C-15 o C-16.

Finalmente se evalúa la actividad citotóxica del dioxepandehidrotirsiferol **68**, clavídol **69**, pseudohidrotirsiferol **70**, 2-metoxi-pseudohidrotirsiferol **72**, lactohidrotirsiferol **73** y peróxido de longileno **76** frente a células KB-3-1 (células

epidermoides humanas) siendo lo más activos el pseudodehidrotirsiferol **70** y el peróxido de longileno **76**, con un IC₅₀ de 3.11 y 3.81 µg/mL, respectivamente.