

Curso 2009/10
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS/6
I.S.B.N.: 978-84-7756-936-7

H. GABRIEL GARCÍA LLANOS

**Aislamiento, modificación estructural
y evaluación biológica de metabolitos
secundarios de *Withania aristata* (Solanaceae),
endemismo canario**

Directores

**ISABEL LÓPEZ BAZZOCCHI
IGNACIO ANTONIO JIMÉNEZ DÍAZ**



SOPORTES AUDIOVISUALES E INFORMÁTICOS
Serie Tesis Doctorales

Esta tesis ha sido realizada bajo la dirección de los Doctores Doña Isabel López Bazzocchi y Don Ignacio Antonio Jiménez Díaz, a quienes expreso mi más profundo agradecimiento por su invalorable ayuda y amistad.

Agradecimientos

En la realización de esta Tesis Doctoral han contribuido un gran número de personas, sin las cuales no se hubiera podido llevar a cabo, a todas ellas quisiera agradecerles y dedicarles las siguientes palabras:

En primer lugar quisiera agradecer a mis directores, Isabel y Antonio, por haberme acogido en su grupo de investigación, por su amistad y haberme apoyado en todo momento depositando su confianza en mí desde el primer día, enseñándome y haciendo que estos años hayan sido tan extraordinarios e inolvidables.

Al Dr. Don José Gavin Sazatornil, por su inestimable colaboración en la realización de espectros de Resonancia Magnética Nuclear, por el “placer” que supone compartir habitación en algunos viajes y vivir el fútbol desde otra orbita, espero ver algún día un Tenerife-Huesca en primera división.

A la Dra. Doña Laila Moujir del Departamento de Microbiología y Biología de la Universidad de La Laguna, por la inestimable ayuda en la realización de las actividades antimicrobiana y citotóxica, así como por la paciencia mostrada frente a un “ignorante” de la microbiología mientras realicé trabajos en su laboratorio.

Al Dr. Carlos Jiménez, por su ayuda y el amable acogimiento recibido durante mi estancia en La Facultad de Química Fundamental de la Universidad de La Coruña. Así como a todos los compañeros de laboratorio Miriam, Maribel, Alba, María y Raquel por su ayuda en el laboratorio y por la amistad brindada desde el primer momento. Hago extensivo mi agradecimiento a los doctores Ricardo, Sestelo, Monse y a la doctoranda Cristina por su amistad y momentos compartidos.

Al Dr. Francisco Macias y a su grupo, del departamento de Química Orgánica, Universidad de Cádiz, por la realización de la actividad alelopática.

Al profesor Alfonso Ruíz Bravo, del departamento de Microbiología en la Universidad de Granada por su inestimable ayuda en la evaluación de la actividad inmunomoduladora.

Al Gobierno de Canarias por la beca concedida, sin la cual no hubiese podido llevar a cabo este trabajo de investigación.

Al laboratorio 14 del IUBO-AG al que pertenezco:

Con los que comencé:

A Ninoska (la mujer 100 pipers), por ser una de las personas más especiales para mí, por apoyarme desde que llegué y por su cariño permanente, por tu efusivo saludo a las nueve de la mañana cuando todos aun teníamos legañas en los ojos “¡¡¡holaaa, buen díaaa, que taaaal!!”, Niños algún día Bolivia volverá a tener mar.

A Nayeli (el huracán de Yucatán), por donde pasaba no crecía la hierba, jejeje, una de las personas más alegres que he conocido y con la que he compartido grandes momentos, eres una de las cosas más grandes que me llevo de estos últimos 5 años.

A Marvin (Nube Negra) mi hermano salvatracho, por sus consejos, amistad y compartir tantas vivencias juntos, como cuando casi matamos al chele de un infarto en Guatemala.

A Nuria (Furia), sin tí, este laboratorio no funcionaría, eres el motor que mueve el rotavapor, furia, gracias por todo amiga.

A David (Cavalito), jamás una palabra se repitió tanto en tan poco tiempo, cavalito, jejeje, gracias por los momentos vividos, por trabajar espalda con espalda en el exilio del labo 14.

A Carolina, Cristina y Sonia y Chana por los momentos compartidos en el laboratorio.

A el Gabo (Choclito), mi compañero de guerra, por corroborar conmigo que la música no amansa las fieras, y si es peruana las traslada a un estado de locura y excitación.

A Antonio (el doc), por su apoyo y por contagiarme con su entusiasmo en el laboratorio, pero sobre todo por tu amistad, eres una de las mejores personas que he conocido, cuando quieras yo hablo de ciencia contigo, jejeje.

A Isabel (la jefita), por su carácter “guerrero”, tanto en el laboratorio como en los viajes a El Salvador y Bolivia, por su amistad y por hacer que me enamorara de los productos naturales.

Los que están ahora:

A Alex (Zambrota), por ser el lateral derecho mas duro del Salvador, echaré de menos los partidos de los jueves, jejeje, suerte con todo.

A Alejandro (Chilito), el hombre que sangraba por las orejas, por enseñarme que hay pueblos en Chile con nombres raros, “Tal Tal”, devuélvele el mar a Bolivia, je.

A Juan Carlos (el Boli), por enseñarme como se protegió el pirata cuando iba a perder el ojo, por ser como eres, por ser un filosofo del siglo XXI, para mi un gran amigo, una excelente persona.

A Oliver (Tin Tin), el alemán que no es alemán, que habla con acento italiano y baila salsa, por traer un poco de alegría al laboratorio, por no callarse ni debajo del agua, gracias por todo amigo.

A Liliana (la Carajita), por compartir conmigo el mundo de las withanolidas y realizar las actividades antimicrobiana y citotóxica, al fin se acabó el envío de los productos, jeje, ánimo que ya queda menos.

A Sandra (Ratones), por darle un toque femenino de vez en cuando al laboratorio del exilio lleno de hombres, por enseñarme porqué Merck hace material de laboratorio de plástico.

A Lolo, por compartir su amor por la naturaleza y por el Teide con nosotros, je, tú también estas viendo la luz al final del túnel, ánimo que ya nos llega la hora.

A Leti, por su ayuda en la recolección de las plantas, así como por su inestimable amistad.

Los de paso:

A los bolivianos, Efraín (el enamorado) y Alberto Giménez, por los momentos vividos tanto en La Laguna como en La Paz, donde el avión sube para aterrizar, así como por la evaluación de la actividad antimalárica.

A la mara salvadoreña, More, Ana Miriam y Marvin Chávez, por compartir el clima tropical de La Laguna todos los inviernos con nosotros, tranquilos que con lo del cambio climático algún día se cumplirá, Canarias 20°C.

A los colombianos, Sara (la tractomula), por enseñarme un poco de cultura colombiana y lo mal que huele los extractos de valeriana, a Javier (el amansa machos), por los momentos vividos en su estancia en La Laguna.

A los peruanos, Alfredo Tupayachi y Carlos Alberto Serrano (Lomito), por hacernos partícipes de su amor por la flora peruana, así como por las anécdotas que nos dejaron en el laboratorio.

A María Luisa Kenedy (la maquina Paraguaya de hacer hombres) y su "pequeña familia", je, por todos los momentos que hemos compartido en estos últimos meses.

A los que pusieron su apoyo moral:

A los del laboratorio 5, a Rubén (el Flaco), un hombre con un gran fallo, ser del Madrid, que te vaya todo muy bien por México y espero que cumplas lo que te pedí, engordar, dejarte bigote y aprender a cantar rancheras, suerte amigo; a Romen (Sifredi), con el que he compartido muchas y agradables vivencias, por enseñarme que no hay una cerveza sin otra y que la última no existe; a Juan Ignacio, por su amistad durante todo este tiempo y por los 5 ml de diclorometano seco que me dejaba de vez en cuando; a Tomi, ¡¡¡yo te lo limpio Toni!!!, je, una chuletada sin ti no es lo mismo; a Celina, Nico, Martín (Bob Marley no ha muerto, se reencarna en este argentino), Julio (a ver si sube el Cádiz), Nuria, Dácil y Pedro.

A los del laboratorio 4, a Juan Carlos (el Alpaca), por los momentos compartidos tanto en el piso como en el laboratorio; a Nabil (Naguil), por tu alegría constante y su velocidad endiablada jugando a fútbol; a Ángel Ravelo, Ana Estévez, Rafa Zarate, Elisa, Dulce, Fátima, Elena, Sandra Jiménez, Sandra Oramas y Amesti, con los que compartí laboratorio en mis comienzos.

Al laboratorio 15, Antonio Palenzuela, María de Mar, José Luis y Carmen María, por acogerme en su laboratorio como uno más. Gracias por todo.

A los Corrales, en especial a Paco, por su alegría constante y ser la mano que nos daba de desayunar todas las mañanas, por las partidas de bochas y las celebraciones de tesis.

El personal de seguridad del IUBO-AG, en especial a Lolo y Ezequiel, por su amistad y por intentar convencerme de que no trabajara algún sábado que otro con frases tan convincentes como: "tu no tienes familia o tráete la cama".

A todo el personal técnico del Instituto Universitario de Bio-Organica "Antonio González", Olmedo (por los infrarrojos y su amistad), Zuppo (RMN), Sergio (por los masas de los productos sólidos, no en disolución), Gregorio (Gregory, hay que ponerle unos alerones al carro de los disolventes para que tenga mejor paso por curva), Pastora, Angel, Antonio, Mateo, Nicolás (por su carácter alegre), Eva, Pili, Ani y del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, a Juan Antonio por poner el maravilloso electrospray en mi vida y a todas las personas que no he nombrado que contribuyeron de alguna manera en la realización de este trabajo.

A mi familia y amigos:

A mi padre, por todo su esfuerzo, por su cariño, por su apoyo en todo momento. Gracias por enseñarme que hay que amar todo lo que uno hace en todo momento y que hay que trabajar muy duro para lograr lo que se quiere, gracias por ser el mejor ejemplo de superación que he tenido en mi vida.

A mi madre, gracias por darme y enseñarme a sonreírle a la vida, por tu amor incondicional, por confiar en mi, cuando ni yo lo hubiese hecho, esta tesis no es un logro mío sino tuyo, que me has guiado para ser lo que soy.

Mi agradecimiento más profundo para mis hermanas Tere y Mari, sin su apoyo, colaboración e inspiración habría sido imposible llevar a cabo esta dura empresa, así como a mis cuñados Juan y Felipe. A mis sobrinas Noelia, Mari y Erica por su cariño y apoyo, espero que este tío loco algún día les sirva de ejemplo... por ellos y para ellos!.

A Alejandro (el Marqués), mi sobrino hermano, si te pongo con esta gentuza y no con los de arriba, es porque también vas en el grupo de buenos amigos, gracias por tu apoyo tanto en lo profesional como en lo personal, a Fran (el Pumu) por compartir casa y amistad estos últimos doce años de vida conmigo, a ti te agradezco que me preguntaras que si sabía lo que era pedagogía, cuando

iba mal encaminado, je. A Erasmo (el Chasfy), nacimos, crecimos y vivimos juntos, que más te puedo decir, que conmigo no cuentas para morir, jejeje. A Elías (el Total) y Natalia, por su amistad incondicional, por estar ahí cuando los he necesitado. A Elia, Vane, Vicky, Ángel, Dimitri (el ruso), Salva (Palmer), Cathy, Pipe, Natalia, Anatael (Polli) con quienes he compartido buenos y malos momentos, por ser amigos, por estar ahí, gracias por todo.

A Nayra, por ser una de las mejores personas que he conocido y por compartir su vida conmigo, cuando terminemos con esto nos tomamos un singani con naranja, jeje, nada sin ti tendría sentido. Expresarles mi mayor agradecimiento también a sus padres y hermanos que me han acogido como uno más en su familia.


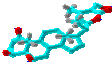
***Gracias por que sin ustedes,
esta tesis no se hubiese realizado...***

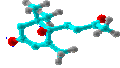
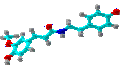

Abreviaturas

ABA:	Ácido abscísico
AchE:	Enzima acetilcolinesterasa
a. C.:	Antes de Cristo
Ag:	Antígeno
AMCPB:	Ácido <i>m</i> -cloroperbenzoico
c:	Cuaternario
CC:	Cromatografía en columna
CD:	Concentración requerida para doblar la actividad
C.E.I.C.:	Centro Ecológico de ICONA en Canarias
CEM:	Cromatografía de exclusión molecular
CCF:	Cromatografía en capa fina
CCFAR:	Cromatografía en capa fina de alta resolución
CCFC:	Cromatografía en capa fina centrífuga
Células A-549:	Línea celular de carcinoma humano de pulmón
Células HCT-116:	Línea celular de carcinoma humano de colon
Células HeLa:	Línea celular de carcinoma de cervix humano
Células HL-60:	Línea celular leucemia mieloide humana
Células KB:	Línea celular de carcinoma nasofaringe
Células MCF-7:	Línea celular de carcinoma humano de pecho
Células MDAMB-21:	Células receptoras negativas de estrógeno
Células NCI-H460:	Línea celular de carcinoma humano de pulmón
Células Vero:	Línea celular de riñón de mono verde africano
CI ₅₀ :	Concentración mínima que inhibe el crecimiento en un 50%
CMB:	Concentración mínima bactericida
CMI:	Concentración mínima inhibitoria
Col.:	Colaboradores
CPP:	Cromatografía en placa preparativa
Con A:	Concanavalina A, mitógeno estándar de Células T
COSY:	<i>Correlation Spectroscopy</i>
COX:	Ciclooxigenasa
CS:	Cepa salvaje
CTL:	(<i>citotoxic T lymphocytes</i>) Células T citotóxicas
BRM :	(biological response modifiers) Modificadores de la respuesta biológica
d:	Doblete
dd:	Doble doblete
DC:	Dicroísmo circular
DCC:	Diciclohexilcarboimidida
DDPH:	1,1-Difenil-2-picrihidrazilo
DE ₅₀ :	Dosis que produce el 50% de la respuesta máxima
DEPT:	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>

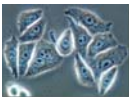



DIBAL:	Hidruro de diisobutilaluminio
DL ₅₀ :	Dosis que produce la muerte del 50%
DMAP:	4-dimetilaminopiridina
DMF:	Dimetilformamida
DMSO:	Dimetilsulfóxido
dt:	Doble triplete
EM:	Espectrometría de Masas
EMAR:	Espectrometría de Masas de Alta Resolución
ERV:	<i>Enterococos</i> vancomicin resistentes
eq:	equivalentes
ESI:	Ionización por electroespray
FDA:	(<i>Food Drug Administration</i>)
GRL:	Glóbulos rojos no infectados
GRI:	Glóbulos rojos infectados
h:	Horas
H-A:	Extracto en acetato de etilo de hojas de <i>Withania aristata</i>
H-D:	Extracto en diclorometano de hojas de <i>Withania aristata</i>
H-E:	Extracto en etanol de hojas de <i>Withania aristata</i>
H-H:	Extracto en <i>n</i> -hexano de hojas de <i>Withania aristata</i>
HMBC:	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Coherent</i>
HPLC:	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HSQC:	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
Hz:	Hertzio
I.A.S.:	Sociedad Internacional de Alelopatía
IE:	Impacto Electrónico
IFN:	Interferón
IL:	Interleuquinas
IR:	Infrarrojo
IT:	Índice terapéutico
IUPAC:	(<i>Internacional Union of Pure and Applied Chemistry</i>) Autoridad mundial encargada del avance de la química y aspectos relacionados con ésta.
J:	Constante de acoplamiento
LPS:	Lipopolisacarido bacteriano mitógeno estándar de células B
L-Selectride:	Tri- <i>sec</i> -butilborohidruro de litio
m:	Multiplete
M:	Unidades de molaridad
m.s.n.m.:	Metros sobre el nivel del mar
<i>m/z</i> :	Unidades de masa
MDR:	(<i>MultiDrug Resistance</i>) multirresistencia a fármacos
MTT:	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltrazol-2-1)-2,5-difeniltetrazolio
N:	Unidades de normalidad

NCI:	(<i>Internacional Cancer Institute</i>) Instituto Nacional del Cáncer de USA
ND:	No determinado
NF- κ B:	Factor de Transcripción kappaB
N.R.:	No reaccionó
Pgp:	(<i>P-glycoprotein</i>) glicoproteína P
PG _s :	Prostaglandinas
PDO:	20-(Hidroximetil)-pregna-1,4-dien-3-ona
PAMPs:	(<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>) patrones moleculares asociados a patógenos
PRRs:	(<i>pattern recognition receptors</i>) Receptores de reconocimiento de patrones
Proteínas ABC:	(<i>ATP-binding cassette</i>)
Py:	Piridina
QR	Quinona reductasa
QSAR:	(<i>Quantitative Structure-Activity. Relationships</i>), Estudio cuantitativo de la relación estructura-actividad
Rend:	Rendimiento
RMN ¹³ C:	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13.
RMN ¹ H:	Resonancia Magnética Nuclear de Protón
RMN:	Resonancia Magnética Nuclear
ROE:	<i>Rotatory Overhauser Effect</i>
ROESY:	<i>Rotating Frame Overhauser Effect Spectroscopy</i>
s:	Singulete
sa:	Singulete ancho
SAR:	(<i>Structure-Activity Relationship</i>), relación estructura-actividad
SARM :	<i>Staphylococcus aureus</i> meticilin resistentes
SERM:	<i>Staphylococcus epidermidis</i> meticilin resistentes
SN-38:	7-Etil-10-hidroxi-camptotecina
SPRP:	<i>Streptococcus pneumoniae</i> penicilin resistente
STS:	(<i>Standard Target Species</i>) Especies receptoras modelo
t:	Triplete
t.a.:	Temperatura ambiente
T-A:	Extracto en acetato de etilo de tallos de <i>Withania aristata</i>
T-D:	Extracto en diclorometano de tallos de <i>Withania aristata</i>
T-E:	Extracto en etanol de tallos de <i>Withania aristata</i>
T-H:	Extracto en <i>n</i> -hexano de tallos de <i>Withania aristata</i>
TBDMSi:	<i>Tert</i> -butildimetilsilicio
THF:	Tetrahidrofurano
TMS:	Trimetilsilicio
UV:	Ultravioleta
α_D :	Rotación óptica
δ :	ppm (partes por millón)
$\omega_{1/2}$	Ancho a la mitad de la señal

ÍNDICE	página
1. Introducción	
1.1. Papel de los Productos Naturales en el desarrollo de fármacos	1
1.2. Canarias y su biodiversidad	5
1.3. Familia Solanaceae	
1.3.1. Consideraciones taxonómicas de la familia Solanaceae	9
1.3.2. Actividades farmacológicas de los metabolitos aislados de especies de solanáceas	15
2. Objetivos	23
3. Descripción botánica, recolección, extracción y fraccionamiento cromatográfico de <i>Withania aristata</i>	
3.1. Descripción botánica	27
3.2. Recolección	30
3.3. Extracción y fraccionamiento cromatográfico	30
3.3.1. Hojas	31
3.3.2. Tallos	32
4. Estudio fitoquímico de hojas y tallos de <i>W. aristata</i>	
4.1. Withanolidas	
4.1.1. Introducción	39
4.1.1.1. Distribución de withanolidas	39
4.1.1.2. Clasificación y estructura de withanolidas	41
4.1.1.3. Biogénesis de withanolidas	48
4.1.1.4. Aproximaciones sintéticas de withanolidas	50
4.1.1.5. Actividades farmacológicas de withanolidas	52
4.1.1.5.1. Actividad insecticida y antialimentaria	53
4.1.1.5.2. Actividad antiparasitaria	56
4.1.1.5.3. Actividad quimiopreventiva y citotóxica	57
4.1.1.5.4. Actividad inhibidora de la acetilcolinesterasa	59
4.1.1.5.5. Actividad antiinflamatoria	61
4.1.1.5.6. Actividad inmunomoduladora	62
4.1.2. Resultados y discusión	65
4.1.3. Parte Experimental	139

4.1.3.1. Separación cromatográfica de las withanolidas de las hojas de <i>withania aristata</i>	139
4.1.3.2. Separación cromatográfica de las withanolidas de los tallos de <i>Withania aristata</i>	141
4.1.3.3. Datos físicos y espectroscópicos	141
4.2. Carotenoides y apocarotenoides	
4.2.1. Introducción	167
4.2.2. Resultados y discusión	173
4.2.3. Parte Experimental	179
4.2.3.1. Separación cromatográfica de los carotenoides y apocarotenoides de las hojas de <i>Withania aristata</i>	179
4.2.3.2. Separación cromatográfica de los carotenoides y apocarotenoides de los tallos de <i>Withania aristata</i>	180
4.1.3.3. Datos físicos y espectroscópicos	181
4.3. Amidas y aminas	
4.3.1. Introducción	185
4.3.2. Resultados y discusión	193
4.3.3. Parte Experimental	201
4.3.3.1. Separación cromatográfica de las amidas y aminas de las hojas de <i>Withania aristata</i>	201
4.3.3.2. Separación cromatográfica de las amidas y aminas de los tallos de <i>Withania aristata</i>	202
4.3.3.3. Datos físicos y espectroscópicos	203
4.4. Miscelánea	207
5. Modificaciones estructurales	
5.1. Introducción	213
5.2. Preparación de derivados para modular la actividad	223
5.2.1. Transformaciones de withaferina A	223
5.2.1.1. Transformaciones en los alcoholes sobre C-4 y C-27 de la withaferina A	224
5.2.1.1.1. Reacciones de acilación	224
5.2.1.1.1.1. Reacciones de acetilación	225
5.2.1.1.1.1. Reacciones de acilación con cloruros de ácido	226
5.2.1.1.2. Formación de éteres	230
5.2.1.1.2.1. Formación de éteres metílicos	230

5.2.1.1.2.1. Formación de éteres de silicio	231
5.2.1.1.3. Halogenación	231
5.2.1.1.4. Reacciones de oxidación	233
5.2.1.1.4.1. Reacción con reactivo de Jones	233
5.2.1.1.4.2. Reacción con reactivo de Collins	234
5.2.1.1.4.3. Reacción óxido de selenio	234
5.2.1.2. Transformaciones de los dobles enlaces de la withaferina A	235
5.2.1.2.1. Reacciones de hidrogenación	235
5.2.1.2.1.1. Hidrogenación con paladio sobre carbono	235
5.2.1.2.1.2. Hidrogenación con hidróxido de paladio sobre carbono	236
5.2.1.2.2. Reacciones de epoxidación	236
5.2.1.2.2.1. Epoxidación con ácido <i>m</i> -cloro-perbenzoico	236
5.2.1.2.2.1. Epoxidación con H ₂ O ₂ y NaOH	237
5.2.1.2.3. Adiciones conjugadas al doble enlace α,β -insaturado	238
5.2.1.2.3.1. Adición conjugada de H ₂ O	238
5.2.1.2.3.2. Adición conjugada de MeOH	239
5.2.1.2.3.3. Adición conjugada de aminas	241
5.2.1.3. Apertura del epóxido de la withaferina A	242
5.2.1.4. Transformaciones de la cetona en C-1	243
5.2.1.4.1. Reacciones de reducción de la withaferina A	243
5.2.1.4.1.1. Reducción con <i>L</i> -selectride	243
5.2.1.4.1.2. Reducción con LiAlH ₄	244
5.2.1.4.1.3. Reducción con DIBAL	244
5.2.1.4.1.4. Reducción en condiciones de Luche	245
5.2.1.4.2. Formación de la oxima de la withaferina A	246
5.2.1.5. Reacciones de contracción del anillo A de la withaferina A	249
5.2.1.5.1. Contracción de anillo A con Dowex 50WX8-200	249
5.2.1.5.2. Contracción de anillo A con el ácido de Lewis BF ₃ OEt ₂	252
5.2.1.6. Formación de dímeros de la withaferina A	252
5.2.1.6.1. Formación de dímeros por metátesis con reactivos de Grubbs	253
5.2.1.6.2. Formación de dímeros vía diésteres	258
5.2.2. Modificaciones del 6 α -cloro-5 β -hidroxiwithaferina A (W-27)	261
5.2.2.1. Reacciones de acilación	261
5.2.2.1.1. Reacciones de acetilación	262

5.2.2.1.2. Reacciones de acilación con cloruros de ácido	262
5.2.2.2. Preparación del éter de silicio	263
5.2.3. Preparación del compuesto natural W-18	264
5.2.4. Preparación de derivados de W-1 para dicroísmo	267
5.2.5. Otras reacciones	268
5.2.5.1. Esterificación de 38 con cloruro de furoilo	268
5.2.5.2. Esterificación de 38 con cloruro de anisoilo	269
5.2.5.3. Hidrogenación catalítica de 45	270
5.3. Parte experimental	271
6. Actividades biológicas	
6.1. Actividad citotóxica	
6.1.1. Introducción	349
6.1.2. Productos naturales con actividad citotóxica	350
6.1.3. Resultados y discusión	355
6.2. Actividad antimicrobiana	
6.2.1. Introducción	369
6.2.2. Productos naturales con actividad antimicrobiana	372
6.2.3. Resultados y discusión	375
6.3. Actividad inmunomoduladora	
6.3.1. Introducción	385
6.3.2. Productos naturales con actividad inmunomoduladora	392
6.3.3. Resultados y discusión	395
6.4. Actividad alelopática	
6.4.1. Introducción	403
6.4.2. Resultados y discusión	408
6.4.2.1. Ensayo de bioactividad general	408

6.4.2.2. Ensayo de fitotoxicidad	411
6.5. Actividad antimalárica	
6.5.1. Introducción	421
6.5.2. Productos naturales con actividad antimalárica	424
6.5.3. Resultados y discusión	427
7. Técnicas experimentales	
7.1. Técnicas espectroscópicas y espectrométricas	433
7.1.1. Rotación óptica ($[\alpha]_D$)	433
7.1.2. Espectroscopía ultravioleta (UV)	433
7.1.3. Dicroísmo circular (DC)	433
7.1.4. Espectroscopía infrarroja (IR)	433
7.1.5. Resonancia magnética nuclear (RMN)	433
7.1.6. Espectrometría de masas de baja resolución (EM)	434
7.1.7. Espectrometría de masas de alta resolución (EMAR)	434
7.2. Técnicas cromatográficas	435
7.2.1. Cromatografía en capa fina (CCF)	435
7.2.2. Cromatografía preparativa en capa fina (CPCF)	435
7.2.3. Cromatografía en capa fina de alta resolución (CCFAR)	435
7.2.4. Cromatografía en columna (CC)	436
7.2.5. Cromatografía en capa fina centrífuga (CCFC)	436
7.2.6. Cromatografía de exclusión molecular (CEM)	436
7.2.7. Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR)	436
6.3. Programas informáticos	437
8. Conclusiones	441
9. Anexos	449
9.1. Índice de productos nuevos en la bibliografía química	449



1. Introducción

1. Introducción

1.1. Papel de los Productos Naturales en el desarrollo de fármacos

El panorama actual de la Química Orgánica es el de una ciencia multidisciplinar que se encuentra fundida con otras disciplinas dentro de la Química, e incluso con otras materias como pueden ser la Biología o la Medicina. Temas de actualidad en la Química Orgánica son el aislamiento o síntesis de productos naturales, en busca de nuevos materiales o para utilizarlos como medicinas, la química supramolecular o la fotoquímica orgánica.

Por productos naturales entendemos las moléculas de la naturaleza. Obviamente, toda la vida está hecha con moléculas, ya sean macromoléculas como proteínas, ácidos nucleicos, etc. u otras más pequeñas como la adrenalina (también llamada epinefrina en su sustitutivo sintético), hormona vaso activa secretada en situaciones de alerta por las glándulas suprarrenales¹.

A los productos naturales pertenecen también alcaloides como la coniina, principio activo de la cicuta (*Conium maculatum*) que mató a Sócrates, o terpenos como la tujona que es la toxina del ajeno (*Artemisia absinthium*) que acabó con la vida de varios artistas en París en el siglo XIX. También existen productos naturales, tales como el colesterol, que pueden causar innumerables daños a través de enfermedades cardíacas pero que por otra parte es un componente vital de las paredes celulares², así como el policétido tromboxano, un compuesto fundamental para el proceso de coagulación de la sangre. Así, encontraremos entre ellos una gran variedad estructural que va desde el producto natural más pequeño, el óxido nítrico (NO) (que actúa como vasodilatador entre otras funciones) hasta el más grande, el policétido brevetoxina, un producto aislado de algas rojas (*Karenia brevis*), que aparece de tiempo en tiempo en las aguas costeras y que mata el pescado y a todo aquél que lo come³. Muchos productos naturales son la fuente de importantes fármacos que sirven para salvar vidas, como por ejemplo la penicilina.

¹ Yamashima, T. *J. Med. Biorg.* **2006**, *11*, 95.

² Daniels, T. F.; Killinger, K.M.; Michal, J. J.; Wright, R. W., Jr.; Jiang, Z. *Int. J. Biol. Sci.* **2009**, *5*, 474.

³ Leighfield, T. A.; Muha, N.; Ramsdell, J. S. *Toxicon.* **2009**, *54*, 851.

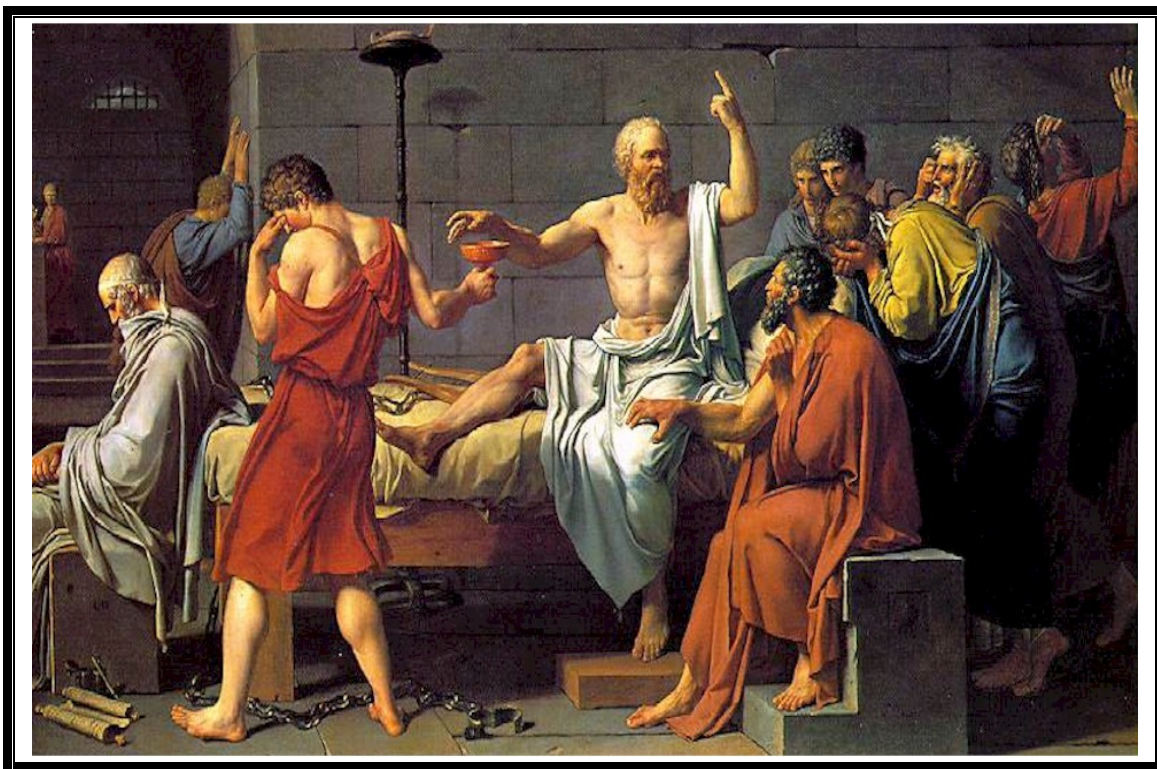


Figura 1.1. Sócrates se dispone a beber cicuta cumpliendo su condena de muerte entre sus discípulos.

Las reacciones químicas comunes a todos los seres vivos implican el metabolismo primario de los cuatro grandes grupos de compuestos esenciales para la vida: carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Hay sin embargo, otros compuestos que no son vitales pero que usualmente ayudan a la supervivencia, estos son los metabolitos secundarios. La exploración de los compuestos producidos por el metabolismo secundario de plantas, microorganismos, hongos, insectos o mamíferos comenzó hace mucho tiempo, encontrándose una gran variedad de estructuras.

El empleo de las plantas medicinales con fines curativos es una práctica que se ha utilizado desde tiempo inmemorial. Durante mucho tiempo los remedios naturales, y sobre todo las plantas medicinales, fueron el principal e incluso el único recurso del que disponían los "médicos" en épocas ancestrales. Esto hizo que se profundizara en el conocimiento de las especies vegetales con propiedades medicinales y ampliar así la experiencia en el empleo de los productos que de ellas se extraen.

La fitoterapia, nombre que se aplica al uso medicinal de las plantas, nunca ha dejado de tener vigencia. Muchas de las especies vegetales utilizadas por sus virtudes curativas entre los antiguos egipcios, griegos y romanos pasaron a formar parte de la

farmacopea en la época medieval, que más tarde se vio enriquecida por el aporte de los conocimientos adquiridos del Nuevo Mundo. Dichas plantas medicinales y los remedios que entonces utilizaban se siguen usando hoy en día, como es el caso de la quinina que se aisló de la corteza de *Cinchona officinalis* y que en 1638 la condesa de Chinchón popularizó, tras haber caído enferma en Lima (Perú), de “fiebres intermitentes” y haber sido tratada y curada con quinina⁴. Este compuesto fue el principal fármaco en el tratamiento de la malaria hasta que fue sustituido por otros medicamentos sintéticos más eficaces, como la quinacrina, cloroquina y primaquina.

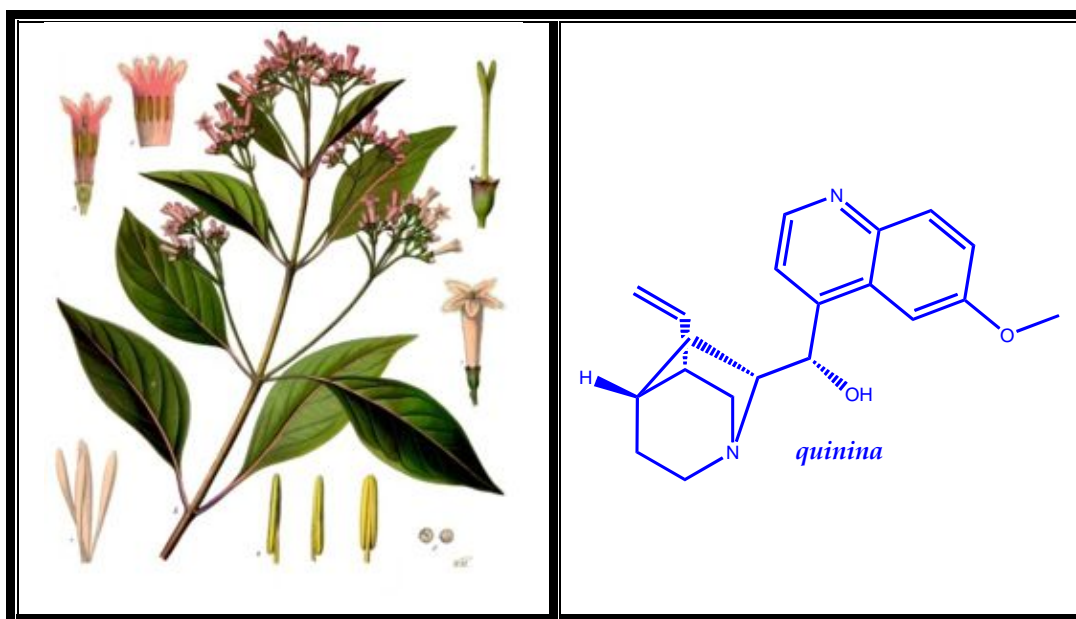


Figura 1.2. La quinina aislada de *Cinchona officinalis* fue usada para el tratamiento de la malaria.

Cuando la medicina occidental no logra obtener resultados frente a una enfermedad determinada, muchos pacientes recurren al auxilio de otros remedios. Cada vez son más las terapias que prometen curar o mejorar una determinada patología con procedimientos naturales. En todo el mundo, la llamada medicina tradicional mueve miles de millones de dólares. Esta clase de medicina cada vez va ocupando una mejor ubicación entre la medicina a base de fármacos, lo que genera para muchos países y empresarios, que gozan de estas variedades de vegetales y plantas, muchas ganancias y prestigio. El “boom” de la salud en los últimos años y la onda naturista ha hecho que muchas personas y empresas privadas dirijan su interés hacia productos de origen natural que pueden ser rentables en términos de mercado, esto es lo que denominamos "el auge de los productos naturales".

⁴ Marques de Oliveira, A. R.; Szczerbowski, D. *Quimica Nova*. **2009**, 32, 1971.

Cabe destacar que un 60% de las nuevas entidades químicas identificadas entre 1981-2008 son productos naturales (figura 1.3), análogos semisintéticos o compuestos sintetizados basándose en sus farmacóforos, según un estudio publicado por Newman y colaboradores en 2009⁵.

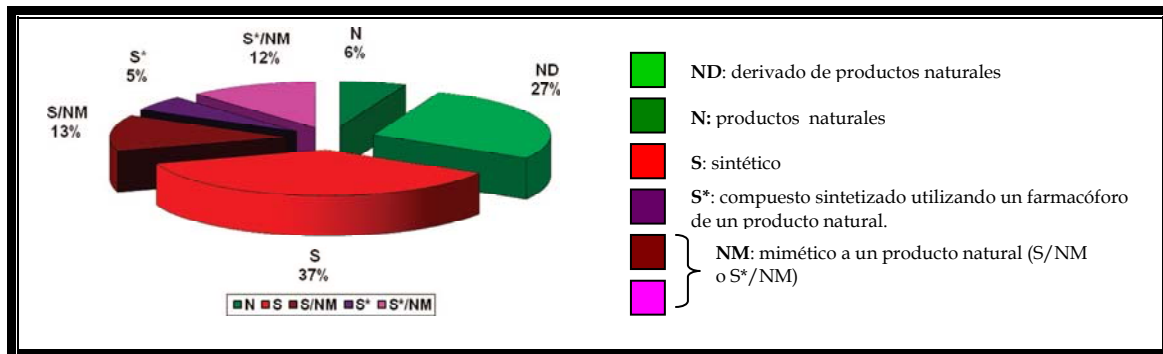


Figura 1.3. Nuevas entidades químicas (N= 1031) entre 1981-2008, clasificadas según su origen (Chem. Rev. 2009).

Entre 1970-1980 la investigación de los productos naturales para la búsqueda de nuevos fármacos alcanzó el máximo interés debido, fundamentalmente, al impulso que le dió la industria farmacéutica a las sustancias no sintéticas. Sin embargo, en la década de los 90 el interés por la investigación de los productos naturales decae, debido a diversas razones⁶, entre las que cabe destacar:

- La química combinatoria que ofreció, en un primer momento, librerías con un gran número de moléculas.
- La aparición de las técnicas de evaluación *in vitro* de alto rendimiento (*high-throughput in vitro screening*) de dianas moleculares específicas que favoreció el empleo de librerías de compuestos sintéticos.
- Los avances de la biología molecular, celular y la genómica que incrementaron el número de dianas terapéuticas, lo que llevó a tiempos de investigación más reducidos.
- Disminuyó el interés por las enfermedades infecciosas (el área más importante de los productos naturales).
- La Convención de Río de 1992 sobre la biodiversidad, que provocó incertidumbre sobre la conveniencia de la recolección de material biológico.

⁵ Cragg, G. M.; Grothaus, P. G.; Newman, D. J. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 3012.

⁶ Koehn, F. E.; Carter, G. T. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, *4*, 206.

Sin embargo, el poco éxito de la química combinatoria en la identificación de nuevos compuestos “cabeza de serie”, ha llevado a reconocer que el número de compuestos no determina la calidad de las librerías moleculares, sino que ésta viene determinada por la diversidad y la semejanza que tengan las moléculas con los fármacos actuales (*drug-likeness*), en términos de tamaño, solubilidad, etc. Esto ha provocado un renovado interés por los productos naturales en la búsqueda de diversidad química y en la obtención de nuevos “cabezas de serie”⁷.

No cabe duda que los productos naturales constituyen un buen punto de partida para el descubrimiento de nuevos fármacos, ya que se pueden considerar como un grupo de *estructuras privilegiadas* que han sido seleccionadas por la evolución por su capacidad de interactuar con una amplia variedad de proteínas y otras dianas biológicas⁸. Son sustancias que son biosintetizadas, para ejercer su función interactuando con los dominios proteicos de diferentes proteínas, que son estructuras muy conservadas en la naturaleza. Por lo que los productos naturales, sintetizados en un determinado organismo con una determinada función, pueden ejercer un efecto similar en los humanos. Un ejemplo es la ciclosporina y la rapamicina, que son sintetizados como mecanismo de defensa, por ejemplo, frente a las levaduras, existiendo cierta homología entre las proteínas de estos organismos y las implicadas en la respuesta inmunosupresora en humanos, por lo que no es accidental su actividad.

Todo esto hace que los productos naturales jueguen un papel primordial en el descubrimiento de nuevos fármacos, utilizándose librerías basadas en ellos para la búsqueda de nuevos “cabezas de serie”, en la industria farmacéutica actual.

1.2. Canarias y su biodiversidad.

Canarias, junto con Azores, Madeira, Salvajes y Cabo Verde constituyen la Región Macaronésica. Estos Archipiélagos poseen una sorprendente diversidad ecológica, fruto de unas especiales condiciones ambientales, pues la orografía modifica localmente las condiciones climáticas generales, lo que da lugar a una rica variedad de hábitat naturales. Ello se refleja claramente en la vegetación, formada por una flora rica y variada entre las que destacan numerosos endemismos. Por otro lado, los diferentes materiales volcánicos, bajo la acción combinada de los agentes climáticos, originan una

⁷ Newman, D. J. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 2589.

⁸ Breinbauer, R.; Vetter, I. R.; Waldmann, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2878.

gran diversidad de suelos. La conjunción de estos factores determina así la existencia de hábitats muy variados que albergan numerosas comunidades de plantas y animales que, al interrelacionarse, constituyen los singulares ecosistemas de las islas⁹.

La Macaronesia es un término que resume lo que los griegos bautizaron como “Islas Felices”. El famoso naturalista Plinio también las menciona como Islas Afortunadas, aunque realmente el término de Macaronesia se consolida a lo largo del siglo XIX. Veinte siglos más tarde, la Macaronesia sigue manteniendo una identidad sólida en medio del mar, cimentada en nuestra historia geológica, biológica y humana. Todas son islas volcánicas que albergan una de las zonas con mayor biodiversidad del planeta y unas culturas insulares muy activas, forjadas como tradicionales nodos de comunicación entre continentes y civilización.

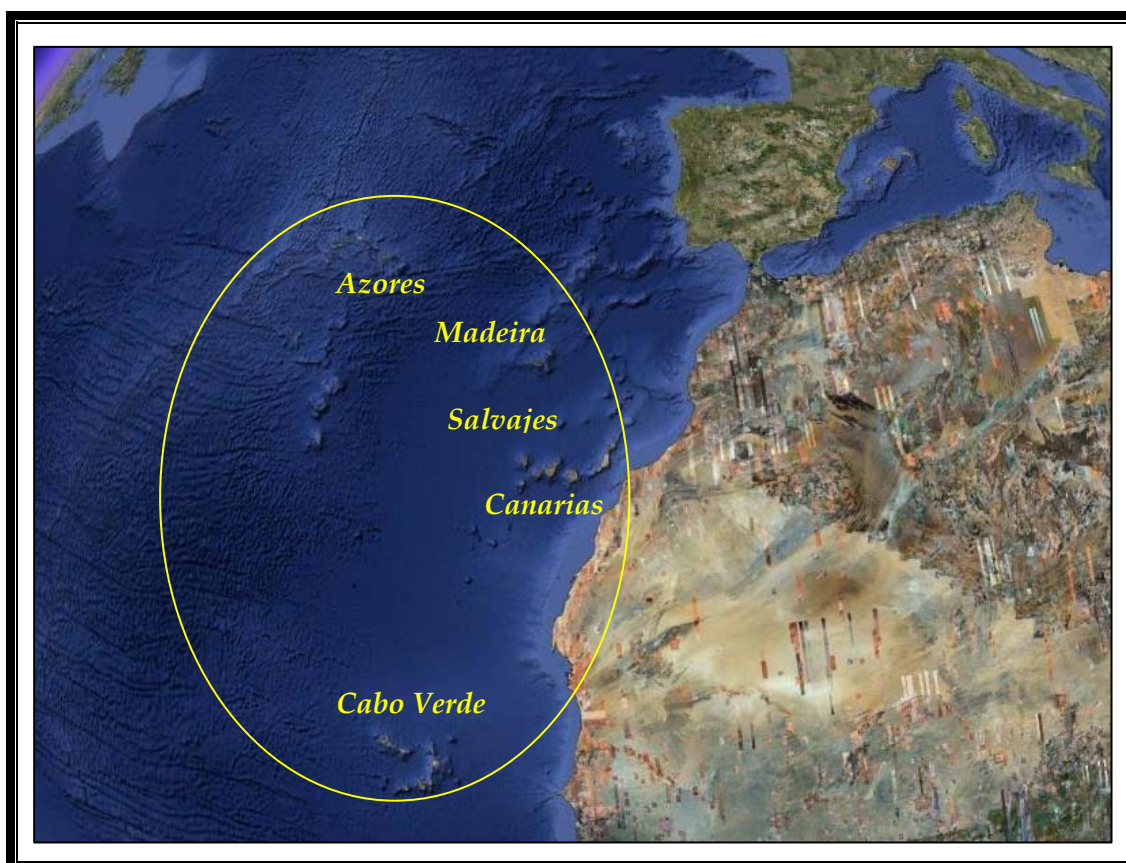


Figura 1.4. La región Macaronesia está constituida por las islas Canarias, Azores, Madeira, Salvajes y Cabo Verde.

⁹ Báez, M.; Sanchez-Pino, L. *Islas de Fuego y Agua. Canarias, Azores, Madeira, Salvajes, Cabo Verde. Macaronesia*. Ed. Edirca S. L., Las Palmas de Gran Canaria, 1983.

El Archipiélago Canario, el más cercano a un continente, África, es el de mayor riqueza florística de la Región Macaronésica. Según datos del antiguo C.E.I.C. (Centro Ecológico de Icona en Canarias), el número total de especies de plantas endémicas en España asciende a 1919 especies, de las cuales 702 son endemismos canarios. Con sólo un 1,5% de la superficie nacional, las Islas Canarias albergan cerca de la mitad de los endemismos vegetales españoles, lo que da una idea de la importancia de la flora canaria. Es además, la cuarta región natural del mundo en cuanto a endemismos florísticos, con 1700 plantas superiores catalogadas, de las que unos 20 géneros y más de 700 especies son endémicas¹⁰.

Tenemos así que Canarias se encuentra representada por un elenco de especies singulares y exclusivas de su región biogeográfica. De hecho ha sido considerada como uno de los principales centros de concentración de biodiversidad, especialmente por su alto contenido en especies y subespecies endémicas¹¹.

La flora canaria, principal riqueza natural de las islas, permaneció casi desconocida a las puertas de Europa, con la excepción de casi un centenar de especies canarias, cultivadas en diversos jardines de las principales ciudades europeas, que algunos botánicos prelinneanos describieron e ilustraron. Entre ellos destacan Petiver, Ray y sobre todo Plukenet, quien describió e ilustró la mayor parte de esas especies¹². A lo largo del siglo XVIII tres científicos europeos impulsaron su estudio, el astrónomo francés Louis Feuillée (1660-1732) y los botánicos Carl von Linné (1707-1778) y Joseph Banks (1740-1820). Carl von Linné preparó en 1737 el manuscrito *Hortus Cliffortianus* y en él describe la especie *Canarina canariensis* L. uno de los más bellos endemismos de Canarias, que fue cultivado en el Jardín de Hartekamp (Holanda). En su obra maestra *Plantarum* (1753) describe unas cuarenta especies endémicas de Canarias¹³.

En las Canarias prehispanicas, los aborígenes hicieron un amplio uso de la flora autóctona, bien como alimento, tal como es el caso de los frutos del “mocán” (*Visnea*

¹⁰ Cruz, S. J. *Más de 100 Plantas Medicinales, Medicina Popular Canaria Monografías*. Ed. Obra Social La Caja de Canarias. 2007. pp 1-689.

¹¹ Izquierdo Zamora, I.; Martín Esquivel, J. L.; Zurita Pérez, N.; Arechavaleta Hernández, M. *Lista de especies silvestres de Canarias (Hongos, Plantas y Animales terrestres)*. Ed. Consejería de Medio Ambiente y Ordenación Territorial, Gobierno de Canarias. P: 13, 2004.

¹² Francisco-Ortega, S. A.; Jarvis, C. E. *Pre-Linnaean referents for the Macaronesian flora found in Leonard Plukenet's works and collections*. *Bull. Nat. Hist. Mus. Lond. (Bot.)*, 1994. 24, p.1.

¹³ González, A. G. *La botánica, Sventenius y yo*, Ed. Centro de La Cultura Popular Canaria, Tenerife, p. 35, 2001.

mocanera), para la fabricación de vestimentas, entretejiendo las hojas de palmera (*Phoenix canariensis*) o bien como herramientas y armas de diversas maderas, como “tea” (*Pinus canariensis*), “sabina” (*Juniperus phoenicea*), “acebuche” (*Olea europea*) y “drago” (*Dracaena draco*). La corteza de este último, al igual que la de la “tea”, se empleó para la confección de sarcófagos.

Un aspecto destacable de las plantas endémicas de Canarias es el uso medicinal que tradicionalmente se ha hecho de algunas de ellas¹⁴. Así, el “poleo” (*Bystropogon sp.*), la “salvia blanca” (*Sideritis sp.*) y la “cresta de gallo” (*Isoplexis canariensis*) gozan de gran reputación, aún hoy, como remedio para determinadas afecciones. En el caso de la “cresta de gallo” se han realizado múltiples estudios fitoquímicos¹⁵, encontrándose sustancias cardiotónicas exclusivas de esta especie.

En cualquier caso, dado el carácter exclusivo de muchas de las plantas que crecen en Canarias, sería deseable un mejor conocimiento de su uso tradicional, más cuando en el momento actual los modos de vida tradicionales son cada vez más escasos y esta información corre el peligro de desaparecer.

Por otra parte, teniendo en cuenta que menos del 10% de las especies vegetales endémicas de la Macaronesia han sido estudiadas por su contenido en compuestos bioactivos, se hace necesaria una investigación en este campo, ya que si no se realiza el trabajo ahora, quizás sea demasiado tarde en el futuro, debido a la acelerada degradación del medio ambiente con la consiguiente pérdida de especies vegetales de incalculable valor.

¹⁴ Pérez de Paz, P. L.; Hernández, C. E. *Plantas medicinales o útiles en la Flora Canaria*, Ed. Francisco Lemus, Tenerife, 1999.

¹⁵ Valera, A.; Santos, A. G. *Investigaciones fitoquímicas en plantas canarias*. Ed. Centro de Estudios Ramón Areces, S.A, Madrid, 2002.

1.3. La familia solanaceae

1.3.1. Consideraciones taxonómicas de la familia Solanaceae

Las características principales de la familia Solanaceae son las de ser plantas generalmente herbáceas, anuales o perennes, aunque hay especies arbustivas y arbóreas. Son plantas con hojas alternas y flores pentámeras perfectas, cuyos pétalos forman una corola tubular, al menos en la base y los estambres se alternan con los cinco lóbulos de la corona. El ovario generalmente es bilocular, aunque también puede ser multilocular, con muchos óvulos en placentas axilares y con un estilo terminal. Los frutos pueden ser bayas o cápsulas. Otros caracteres anatómicos importantes consisten en la presencia constante de haces laterales, de células provistas de sales cristalizadas formadas por oxalato de calcio y la ausencia de tejidos secretores internos. Las inflorescencias son normalmente uníparas o bíparas, helicoidales, pero también son frecuentes las flores solitarias¹⁶.

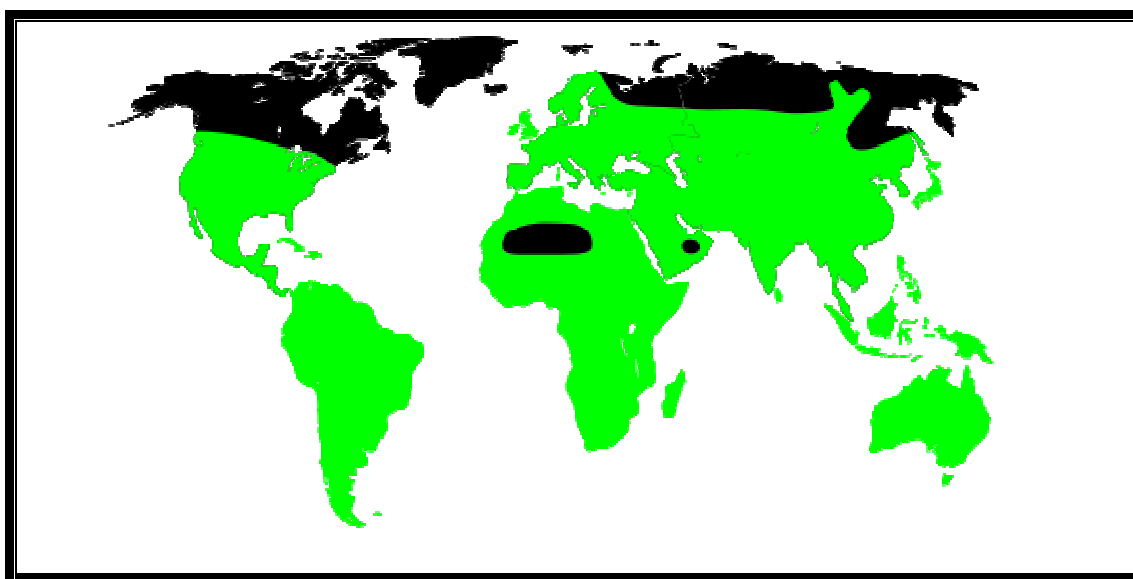


Figura 1.5. Distribución geográfica de las solanáceas remarcado en verde

Esta familia, constituida por 90 géneros y cerca de 3000 especies, tiene una distribución cosmopolita, existiendo un mayor número de especies en los climas cálidos y cálido-templados. Se incluyen entre sus géneros¹⁷: *Solanum* (1.700 especies), *Cestrum* (150 especies), *Physalis* (100 especies), *Lycium* (80-90 especies), *Nicotiana* (66

¹⁶ Bruneton, J. *Plantas Toxicas. Vegetales peligrosos para el hombre y los animales*, Ed. Acribia S.A., Madrid, 2001.

¹⁷ Royal Botanic Garden, Kew: *Vascular Plant Families and Genera* (29/07/2005). <http://www.rbkew.org.uk/cgi-bin/web.dbs/genlist.pl?Solanaceae>.

especies), *Capsicum* (50 especies), *Acnitus* (50 especies), *Petunia* (40 especies), *Withania* (23 especies), *Fabiana* (25 especies), *Hyoscyamus* (20 especies), *Salpiglossis* (18 especies), *Schizanthus* (15 especies), *Solandra* (10 especies), *Datura* (10 especies), *Scopolia* (6 especies), *Mandragora* (6 especies), *Atropa* (4 especies), *Duboisia* (2 especies) y *Nicandra* (1 especie).

La clasificación botánica de esta familia es la siguiente:

Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
División:	Magnoliopyita
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Asteridae
Orden:	Solanales
Familia:	Solanaceae

Numerosas especies de la familia Solanaceae son mundialmente conocidas por su importancia económica, en la medicina tradicional, en la agricultura, como plantas ornamentales y también por su alta toxicidad.

Así, las plantas de esta familia poseen un gran interés económico, a nivel mundial, dado que muchas especies, algunas originarias de América, son cultivadas desde hace mucho tiempo. Han transcurrido más de 500 años desde que los marinos de Colón descubrieran en Latinoamérica el tabaco (*Nicotiana tabacum*) y su utilización por los indígenas para aliviar dolencias, enfermedades y para celebrar sus ceremonias rituales. El tabaco se utilizó en forma de rapé, de puro y de cigarrillo, pasando de ser una panacea a un agente cancerígeno. Su consumo pronto se extendió entre las clases populares, pero distintas investigaciones han concluido que lo que antaño era una planta con propiedades benignas, incluso con un carácter sagrado, hoy es un producto letal, de producción industrial, que mueve enormes cantidades de dinero, distribuyéndose en los más remotos confines del mundo e integrado en el “*modus vivendi*” de la población.

A nadie se le escapa el peso global del hábito de fumar, se calcula que la producción mundial ronda los 6.000 millones de toneladas y el consumo mundial de

cigarrillos es de unos 5.500 miles de millones de unidades¹⁸. Sin embargo, los restos industriales de las hojas de esta planta tienen un efecto beneficioso como insecticida, siendo efectivos frente a patógenos y gérmenes, sin los efectos secundarios negativos sobre el medio ambiente y la salud que pueden tener los insecticidas de síntesis¹⁹.

En esta familia se incluyen las dos especies de hortalizas más consumidas mundialmente, como son la papa (*Solanum tuberosum*) y el tomate (*Solanum lycopersicum*). Este último, tiene una producción anual de alrededor de 122,9 millones de toneladas al año y su consumo reduce el riesgo de ciertos tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares y degeneración macular, ya que es la principal fuente de compuestos antioxidantes en la dieta, tales como las vitaminas C y E, carotenoides como licopeno, β -caroteno y luteína y flavonoides, como quercetina²⁰. También se encuentran dentro de esta familia otras hortalizas con un alto interés alimenticio como la berenjena (*Solanum melongena*) y los pimientos o ajíes (*Capsicum*) al igual que un gran número de plantas ornamentales, como *Petunia*, *Schizanthus*, *Salpiglossis* y *Datura*.

Las solanáceas tienen fama de ser una de las familias más ricas en especies que biosintetizan moléculas tóxicas. Así por ejemplo, las especies “belladona” (*Atropa belladonna*), “estramonio” (*Datura stramonium*), “beleño negro” (*Hyoscyamus níger*) y “mandrágora” (*Mandragora officinarum*)²¹, se conocen desde tiempos remotos por su actividad sobre el sistema nervioso central, siendo usadas con fines criminales y divinativos. Se supone que Julieta empleó un elixir preparado con mandrágora para fingir su muerte, mientras que Romeo se envenenó con acónito. La raíz de la mandrágora se asemeja a un cuerpo humano, por lo que en la época medieval se la conocía popularmente como hombrecillo plantado y fue centro de un gran número de leyendas. Así, un médico francés llamado Laurent Catelan aseguraba que la mandrágora procedía del esperma de hombres colgados en la horca o aplastados por las ruedas..., el cual se licuaba y mezclaba con la grasa, cayendo gota a gota en tierra. Su extracción también se consideraba altamente peligrosa, se creía que cuando la arrancaban del suelo, el hombrecillo encerrado despedía agudos gemidos²². Estas

¹⁸ Pastor, F. P.; LLorca, S. V. *Adicciones*, **2004**, 16, 13.

¹⁹ Ujvary, I., *Nicotine and other insecticidal alkaloids*, Book of Abstracts, 214th ACS National Meeting, **1997**.

²⁰ Dorais, M.; Ehret, D. L.; Papadopoulos, A. P. *Phytochem Rev.*, **2008**, 7, 231.

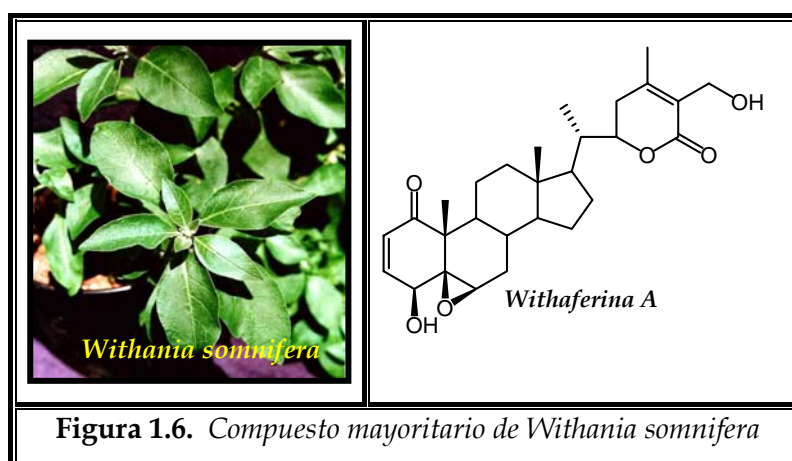
²¹ Bruneton, J. *Pharmacognosy: Phytochemistry medicinal plants*, 2nd Ed. Intercept, Hampshire, U.K., **1999**.

²² Brau, J. L. *Historia de las drogas*, Bruguera, España, 1973.

plantas deben su toxicidad a los alcaloides tropánicos, frecuentes en la familia Solanaceae y que son usados en la actualidad en medicina²³.

Entre los géneros de la familia Solanácea se encuentra el género *Withania*, el cual desempeña un papel muy importante en la medicina tradicional del sureste de Asia, conocida como medicina Ayurvédica. Las veintitrés especies conocidas de *Withania* están ampliamente distribuidas por las partes más secas de las zonas tropicales y subtropicales, que van desde las Islas Canarias, la región mediterránea y del norte de África al sureste de Asia²⁴.

Entre las especies del género *Withania* podemos destacar, por su uso medicinal, *Withania somnifera*. Esta especie se distribuye por el sur de Europa, la Macaronesia, el noreste de África y la India, donde es conocida comúnmente como “ashwagandha”. Posee numerosos usos en la medicina Ayurvédica donde es utilizada desde hace más de 3000 años²⁵, siendo de especial interés su uso para tratar tumores, la bronquitis, el asma, inflamaciones (incluyendo la artritis), demencia senil y una amplia gama de patologías infecciosas; los brotes y semillas también se utilizan como alimento y para espesar la leche. Las aplicaciones tradicionales del “ashwagandha” entre las tribus africanas incluyen las patologías inflamatorias y fiebres. Esta especie es sin duda la más estudiada y de la que se han aislado el mayor número de principios activos de este género.



²³ Pretorius, E.; Marx, J. *Envir. Tox. and Pharm.*, **2006**, *21*, 331.

²⁴ Mirjalili, M. H.; Moyano, E.; Bonfill, M.; Cusido, R. M.; Palazon, J. *Molecules*, **2009**, *14*, 2373.

²⁵ Anonymous. In *The Wealth of India, (Raw Materials)*; CSIR: New Delhi, India. **1976**; *10*, 580.

Se han llevado a cabo numerosos estudios para identificar los principios activos de esta especie. Así, se atribuye a las withanolidas (ej. Withaferina A) sus múltiples propiedades medicinales, estos esteroides son semejantes, en su acción y estructura, a los componentes activos del ginseng asiático (*Panax ginseng*), conocidos como ginsenósidos. De hecho, el "ashwagandha" ha sido llamado "ginseng indio"²⁶.

Withania coagulans es una especie ampliamente distribuida por el sureste de la India, Afganistán y por la zona este del Mediterráneo. Esta planta ha sido usada en la medicina tradicional durante siglos por sus propiedades como coagulante, utilizándose incluso para fabricar queso, debido a las propiedades coagulantes de una enzima que se encuentra en sus frutos²⁷. De esta especie, se aisló una withanolida a la que se le dio el nombre de coagulina F. Los frutos se usan como sedante, eméticos, diuréticos y para curar afecciones intestinales, en Asia se emplean las ramas para la limpieza de los dientes y el humo de la planta completa es inhalado para aliviar el dolor de muelas²⁸. Además, del extracto etanólico de la parte aérea se han aislado withanolidas que presentan actividad inmunosupresora, con inhibición de la proliferación de células B y T²⁹.

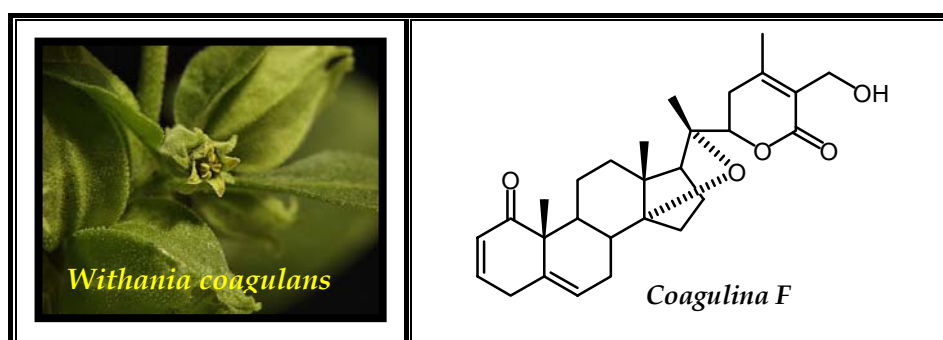


Figura 1.7. Compuesto aislado de *W. coagulans* con propiedades coagulantes

Como representante más característico del género *Withania* en las Islas Canarias se encuentra *Withania aristata*, arbusto de ambiente termófilo, que recibe el nombre local de "oroval" o "sáquido". Los habitantes de las zonas donde crece esta planta usan sus hojas y corteza en infusiones para aliviar las afecciones reumáticas, para combatir la otitis, el insomnio, el estreñimiento, como antitumoral y diurético¹⁰. Estudios fitoquímicos de esta especie^{30,31,32} dieron lugar al aislamiento e identificación de

²⁶ Misra, L.; Lal, P.; Sangwan, R. S.; Sangwan, N.; Uniyal, G. C.; Tuli, R. *Phytochemistry*, **2005**, *66*, 2702.

²⁷ Naz, S.; Masud, T.; Nawaz, M. A. *Int. J. Dairy Technol.* **2009**, *62*, 315.

²⁸ Atta-ur-Raman; Dur-e-Shahwar; Naz, A.; Choudhary, M. I. *Phytochemistry*. **2003**, *63*, 387.

²⁹ Huang, C.; Ma, L.; Sun, L.; Ali, M.; Arfan, M.; Liu, J.; Hu, L. *Chem. Biodivers.* **2009**, *6*, 1415.

³⁰ González, A. G.; Bretón, J. L.; Trujillo, J. M. *An. Quim.* **1974**, *70*, 64.

³¹ González, A. G.; Bretón, J. L.; Trujillo, J. *An. Quim.* **1972**, *68*, 107.

diversas withanolidas con actividad antialimentaria, insecticida, antibiótica, diurética y citotóxica, entre otras. Otro de los representantes de este género en Canarias es *Withania frutescens*, la cual es usada por sus propiedades antitumorales³³.



Figura 1.8. Especies del género *Withania* presentes en Canarias

Withania adunensis y *Withania riebeckii*, conocida comúnmente como “socotra oroal”, poseen numerosos usos en la medicina tradicional del Yemen, donde la fitoterapia juega un papel fundamental en la medicina del país. Estas especies son usadas por sus propiedades antiinflamatorias y anticancerígenas³⁴, para curar las heridas e incluso para el tratamiento del asma. Así mismo, se ha descrito la potente actividad antimicrobiana del extracto metanólico de las hojas y tallos de ambas especies, frente a una variada gama de microorganismos³⁵.

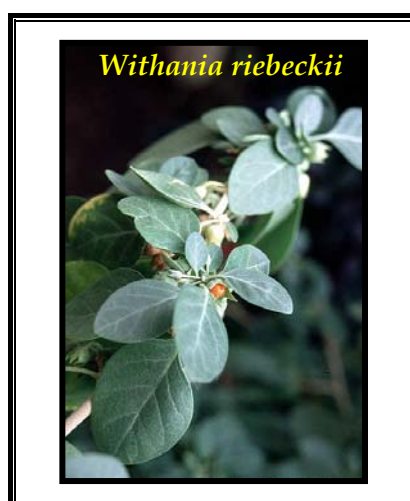


Figura 1.9. *Withania riebeckii*

³² Benjumea, D.; Martín-Herrera, D.; Abdala, S.; Gutierrez-Luis, J.; Quinones, W.; Cardona, D.; Torres, F.; Echeverri, F. J. *Ethnopharmacol.* **2009**, *123*, 351.

³³ González, A. G.; Darías, V.; Martín Herrera, D. A.; Suárez, M. C. *Fitoterapia*, **1982**, *53*, 85.

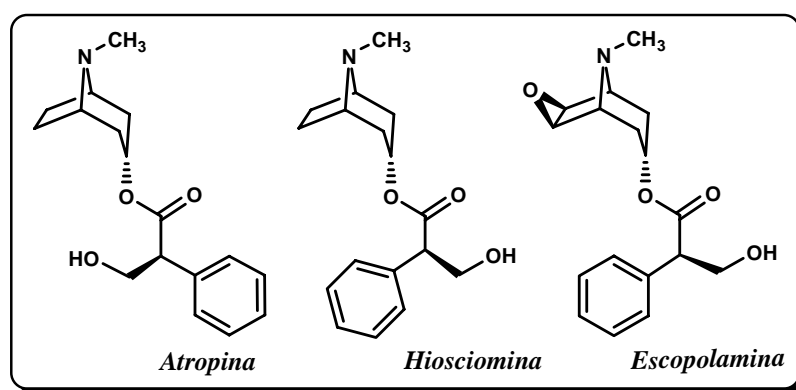
³⁴ Mothana, R. A. A.; Grunert, R.; Lindequist, U.; Bednarski, P. J. *Pharmazie*. **2007**, *62*, 305.

³⁵ Mothana, A. A.; Lindequist, U. *J Ethnopharmacol.*, **2005**, *96*, 177.

1.3.2 Actividades farmacológicas de los metabolitos aislados de especies de solanáceas

De la familia Solanaceae se han aislado un gran número de metabolitos secundarios, destacando los alcaloides tropanicos, fitoesteroides, terpenoides y glicósidos de flavonoides. Estos metabolitos presentan una amplia gama de actividades biológicas, que pasamos a reseñar.

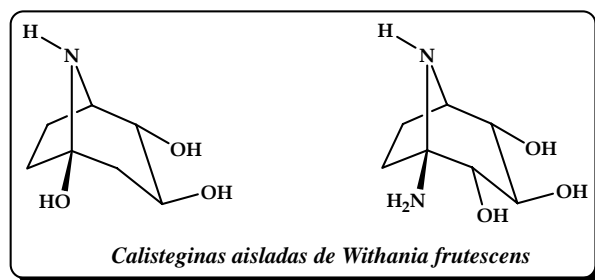
La **atropina**, **escopolamina** e **hiosciamina** son alcaloides de la serie del tropano aislados de numerosas especies de solanáceas, entre ellas *Datura stramonium* “estramonio” y son los principales responsables de los efectos tóxicos que posee dicha planta, especialmente en las semillas y hojas que es en donde se encuentran en mayor concentración. Estos compuestos son antagonistas competitivos en los receptores colinérgicos muscarínicos y se usan actualmente en clínica como fármacos en procesos preoperatorios, debido a sus efectos sedante y antisialogoga³⁶.



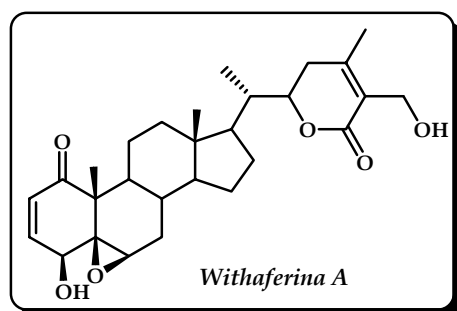
De especies del género *Withania* también se han aislado numerosos alcaloides. Así por ejemplo de *W. somnifera* y *W. frutescens* se han aislado alcaloides polihidroxilados con esqueleto *nor*-tropano, llamados **calisteginas**. Estos alcaloides son potentes inhibidores de las glicosidasas y presentan actividad hipoglucemiante, anticancerígena, antiviral y propiedades inmunomoduladoras³⁷.

³⁶ Pretorius, E.; Marx, J. *Envir. Toxic. Pharm.*, **2006**, *21*, 331.

³⁷ Bekkouche, K.; Daali, Y.; Cherkaoui, S.; Veuthey, J.; Christen, P. *Phytochemistry*, **2001**, *58*, 455.



Los **fitoesteroides** y en particular las **withanolidas** han llegado a ser considerados como marcadores taxonómicos de la familia Solanaceae. Existen numerosos trabajos científicos sobre este tipo de metabolitos y se han descrito más de 300 withanolidas aisladas generalmente, pero no exclusivamente, de especies de solanáceas³⁸, de ahí que se haya planteado si considerarlas marcadores quimiotaxonómicos. Estos compuestos poseen una gran variedad de actividades biológicas, destacando su actividad antialimentaria, antiinflamatoria, antitumoral, inmunomoduladora y quimiopreventiva del cáncer^{39,40}. Como ejemplo de sus estructuras mostramos la de la withaferina A, primer compuesto aislado y caracterizado de este tipo en 1965 por Lavie y col.⁴¹ de la especie *W. somnifera*.



Así mismo, se han aislado algunos **terpenoides** en especies de Solanáceas, grupo de metabolitos secundarios con una gran diversidad estructural, que están formados por la repetición de una unidad de isopreno, que se unen entre sí, mediante una reacción “cabeza-cola”. Los monoterpenos están constituidos por dos unidades de isopreno (C_{10}), los sesquiterpenos están formados por tres unidades (C_{15}), los diterpenos por cuatro unidades (C_{20}) y los triterpenos por seis unidades de isopreno (C_{30}).

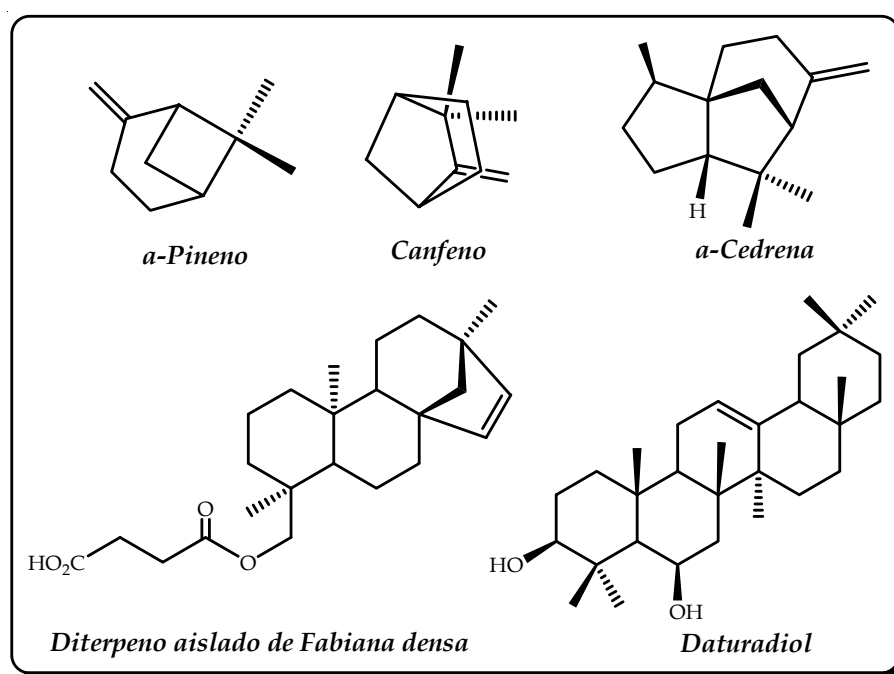
³⁸ Choudhary, M. I.; Yousuf, S.; Ahmad, S.; Ahmed, S.; Atta-ur-Raman. *Chem. Pharm. Bull.* **2004**, *52*, 1358.

³⁹ Mesaik, M. A.; Zaheer-ul-Haq; Murad, S.; Ismail, Z.; Abdullah, N. R.; Gill, H. K.; Atta-ur-Raman; Yousaf, M.; Siddiqui, R. A.; Ahmad, A.; Choudhary, M. I. *Mol. Immunol.*, **2006**, *43*, 1855.

⁴⁰ Owais, M.; Sharad, K. S.; Shehbaz, A.; Saleemuddin, M. *Phytomedicine*, **2005**, *12*, 229.

⁴¹ Lavie, D.; Glotter, E.; Shvo, Y. *J. Org. Chem.*, **1965**, *30*, 7517.

Los **monoterpenos** son compuestos volátiles que forman parte de los aceites esenciales. Así, en un estudio comparativo de las sustancias volátiles de nueve especies del género *Nicotiana*, se aislaron ciento veinte y cinco compuestos, entre los cuales se encontraban un gran número de monoterpenos⁴² (ej. α -pineno, canfeno). Así mismo, del estudio de los aceites esenciales de distintas especies del género *Nicotiana*, se aislaron diversos **sesquiterpenos**, entre ellos la α -cedrena. Los **diterpenos** son poco frecuentes en esta familia; se han aislado algunos metabolitos diterpénicos del exudado de *Fabiana densa*, a los que se les ha asociado la actividad antimicrobiana que presenta dicho extracto⁴³. Los **triterpenos** sólo se han obtenido de unas pocas especies de esta familia; se han purificado diversos triterpenos con esqueleto de oleano, como es el daturadiol de la especie *Datura fastuosa*⁴⁴.



En el género *Withania* son más frecuentes los diterpenos y triterpenos, menos abundantes los sesquiterpenos y no existen referencias bibliográficas de monoterpenos. Como ejemplo de diterpenos se encuentran los alcaloides diterpénicos aislados de *W. coagulans* en un estudio dirigido hacia la búsqueda de antifúngicos llevado a cabo por Atta-Ur-Raman y col.⁴⁵. Entre los triterpenos aislados de especies de *Withania* se

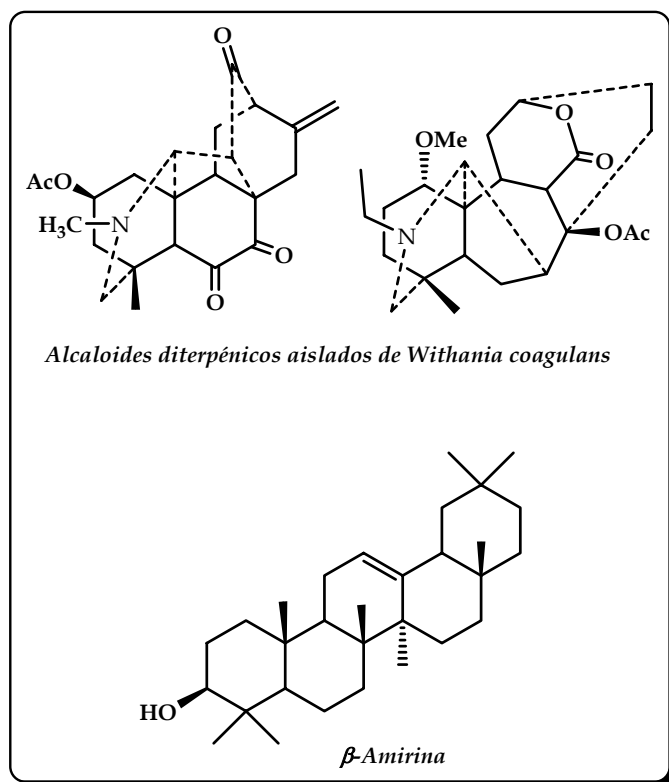
⁴² Raguso, R. A.; Levin, R. A.; Foose, S. A.; Holmberg, M. W.; McDade, L. A. *Phytochemistry*, **2003**, 63, 265.

⁴³ Eranzo, S.; Zaldivar, M.; Delporte, C.; Backhouse, N.; Tapia, P.; Belmonte, E.; Delle Monarche, F.; Negrete, R. *Planta Med.*, **2002**, 68, 361.

⁴⁴ Ahmad, M.; Hai, M. A.; Khaleque, A.; Mian, M. A.; Wahed; Safiullah, M. J. *Bangl. Acade. Scien.*, **1977**, 1, 71.

⁴⁵ Atta-Ur-Raman; Choudhary, M. I. *Turk. J.f. Chem.*, **1997**, 21, 13.

encuentra la β -amirina, un triterpeno con esqueleto de oleano aislado de *W. somnifera*⁴⁶.

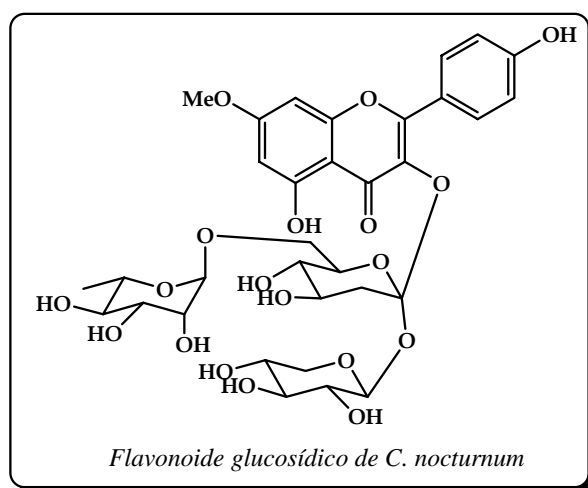


Los **flavonoides** se caracterizan por poseer una amplia gama de actividades biológicas, entre las que destacan la actividad antiinflamatoria, antioxidante, antialérgica, hepatoprotectora, antivírica, antiparasitaria, anticarcinogénica y como revertidores de la multiresistencia a fármacos⁴⁷. Estos compuestos son muy abundantes en el género *Cestrum*; se pueden encontrar glucosilados y ejemplo de ello son los flavonoides glucosídicos aislados de *C. nocturnum*, que poseen una marcada actividad citotóxica⁴⁸.

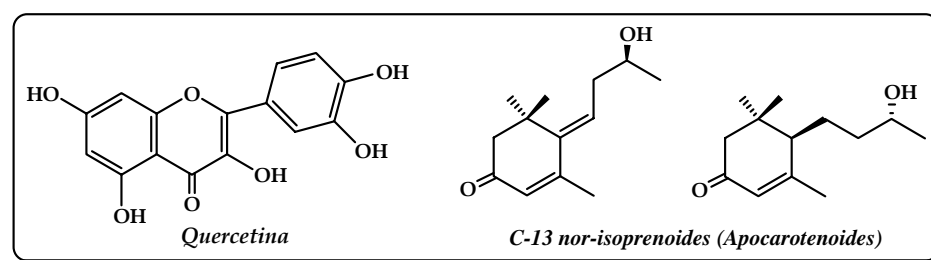
⁴⁶ Abou-Douh, A. M.; Ahmad, M. *Archiv der Pharmazie*, **2002**, 335, 267.

⁴⁷ Perez-Victoria, J. M.; Di Pietro, A.; Barron, D.; Ravelo, A. G.; Castanys, S.; Gamarro, F. *Curr. Drug Targets*, **2003**, 3, 311.

⁴⁸ Mimaki, Y.; Watanabe, K.; Ando, Y.; Sukama, C.; Sashida, Y.; Furuya, S.; Sakagami, H. *J. Nat. Prod.*, **2001**, 64, 17.



Este tipo de metabolitos son poco frecuentes en el género *Withania* y suelen ser constituyentes de los pigmentos responsables de los colores de las flores, hojas y frutos. Un ejemplo de flavonoide aislado de este género es la quercetina, una flavona a la que se le atribuyen numerosas actividades biológicas y que ha sido aislada de las raíces y hojas de la especie *W. somnifera*⁴⁹.



En la familia Solanaceae también son comunes los compuestos C-13 *nor*-isoprenoides, productos con 13 átomos de carbono, también llamados **apocarotenoides**, ya que se producen por ruptura oxidativa de carotenoides, también frecuentes en esta familia, catalizada por una oxigenasa. Estos *nor*-isoprenoides son los responsables de la actividad alelopática de las especies de la familia Solanaceae⁵⁰.

⁴⁹ Kandil, F. E.; El Sayed, N. H.; Abou-Douh, A. M.; Isaac, M. S.; Mabry, T. *Phytochemistry*, **1994**, 37, 1215.

⁵⁰ D'Abrosca, B.; DellaGreca, M.; Florentino, A.; Monaco, P.; Oriano, P.; Temussi, F. *Phytochemistry*, **2004**, 65, 497.



2. Objetivos

2. Objetivos

Nuestro grupo de investigación trabaja en la búsqueda de nuevos metabolitos secundarios de origen vegetal con actividad biológica. Dentro de esta línea de investigación, el presente trabajo se enmarca dentro de un proyecto sobre el estudio fitoquímico de especies de la flora canaria y la evaluación de las actividades biológicas de los metabolitos aislados de éstas. Nuestra investigación se centra en la familia Solanaceae, basándose en la gran diversidad de géneros de esta familia que existen en Canarias, el uso en la medicina popular canaria de especies de esta familia botánica y en antecedentes bibliográficos que describen productos con actividad citotóxica, antiinflamatoria, inmunosupresora, antialimentaria e insecticida, entre otras.

Estos antecedentes han incrementado nuestro interés en el estudio de especies de esta familia, con los objetivos que se concretan a continuación:

- Revisión bibliográfica de los metabolitos aislados de especies del género *Withania* y sus actividades farmacológicas.
- Evaluación de la actividad biológica de los extractos de hojas y tallos de *Withania aristata*: actividad antimicrobiana y actividad citotóxica.
- Aislamiento de los metabolitos secundarios de hojas y tallos de *Withania aristata*.
- Elucidación estructural de los metabolitos aislados, mediante técnicas de RMN y dicroísmo circular para la determinación de configuraciones absolutas.
- Evaluación de la actividad biológica de los metabolitos aislados: actividad antimicrobiana, actividad citotóxica, actividad inmunomoduladora, actividad alelopática y actividad antimalárica.
- Desarrollar alternativas que nos permitan obtener por semisíntesis aquellos metabolitos que resulten activos *in vitro* y de los que no dispongamos de

cantidad suficiente para su evaluación *in vivo*, utilizando como producto de partida compuestos comerciales o que los hayamos obtenido en mayor cantidad de la planta.

- Preparación de derivados al objeto de completar el estudio de la relación estructura-actividad de las withanolidas como citotóxicos, antimicrobianos e inmunomoduladores.



3. Descripción botánica, recolección, extracción y fraccionamiento cromatográfico de *Withania aristata*

3. Descripción botánica, recolección, extracción y fraccionamiento cromatográfico de *Withania aristata*

3.1. Descripción botánica

3.1.1. Familia Solanaceae

Hierbas anuales o perennes, rara vez matas, arbustos o pequeños árboles. Hojas alternas, pecioladas, simples, sin estípulas. Flores pentámeras, hermafroditas, solitarias, o en inflorescencias. Cáliz con lóbulos soldados, persistente, generalmente acrescente y protegiendo al fruto maduro. Corola rotácea o infundibuliforme. Androceo con cinco estambres libres, epipétalos, alternando con los lóbulos de la corola. Ovario supero, bilocular, con varios primordios seminales por cavidad, con un estilo; estigma capitado o bilocado. Fruto en baya o cápsula.

3.1.2. Género *Withania* Pauquy, Diss. Bellad. 14 (1824)

Dedicado al paleontólogo escocés H.T.M. Witham (1779-1818), se diferencia de otros géneros incluidos en esta familia en que son arbustos sin espinas y hojas enteras, alternas, pecioladas, escasamente tomentosas en el envés, con pelos simples, flores en racimos axilares, cáliz ampliamente campanulado, pentadentado, acrescente en la fructificación, corola infundibuliforme de 13-18 mm y estambres insertos hacia la base de la corola. Estigma capitado y fruto en baya.

Se han descrito alrededor de veintitrés especies del género. *Withania somnifera* (L.) Dunal in A. DC. es una de las especies estrechamente relacionadas con el taxón estudiado. Distribuida en Canarias, en las islas de La Palma, La Gomera, Tenerife y Gran Canaria y conocida como “ashwagandha” en la medicina Ayurvédica de la India, tiene propiedades medicinales muy semejantes a *Withania aristata*. Aunque en la India también se emplea como afrodisíaco y se considera tan efectivo como el “ginseng” chino en el tratamiento de la impotencia masculina.

Otra de las especies incluidas en este género es *Withania frutescens* (L.) Pauquy, propia del sur y este de España y norte de África, se encuentra también en las islas de Gran Canaria y Fuerteventura.

3.1.3 Clasificación taxonómica

En la descripción de la clasificación taxonómica se ha decidido seguir el método de clasificación adoptado por V.H. Heywood¹, basado en el trabajo previo de G.L. Stebbins².

División	Magnoliophyta (Angiospermas)
Clase	Magnoliopsida (Dicotiledóneas)
Orden	Solanales
Familia	Solanaceae
Género	<i>Withania</i> Pauquy
Especie	<i>Withania aristata</i> (Aiton) Pauquy ³

3.1.4 *Withania aristata* (Aiton) Pauquy, *Diss. Bellad.* 15 (1824)

Nombre vulgar: orobal⁴, es un arbusto muy variable, que puede adoptar porte arbóreo aunque no supera los cuatro metros de altura. Presenta una corteza muy rugosa de color grisáceo y sus frágiles y quebradizas ramas forman un denso ramaje. Tiene hojas grandes, de ovadas a anchamente lanceoladas, de hasta catorce centímetros de largo, lustrosas y de color verde intenso, con pecíolos largos y alargados. Las flores se desarrollan en las axilas de las hojas, aisladas o en pequeños grupos, sobre pedúnculos más o menos largos. Son pequeñas, campaniformes, de color blanco verdoso y cáliz con cinco dientes largamente aristados. Posee unos frutos muy característicos, compuestos por una baya globular carnosa, en principio verde y posteriormente de color anaranjado, que se encuentra incluida en un receptáculo formado por el cáliz ensanchado y persistente de la flor, de color verde. La floración tiene lugar durante los meses de invierno y primavera⁵.

¹ Heiwood, V. H. *Flowering Plants of the World*. Oxford University Press., U.K., p. 335, 1978.

² Stebbins, G. L. *Flowering plants. Evolution above the Species Level*. Arnold Press London., U.K., p.399, 1974.

³ Acebes Ginoves, J. R. Pteridophyta, Spermatophyta. In: I. Izquierdo, et al. (eds.), 2004. *Lista de especies silvestres de Canarias (hongos, plantas y animales terrestres)*. Consejería de Medio Ambiente y Ordenación Territorial. Gobierno de Canarias, p. 500, 2004.

⁴ Cabrera Pérez, M. A. *Visita. Flora autóctona de las Islas Canarias*, Ed. Everest, León, p. 191, 2004.

⁵ Bramwell, D.; Bramwell, Z. *Flores silvestres de las Islas Canarias*. Ed. Rueda, Madrid, 4ª Ed., p. 437, 2001.



Se trata de una especie intensamente utilizada por la población debido al gran número de aplicaciones medicinales que se le atribuyen. Sus hojas, frutas y corteza se usan localmente como diurético, para el tratamiento de la hipertensión, como antirreumático y como narcótico suave para tratar el insomnio. En forma de té se aplica directamente sobre los músculos para los problemas reumáticos, ó se puede añadir al agua del baño para remojar los miembros doloridos y cansados. Tiene propiedades analgésicas y anestésicas suaves, que probablemente son debidas a la presencia de alcaloides y lactonas esteroidales como las withaferonas y withaferinas, compuestos que, por otra parte, impiden que los insectos se alimenten de la planta. Además, posee propiedades anticancerígenas, ya que reduce el crecimiento de los tumores al inhibir la mitosis celular. Así, sus propiedades la han hecho especialmente indicada para aliviar problemas reumáticos, combatir el insomnio, la otitis, problemas oculares, estreñimiento y favorecer la micción. Se emplean las infusiones de las hojas y la corteza que, una vez hervidas, se dejan macerar durante al menos una semana⁶.

3.1.5 Distribución de la especie *Withania aristata*

Se encuentra presente en todas las islas del archipiélago, excepto en Fuerteventura y Lanzarote. Es una especie ampliamente distribuida por las zonas más secas de las islas, pero está en peligro de sobreexplotación como planta medicinal en algunos lugares³.

⁶ Bramwell, D. *Plantas medicinales de las Islas Canarias*. Ed. Rueda, Madrid, p. 152, 2004.



Figura 3.1. Mapa de distribución de *Withania aristata*

3.2. Recolección del material vegetal

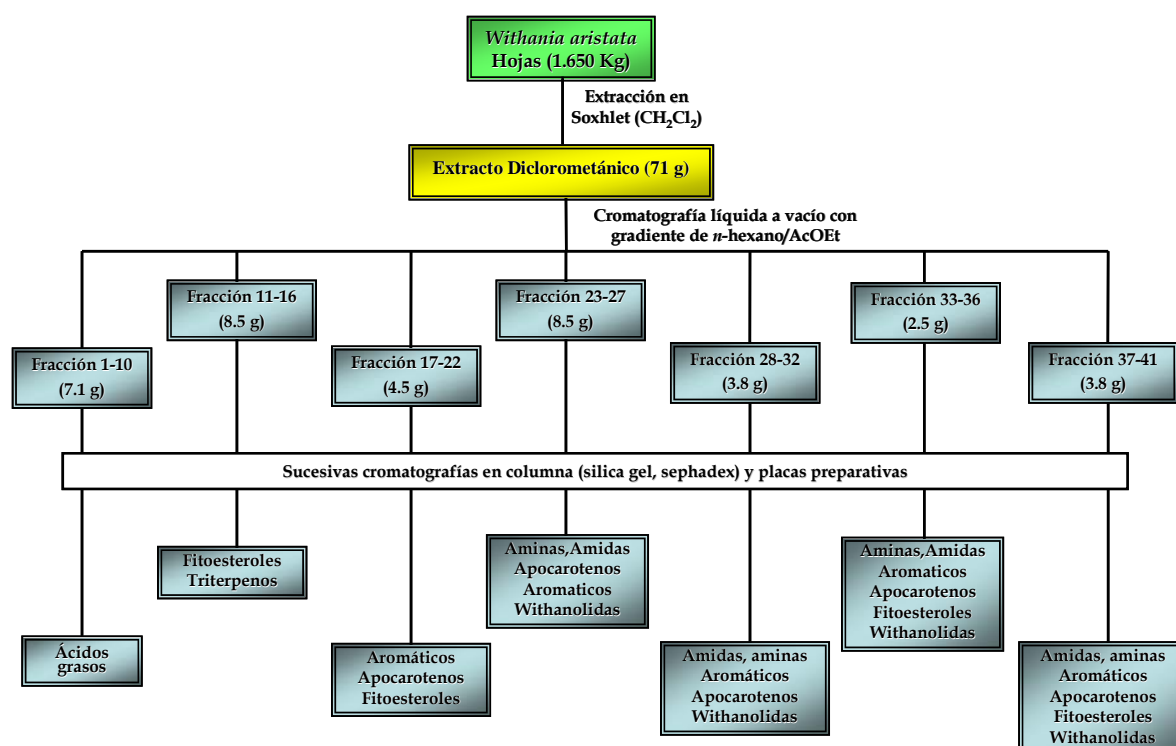
El material vegetal objeto de nuestro estudio fue recolectado en mayo de 2005, en el municipio de Icod de los Vinos (Tenerife, Islas Canarias, España), a unos 150 m.s.n.m. en la pista que conduce a la Punta de Juan Centellas. En dicha recolección además de algunos compañeros del laboratorio, nos acompañó para identificar la especie la botánica M^a Leticia Rodríguez Navarro.

3.3. Extracción y fraccionamiento cromatográfico

3.3.1 Extracción en diclorometano de las hojas de *W. aristata* y fraccionamiento

Las hojas de *W. aristata* (1,65 Kg) finamente divididas se extrajeron con diclorometano por medio de una extracción en continuo, en un Soxhlet, hasta agotamiento, rindiendo, tras evaporar el disolvente, 71 g de extracto diclorometánico. El extracto fue fraccionado mediante cromatografía en columna a vacío sobre gel de sílice, usando como eluyente una mezcla de *n*-hexano-acetato de etilo de polaridad creciente. De esta cromatografía se obtuvieron 45 fracciones de 500 ml cada una, que se reunieron en grupos según su similitud presentada en el análisis de la cromatografía en capa fina. Los diferentes grupos se sometieron a sucesivas cromatografías sobre gel de sílice en

columnas (CH₂Cl₂-acetona), cromatografías de Sephadex (*n*-hexano-cloroformo-metanol) y cromatografías en placa preparativa usando como eluyentes mezclas de *n*-hexano, acetato de etilo, acetona, diclorometano, éter dietílico, dioxano y metanol. Así, de manera general, se obtuvieron fitoesteroles, withanolidas, apocarotenoides, amidas y aminas. En la parte experimental de cada capítulo de la presente Memoria de Tesis, se detalla el tipo de metabolito y las cantidades aisladas.

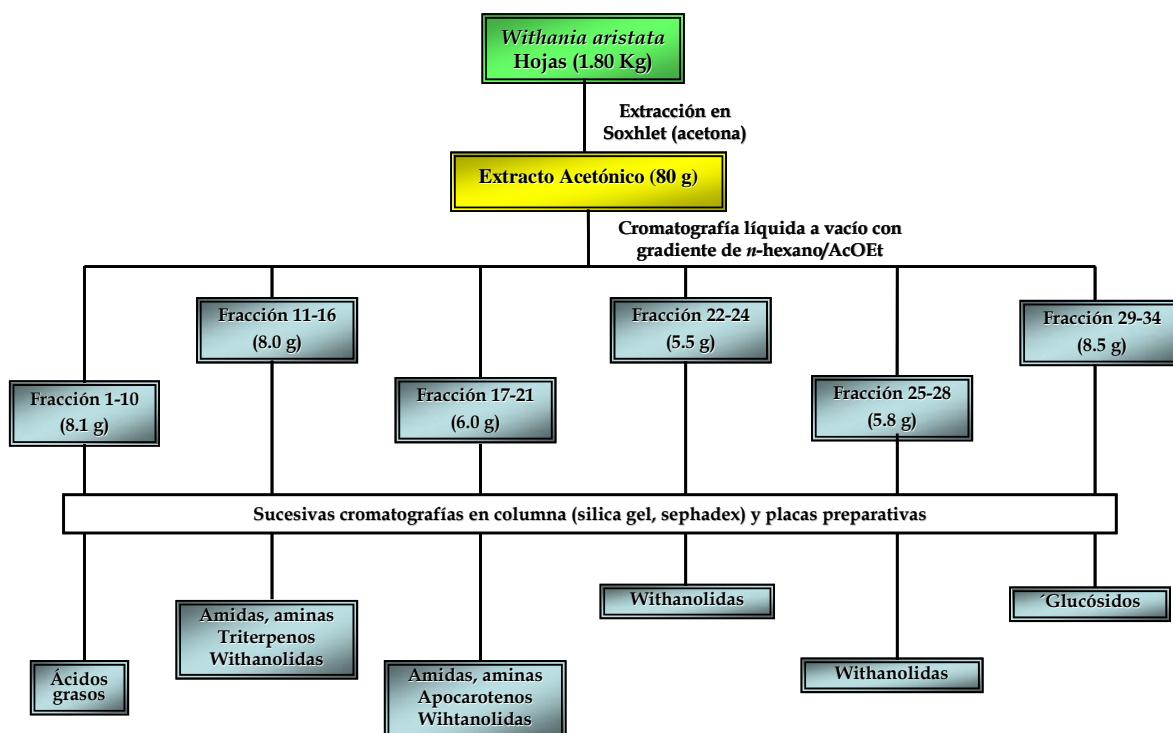


Esquema: Extracción y fraccionamiento cromatográfico del extracto diclorometánico de hojas de *W. aristata*

3.3.1 Extracción en acetona de las hojas de *W. aristata* y fraccionamiento

Con el fin de obtener mayor cantidad de withaferina A para realizar modificaciones estructurales y llevar a cabo un estudio de la relación estructura actividad más extenso, procedimos a extraer las hojas de *W. aristata* (1.8 Kg) con acetona mediante una extracción en Soxhlet, hasta agotamiento, rindiendo, tras evaporar el disolvente, 80 g de extracto acetónico. El extracto fue fraccionado mediante cromatografía en columna a vacío sobre gel de sílice, usando como eluyente una mezcla de *n*-hexano-acetato de etilo de polaridad creciente. De esta cromatografía se obtuvieron 34 fracciones de 500 ml cada una, que se reunieron en grupos según su similitud presentada en el análisis de la cromatografía en capa fina. Los diferentes grupos se sometieron a sucesivas

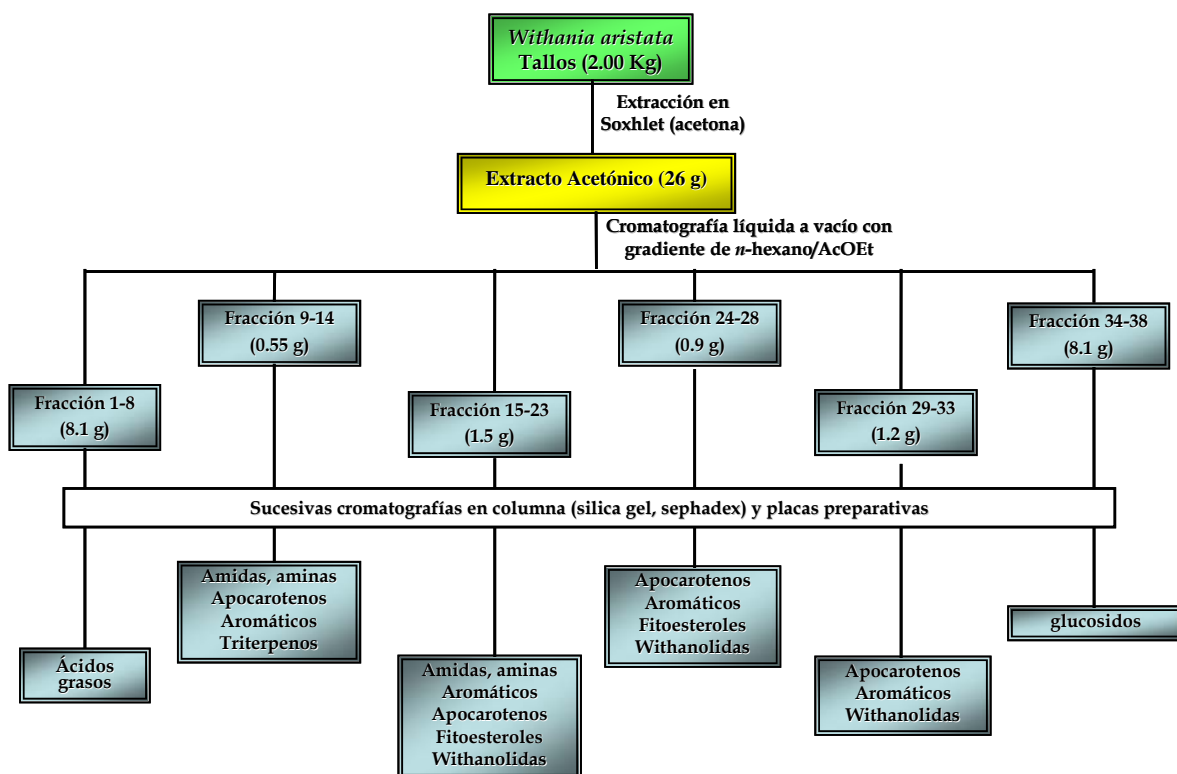
cromatografías, usando las técnicas cromatográficas ya mencionadas en el caso anterior. Se obtuvieron, de forma general, el mismo tipo de compuestos que en el extracto de diclorometano. En la parte experimental de cada capítulo de la presente Memoria, se detalla el tipo de metabolito y las cantidades aisladas.



Esquema: Extracción y fraccionamiento cromatográfico del extracto acetónico de hojas de *W. aristata*

3.3.3 Extracción en acetona de los tallos de *W. aristata* y fraccionamiento:

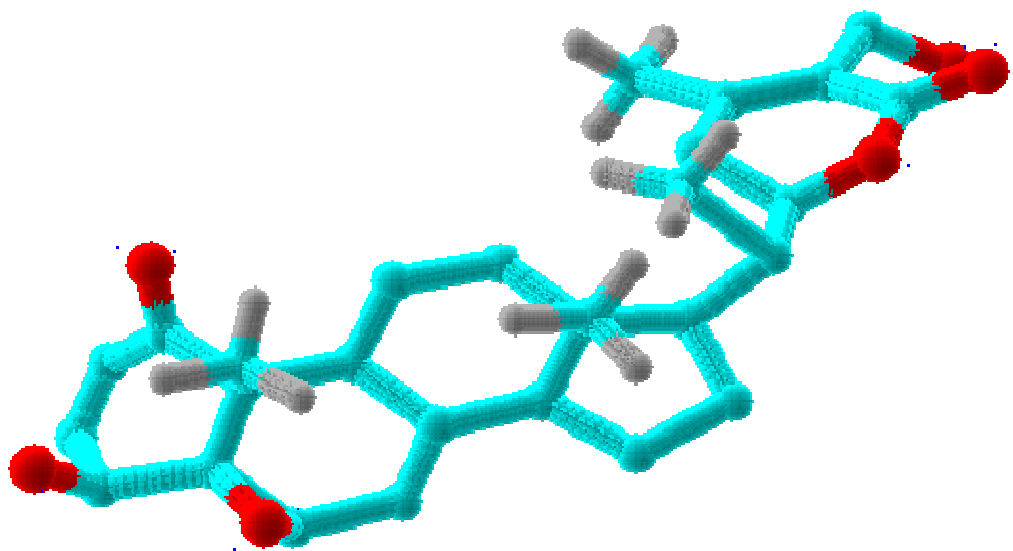
Los tallos de *W. aristata* (2.00 Kg) triturados se extrajeron por medio de una extracción en continuo con acetona, en un Soxhlet, hasta agotamiento, rindiendo, tras evaporar el disolvente, 26 g de extracto acetónico. El extracto fue fraccionado mediante cromatografía en columna a vacío sobre gel de sílice, usando como eluyente una mezcla de *n*-hexano-acetato de etilo de polaridad creciente. De esta cromatografía se obtuvieron 38 fracciones de 250 ml cada una, que se reunieron, al igual que en los casos anteriores, según su similitud presentada en el análisis de la cromatografía en capa fina. Los diferentes grupos se sometieron a sucesivas cromatografías, usando las técnicas cromatográficas ya mencionadas en los casos anteriores, obteniéndose el mismo tipo de compuestos que en las hojas. En la parte experimental de cada capítulo de la presente Memoria, se detalla el tipo de metabolito y las cantidades aisladas.



Esquema: Extracción y fraccionamiento cromatográfico del extracto acetónico de tallos de *W. aristata*



4. Estudio fitoquímico de *Withania aristata*



4.1. Withanolidas

4.1.1. Introducción

4.1.1.1. Distribución de withanolidas

El nombre de withanolida viene de “withan” del género *Withania* y “olida” que es el término químico para una lactona. La primera withanolida aislada y caracterizada fue withaferina A, descrita en 1962 por Lavie¹ de *Withania somnifera* L. Dunal y tres años más tarde por Kupchan² de *Acnistus arborecens* L. Schlecht. Lavie³ definió en 1965 a las withanolidas como un tipo de esteroides caracterizado por tener en su estructura una lactona, generalmente α,β -insaturada sobre el C-17 del esqueleto de esterano.

En la actualidad, se han descrito más de 400 withanolidas aisladas principalmente, aunque no exclusivamente, de géneros de la familia Solanaceae, encontrándose en hojas, tallos y raíz, y de forma menos frecuente en los frutos. Así, se han aislado withanolidas de alrededor de 58 especies de 22 géneros distintos de esta familia y en concreto se encuentran exclusivamente en la subfamilia *Solanoideae*, siendo las tribus *Solaneae* y *Jaboroseae* las más estudiadas dentro de esta subfamilia⁴.

Las withanolidas o compuestos relacionados también se han aislado de otras familias botánicas, como por ejemplo *Cassia siamea* (Leguminosae)⁵, *Ajuga parviflora* (Labiatae)⁶, *Tacca plantaginea* y *T. chantrieri* (Taccaceae)⁷ y de un coral marino, *Minabea sp*⁸.

En las Islas Canarias existen tres especies del género *Withania* de las que se han aislado este tipo de metabolitos, *Withania aristata*, nativa de las islas más occidentales, El Hierro, La Gomera, La Palma, Tenerife y Gran Canaria, *W. frutescens*, presente en Gran Canaria y Fuerteventura y *W. somnifera* que se encuentra en La Palma, La Gomera, Tenerife y Gran Canaria.

¹ Yarden, A.; Lavie, D. *J. Chem. Soc.* **1962**, 2925.

² Kupchan, S. M.; Doskotch, R. W.; Bollinger, P.; McPhail, A. T.; Sim, G. A.; Renauld, J. A. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, 87, 5805.

³ Lavie, D.; Glotter, E.; Shvo, Y. *J. Org. Chem.*, **1965**, 30, 7517.

⁴ Eich, E. *Solanaceae and convolvulaceae: Secondary Metabolites*, Springer, Verlag Berlin Heidelberg, **2008**.

⁵ Srivastava, C.; Manickam, M.; Sinha-Bagchi, A.; Sinha, S. C.; Gupta, M.; Ray, A. B. *Nat. Prod. Sci.*, **1996**, 2, 9.

⁶ Khan, P. M.; Nawaz, H. R.; Ahmad, S.; Malik, A. *Helv. Chim. Acta*, **1999**, 82, 1423.

⁷ Yokusuka, A.; Yoshihiro, M.; Sashida, Y. *J. Nat. Prod.*, **2003**, 66, 876.

⁸ Mohamad, B. K.; Francis, J. S. *J. Org. Chem.*, **1988**, 53, 3926.

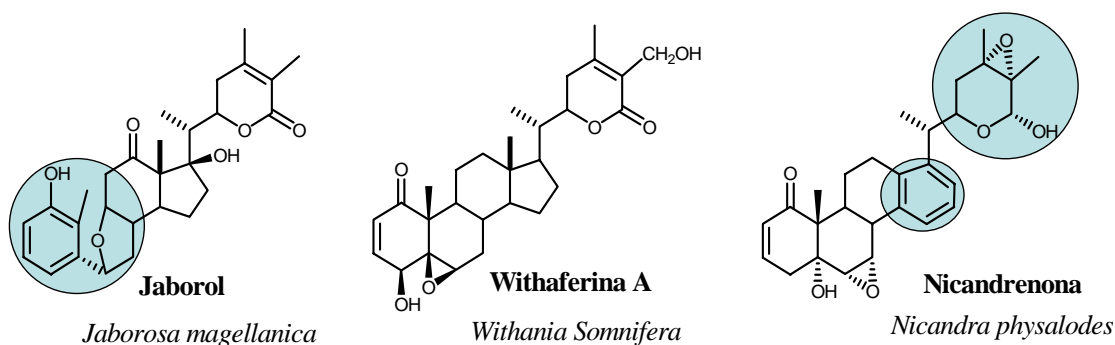
Géneros y especies de la familia Solanaceae que contienen withanolidas

Géneros	Especies
<i>Acnistus</i>	<i>A. arborescens</i>
<i>Brachistus</i>	<i>B. estramoniifolius</i>
<i>Browallia</i>	<i>B. viscosa</i>
<i>Datura</i>	<i>D. ferox</i> , <i>D. mentel</i> , <i>D. quersifolia</i> , <i>stramonium</i> , <i>D. fastuosa</i> , <i>D. tatura</i>
<i>Deprea</i>	<i>D. orinocensis</i> , <i>D. subtriflora</i> , <i>D. procumbens</i>
<i>Discopodium</i>	<i>D. penninervium</i>
<i>Dunalia</i>	<i>D. brachyacantha</i> , <i>D. solanaceae</i> , <i>D. tubulosa</i> , <i>D.australis</i>
<i>Eriolarynx</i>	<i>E. lorensis</i>
<i>Exodeconus</i>	<i>E. maritimus</i>
<i>Hyoscyamus</i>	<i>H. niger</i>
<i>Iochroma</i>	<i>I. australe</i> , <i>I. fuchsioides</i>
<i>Jaborosa</i>	<i>J. araucana</i> , <i>J. bergii</i> , <i>J. integrifolia</i> , <i>J. laciniata</i> , <i>J. leucotricha</i> , <i>J. magellanica</i> , <i>J. odonelliana</i> , <i>J. Rotacea</i> , <i>J. runcinata</i> , <i>J. sativa</i>
<i>Leucophysalis</i>	<i>L. viscosa</i>
<i>Lycium</i>	<i>L. barbarum</i> , <i>L. chinese</i>
<i>Nicandra</i>	<i>N. physalodes</i>
<i>Physalis</i>	<i>P. alkekengi</i> , <i>P. angulata</i> , <i>P. chenopodifolia</i> , <i>P. cinerascens</i> , <i>P. coztomats</i> , <i>P. curasavica</i> , <i>P. lanceifolia</i> , <i>P. minima</i> , <i>P. peruviana</i> , <i>P. philadelphica</i> , <i>P. pubescens</i> , <i>P. solanaceus</i> , <i>P. viscosa</i>
<i>Salpichroa</i>	<i>S. organifolia</i>
<i>Solanum</i>	<i>S. ciliatum</i> , <i>S. sisymbriifolium</i>
<i>Tubocapsicum</i>	<i>T. anomalum</i>
<i>Vassobia</i>	<i>V. breviflora</i> , <i>V. lorentzii</i>
<i>Withania</i>	<i>W. adpressa</i> , <i>W. aristata</i> , <i>W. coagulans</i> , <i>W. frutescens</i> , <i>W. obtusifolia</i> , <i>W. somnifera</i>
<i>Witheringia</i>	<i>W. coccoloboides</i> , <i>W. solanacea</i>

4.1.1.2. Clasificación y estructura de withanolidas

Las withanolidas poseen un esqueleto de ergostano de 28 átomos de carbono, con un anillo δ -lactónico en la cadena lateral entre los carbonos C-22 (cuya configuración suele ser *R*) y C-26, anillo que generalmente se encuentra insaturado en el C-24 y con un alto nivel de oxidación en los anillos del esqueleto esteroidal. Así, son frecuentes las withanolidas que contienen un sistema 2-en-1-ona y funcionalización en los carbonos C-5 y C-6, con un epóxido o un doble enlace^{9,10}.

El término withanolida ha sido usado de forma confusa, debido a que algunos autores lo han aplicado indiscriminadamente para otros compuestos más complejos que no se corresponden con la definición dada anteriormente y que en realidad sólo es aceptable para los compuestos más simples y abundantes, los del tipo de la withaferina A, por ello, se ha comenzado a definir estas moléculas estructuralmente relacionadas, pero más complejas con otros nombres como: withaphysalinas, physalinas, nicandrononas, jaboroles, ixocarpalactonas, perulactonas, acnistinas, etc. Actualmente, el nombre aceptado para este tipo de compuestos es el de withaesteroides.



En base a estas consideraciones se puede hacer una clasificación de withaesteroides en dos grandes grupos:

4.1.1.2.1. Metabolitos con esqueleto withanolida no modificado:

Este grupo se divide a su vez en dos subgrupos:

⁹ Glotter, E. *Nat. Prod. Rep.* **1991**, 415.

¹⁰ Veleiro, A. S.; Oberti, J. C.; Burton, G. *Studies in Natural Products Chemistry (part L), Bioactive Natural Products*. Atta-Ur-Raman Ed., Elsevier Science Publishers, Amsterdam, Vol. 32, p. 1019, **2005**.

➤ **Esqueleto withanolida no modificado y con la cadena lateral en β :**

Este es el grupo que cuenta con un mayor número de compuestos, biosintetizan este tipo de metabolitos los géneros *Withania*, *Datura*, *Dunalia* y *Lycium*. Un ejemplo de este tipo de compuestos es la withaferina A.

➤ **Esqueleto withanolida no modificado y con la cadena lateral en α :**

Este grupo es menos frecuente aunque no raro, presentando siempre un grupo hidroxilo en posición 17β . Estos compuestos pueden ser encontrados en géneros como *Withania* y *Jaborosa*, siendo un ejemplo la withanolida E.

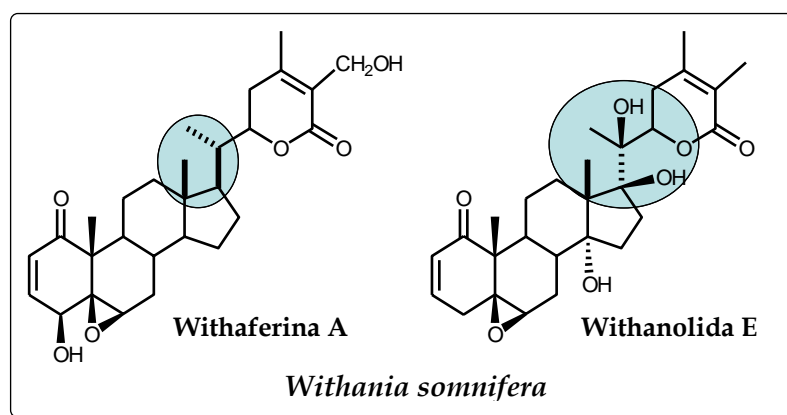


Figura 4.1.1. Withanolidas con el esqueleto no modificado y variaciones en la cadena lateral

4.1.1.2.2. Metabolitos con esqueleto withanolida modificado:

➤ **Withanolidas con anillos aromáticos:**

Jaborol¹¹, una B-secowithanolida aislada de *Jaborosa magellanica* y nicandrenona¹², obtenida de *Nicandra physalodes*, son dos ejemplos de withaesteroides con un anillo aromático en su estructura, A y D, respectivamente.

¹¹ Fajardo, V.; Freyer, A. J.; Minard, R. D.; Shama, M. *Tetrahedron*, **1987**, 43, 3875.

¹² Begley, M. J.; Crombie, L.; Ham, P.J.; Whiting, D. A. *J. Chem. Soc., Perkin Transactions 1*, **1976**, 3, 304.

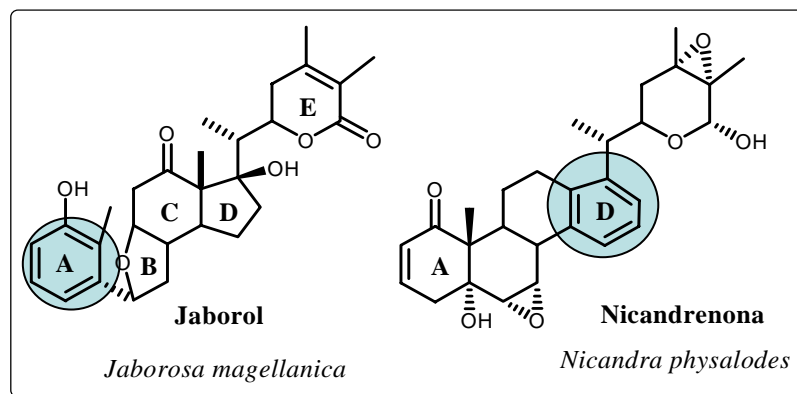


Figura 4.1.2. Withanolidas con anillos aromáticos

➤ **Withanolidas funcionalizadas en C-18:**

La withaphysalina A, metabolito aislado de *Physalis minima*, presenta un esqueleto modificado, en el cual el C-18 se encuentra oxidado a un grupo carbonilo. También se han aislado un gran número de 18-*nor*withanolidas de *Deprea subtriflora*⁷, conocidas como subtrifloralactonas y que han perdido el metilo en posición 18.

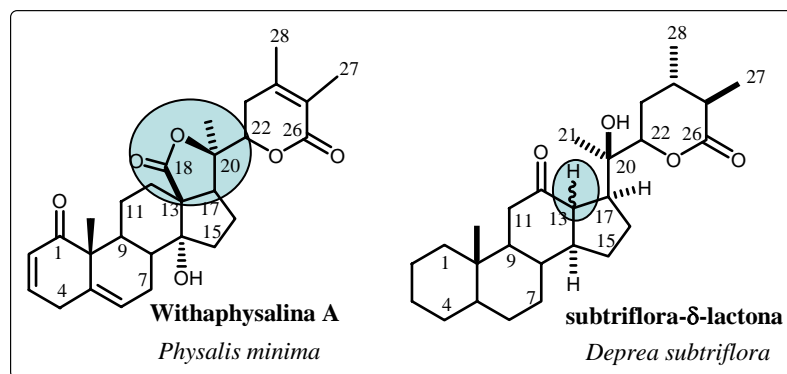


Figura 4.1.3. Withanolidas funcionalizadas en C-18

➤ **13,14-Secowithanolidas:**

Estos compuestos se forman por la ruptura oxidativa del enlace entre los carbonos C13-C14. Son ejemplos de este tipo de compuestos las withaphysalinas y physalinas, aisladas de distintas especies de *Physalis*, en cuyos casos se produce la ruptura oxidativa y se forma posteriormente un anillo epóxido entre las posiciones C14-C17, característico de las physalinas. Estos compuestos poseen una γ -lactona adicional al funcionalizarse el C-18.

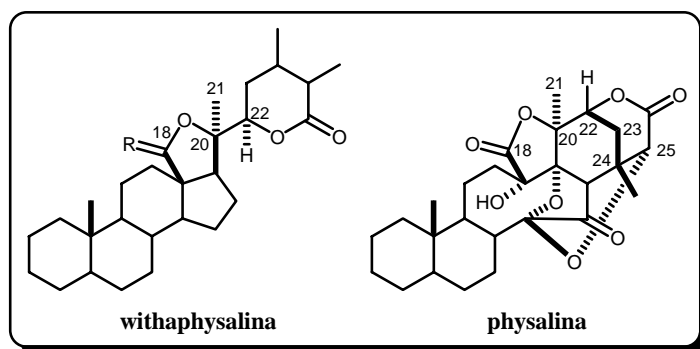


Figura 4.1.4 Withaphysalina y physalina aisladas de especies del género *Physalis*

➤ **Withanolidas funcionalizadas en C-21:**

Las acnistinas se forman por la oxidación del Me-21 a alcohol, el cual puede ser transformado en un buen grupo saliente en forma de éster fosfato. Posterior ataque de una molécula de agua al doble enlace en C-25 y formación de un nuevo enlace C21-C24, al desplazarse el buen grupo saliente, da el sistema bicíclico de las acnistinas¹³. Pertenecen a este subgrupo también las withajardinas, withametelinas y sativolidas.

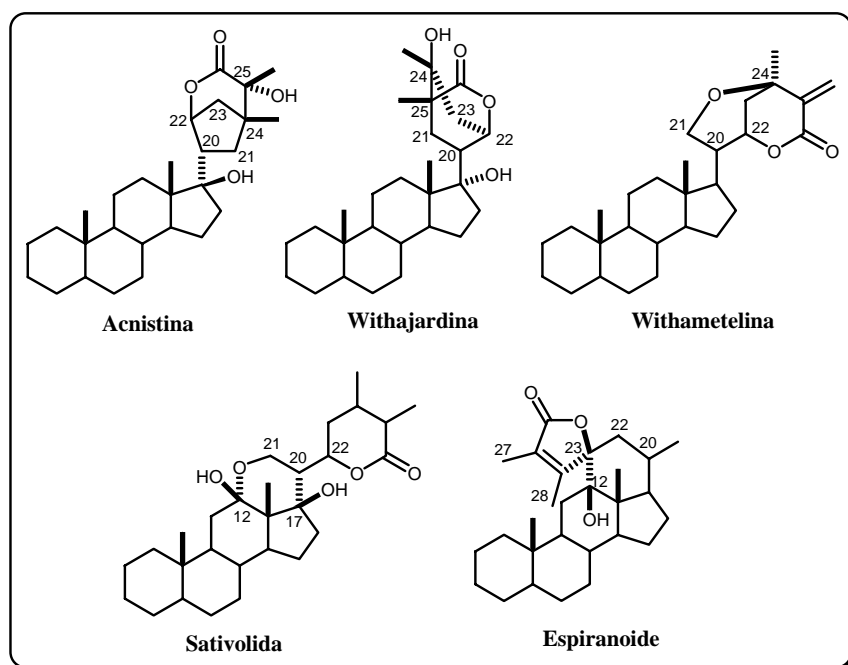


Figura 4.1.5. Ejemplos de withanolidas funcionalizadas en C-21 y tipo espiranoide

¹³ Glotter, E. *Nat. Prod. Rep.*, **1991**, *8*, 415.

➤ **Withanolidas con características espiranoides:**

Un gran número de estas estructuras han sido aisladas del género *Jaborosa*, y presentan un nuevo ciclo en el carbono C-12, como es el caso de la jaborosalactona 10, aislada de *J. odenellana*.

➤ **Withanolidas con heteroátomos:**

Clorowithanolidas: Los metabolitos secundarios con cloro en su estructura no son muy comunes en del reino vegetal, sin embargo, es bastante usual encontrar withanolidas con átomos de cloro en su esqueleto, sobre todo en las posiciones C-5 α y C-6 β , donde suele estar ubicado un epóxido.

Tiowithanolidas: Se han encontrado en la raíz de *Physalis peruviana* compuestos con átomos de azufre, donde se forma un heterociclo de siete miembros entre las posiciones C-4 y C-6. Los autores¹⁴ asumen su biogénesis a partir de la 4 β -hidroxewithanolida E, que sufre una condensación con α -mercaptoacetaldehído (O=CH-CH₂-SH) que deriva de la *L*-cisteína. También se ha aislado de la raíz de *Withania somnifera* un dímero con dos unidades de withaferina A unidas por un átomo de azufre entre los carbonos C-6 α ¹⁵ de ambas subunidades. Recientemente se han descrito 3 β -*O*-sulfatowithanolidas, aisladas así mismo de *W. somnifera*¹⁶.

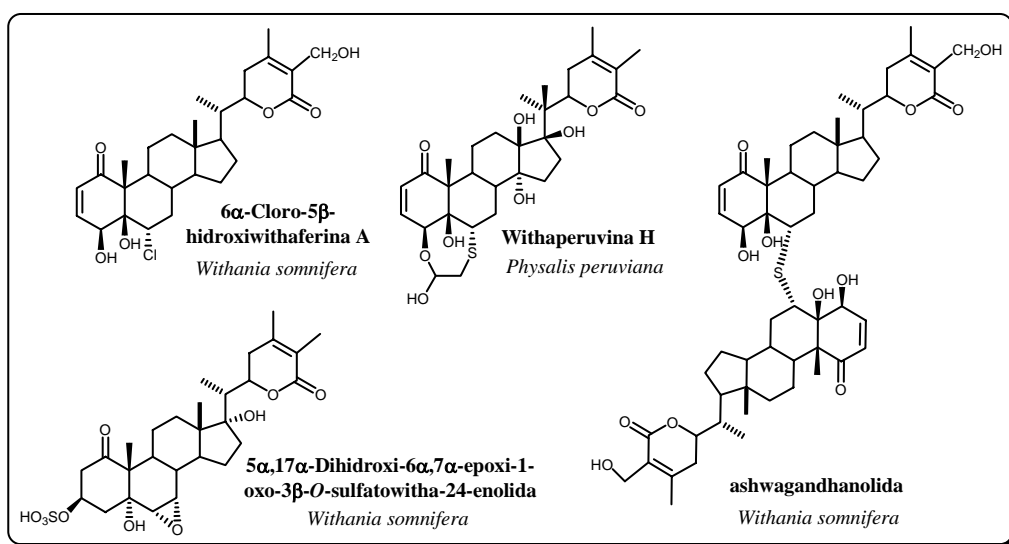


Figura 4.1.6. Ejemplos de withanolidas con heteroátomos

¹⁴ Oshima, Y.; Hikino, H.; Sahai, M.; Ray, A. B. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1989**, 10, 628.

¹⁵ Misra, L.; Lal, P.; Sangwan, R. S.; Sangwan, N. S.; Uniyal, G. C.; Tuli, R. *Phytochemistry*, **2005**, 66, 2702.

¹⁶ Subbaraju, G. V.; Vanisree, M.; Rao, C. V.; Sivaramakrishna, C.; Sridhar, P.; Jayaprakasam, B.; Nair, M. *G. J. Nat. Prod.*, **2006**, 69, 1790.

➤ **Withanolidas glicosiladas:**

Las primeras withanolidas glicosiladas fueron aisladas en 1981 de las hojas de *lochroma australe* sub. Nom. *Dunalia Australis* y se les denominó dunawithaninas¹⁷. Actualmente, existen numerosas referencias de éste tipo de compuestos, en los cuales los azúcares se encuentran en las posiciones 3 β -O y 27-O en aquellas withanolidas que presentaban una lactona, mientras que también se han aislado compuestos glicosilados en 26-O en withanolidas con un grupo lactol.

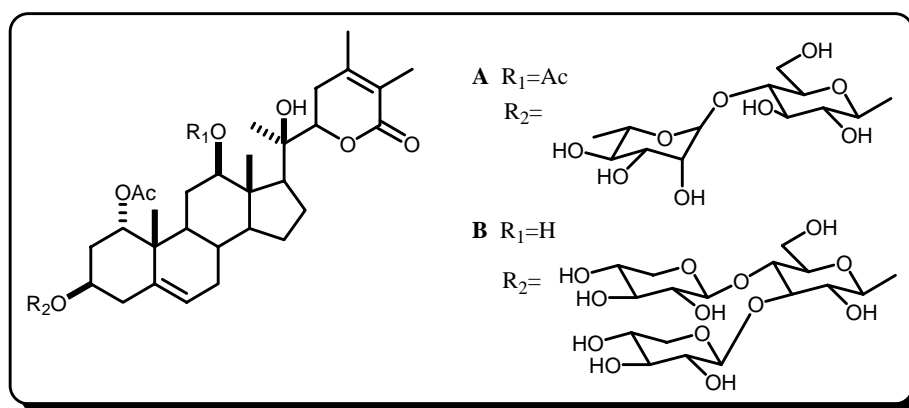


Figura 4.1.7 Dunawithaninas aisladas de *lochroma australe*

La gran variedad de withaesteroides que existen han hecho de este tipo de metabolitos, la clase esteroidal con mayor grado de diversidad estructural en lo concerniente al reino vegetal.

Algunos autores¹⁰ hacen una clasificación en función del anillo lactónico, withanolidas con una δ -lactona ó un anillo δ -lactol, que constituyen el grupo A y las withanolidas que poseen un anillo γ -lactónico, que forman el grupo B. La mayoría de las withanolidas conocidas pertenecen al grupo A, el cual puede a su vez ser dividido en once subgrupos: withanolidas con esqueleto no modificado, withaphysalinas, physalinas, acnistinas, withajardinas, withametelinas, sativolidas, subtriflora- δ -lactonas, withanolidas con el anillo D aromático, withanolidas con el anillo A aromático y withanolidas de tipo norbornano. Las withanolidas con un esqueleto no modificado son las más abundantes y son consideradas como posibles precursores de las demás withanolidas.

¹⁷ Adam, G.; Chien, N. Q.; Nguyen, H. K. *Naturwissenschaften*. **1981**, 68, 425.

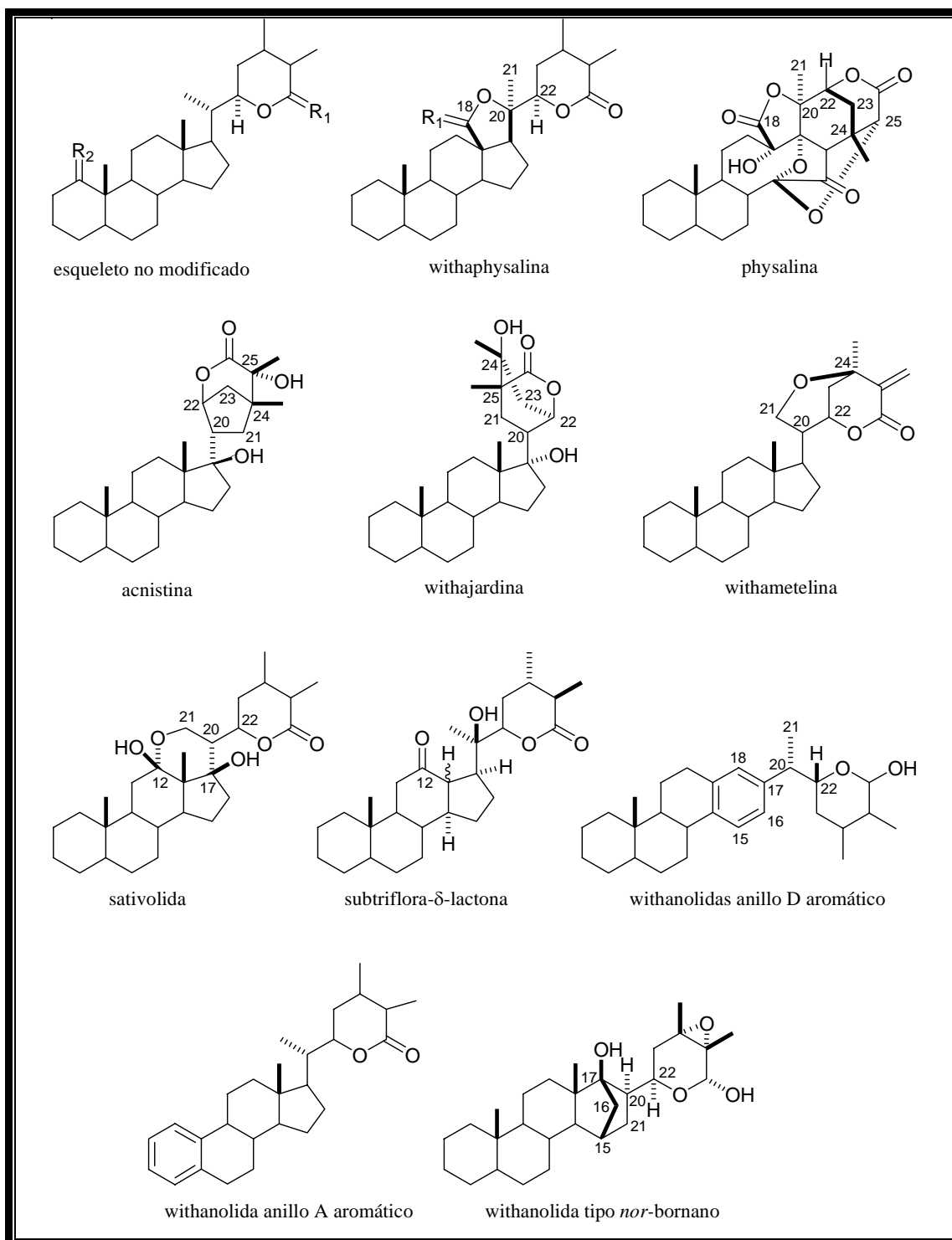


Figura 4.1.8. Estructuras generales de withanolidas con cadena lateral δ -lactona ó δ -lactol (grupo A) (R_1 , $R_2 = O$, H ó OH)

La presencia de una función oxigenada en C-23 conduce a la formación de una γ -lactona en la cadena lateral y da lugar a la withanolidas del grupo B, que pueden ser divididas en cinco subgrupos: espiranoides, trechonolidas, subtriflora- γ -lactonas, ixocarpalactonas y perulactonas¹⁰.

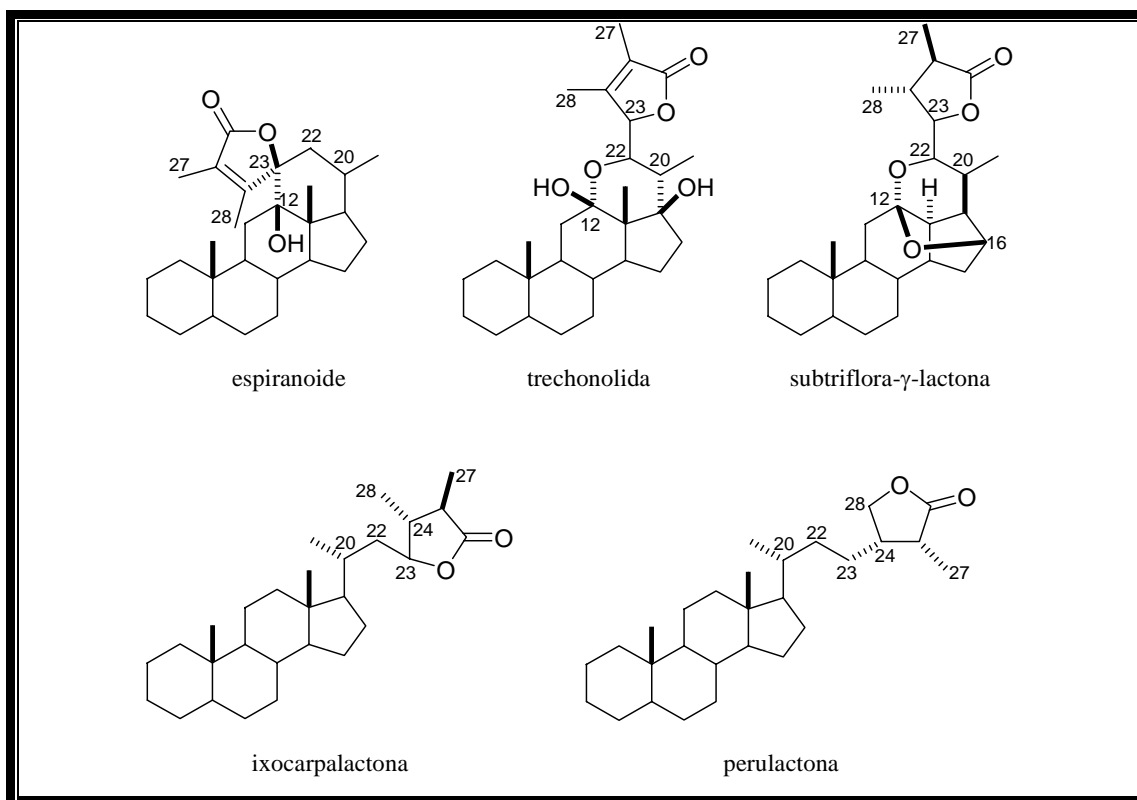


Figura 4.1.9. Estructuras generales de withanolidas con cadena lateral γ -lactona (grupo B)

4.1.1.3 Biogénesis de withanolidas

En general, los esteroides son sustancias ubicuas en el reino vegetal y comparten mucho de su estructura química con los triterpenos, ya que provienen de la misma ruta biosintética.

Presentan un esqueleto policíclico, formado por condensación de seis unidades de isopreno con bajo grado de insaturación y pueden considerarse como un tipo especial de terpenoides, con un esqueleto de ciclopentano-perhidrofenantreno con una cadena alquílica de ocho átomos de carbono sobre C-17, dos metilos en C-10 y C-13 y sin las sustituciones en C-4 (gem-dimetilo) y C-14 (metilo), características de los triterpenos en general¹⁸. Las withanolidas son lactonas esteroidales con un esqueleto de ergostano, que poseen 28 átomos de carbonos, funcionalizado en C-1, C-22 y C-26.

¹⁸ Kuklinshi, C. *Farmacognosia, Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*, Ed. Omega, Barcelona, 2000.

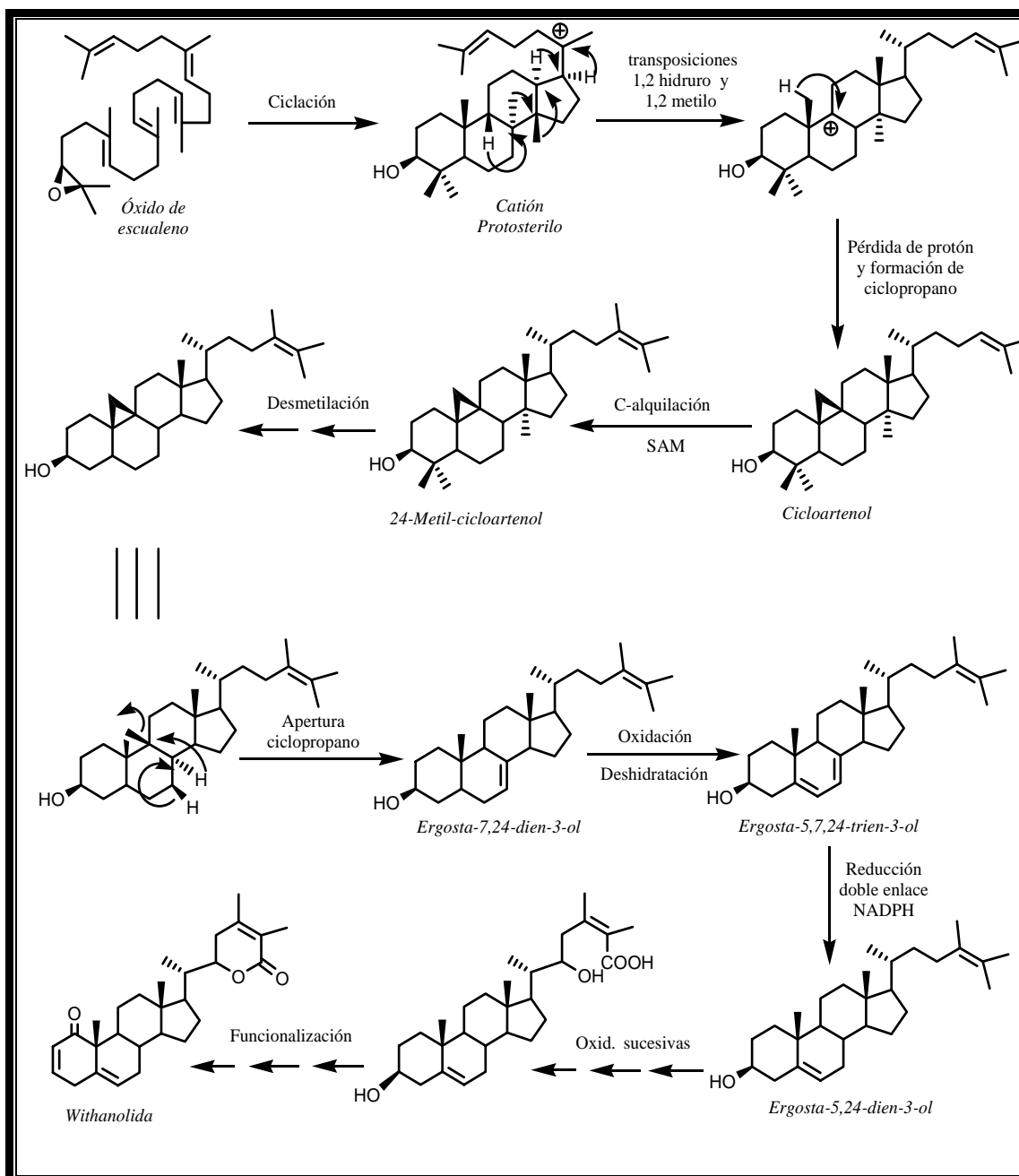


Figura 4.1.10. Biosíntesis de los esteroides con esqueleto de withanolida

La **biosíntesis de las withanolidas** sigue la ruta de los esteroides. Así, a partir del 2,3-óxido de escualeno, poli-isopreno de 30 carbonos¹⁹, y partiendo de una secuencia *silla-bote-silla-bote* para los anillos A-B-C-D, se genera el catión protoestero, con estas características conformacionales. Tras una serie de migraciones en cascada se genera un carbocatión en la posición C-9, que tras la pérdida de un protón del metilo sobre C-10 da lugar a la formación de un ciclopropano, generando el cicloartenol²⁰.

¹⁹ Bouvier, F.; Rahier, A.; Camara, B. *Prog. Lipid Res.*, **2005**, *44*, 357.

²⁰ Mirjalili, M. H.; Moyano, E.; Bonfill, M.; Cusido, R. M.; Palazon, J. *Molecules*, **2009**, *14*, 2373.

Alquilación del C-24, desmetilación de los dos metilos sobre el C-4 y del metilo sobre C-14, y posterior apertura del anillo de ciclopropano genera el doble enlace $\Delta^{7,8}$ (ergosta-7,24-dien-3-ol). Oxidación alílica de C-6 y posterior deshidratación conduce a un doble enlace $\Delta^{5,6}$, que tras la reducción selectiva del doble enlace $\Delta^{7,8}$ se genera el ergosta-5,24-dien-3-ol. Sucesivas oxidaciones en la cadena lateral de este último y ciclación de la misma, con formación del anillo lactónico en C-22 y C-26 conduce al esqueleto de withanolida²¹.

4.1.1.4. Aproximaciones sintéticas de withanolidas

El interés generado por este tipo de metabolitos, aislados de especies de solanáceas, se ha incrementado dado la amplia gama de actividades biológicas que presentan¹⁰, de ahí que hayan sido objeto de múltiples propuestas sintéticas a partir de esteroides más simples y accesibles.

Los primeros intentos de síntesis datan de 1975, la primera síntesis de una δ -lactona en un esteroide fue llevada a cabo por A. González y colaboradores en 1976, siguiendo el esquema que se presenta a continuación²².

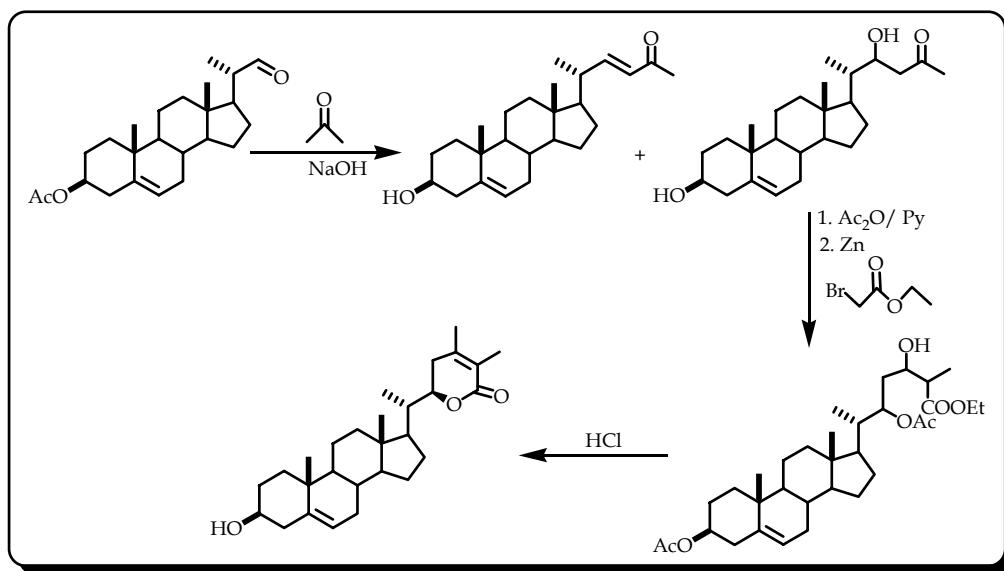


Figura 4.1.11. Primera síntesis de una δ -lactona en un esteroide

Una de las primeras síntesis totales fue la de la withanolida E, llevada a cabo por Arturo Pérez-Medrano y *col.* en 1991²³, compuesto con una potente actividad

²¹ Dewick, P. M. *Medicinal Natural Products, A Biosynthetic Approach. Third edition.* John Wiley and Sons, Ltd, U.K., 2009.

²² Gonzalez, A. G.; Breton, J. L.; Fagundo, C. R.; Trujillo, J. M. *An. Quim.*, 1976, 72, 90.

antifúngica, antialimentaria y antitumoral²⁴. Este metabolito posee en su esqueleto diez centros estereogénicos, de los cuales seis son oxigenados.

Las etapas claves de la síntesis consistieron, en primer lugar, en la introducción de un grupo 14 α -hidroxilo (Fig. 4.1.12), vía una hetero Diels Alder entre el dieno **2** y el nitrosoformiato de bencilo. Como segunda etapa sintética se planteó la formación del anillo δ -lactónico en la molécula mediante reacción de Wittig sobre la cetona en C-17 en **5**, dando el derivado **6**. Posterior hidroxilación del doble enlace C17-C20 con OsO₄ rindió el diol requerido **7**, cuya oxidación de Swern dio lugar a la 17 β -hidroxi-20-cetona (**8**). Adición de vinil-litio, generando el alcohol alílico y subsiguiente ozonólisis rindió el 22-aldehído derivado, **9**. Alquilación de **9** con α,β -dimetilcrotonato de etilo generó el compuesto **10** con la δ -lactona y la estereoquímica requerida en los carbonos C-14, C-17, C-20 y C-22.

La síntesis finaliza introduciendo los grupos funcionales en los anillos A y B mediante la desprotección de los alcoholes y la apertura del ciclo C3-C5, generando el compuesto **11**. Oxidación de Swern del grupo hidroxilo en C-1 y epoxidación con ácido *m*-cloroperbenzoico dio lugar a la **withanolida E**, con un rendimiento de un 71%.

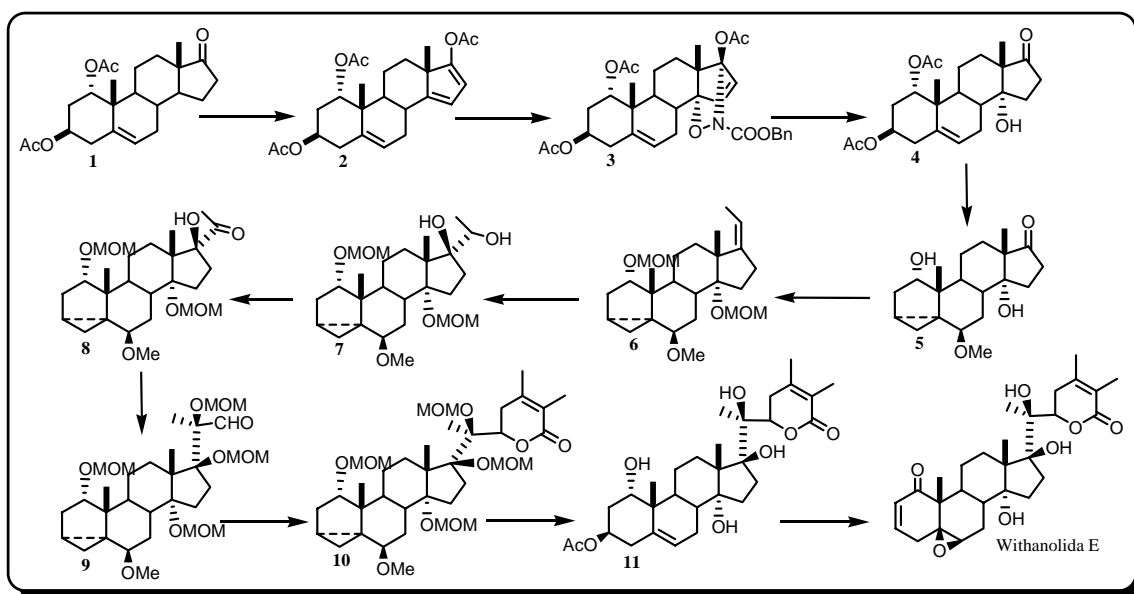


Figura 4.1.12. Síntesis total de withanolida E.

²³ Perez-Medrano, A.; Grieco P. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 1057.

²⁴ Kovganko, N. V.; Kashkan, Z. N. *Chem. Nat. Comp.*, **1997**, *33*, 133.

4.1.1.5 Actividades farmacológicas de las withanolidas

Antes de pasar a comentar las actividades biológicas de las withanolidas, debemos mencionar que los esteroides vegetales, en general, tienen un enorme interés en la industria farmacéutica. Así, una gran variedad de esteroides, naturales y sintéticos, se encuentran entre los fármacos de primera línea como antiinflamatorios, anabolizantes, antiandrógenos, estrógenos, progestágenos, diuréticos y antitumorales²⁵.

Para la obtención de los mismos se parte principalmente de saponinas esteroidales, especialmente de diosgenina y hecogenina. Así, los tubérculos de diferentes especies de *Dioscorea*²⁶ se utilizan como materia prima para la obtención de diosgenina y el rendimiento natural (1-8%) se incrementa mediante fermentación de la droga durante 4-10 días, previa hidrólisis ácida de las saponinas. Las semillas de *alholva* (*Trigonella foenum-graecum*, Fabaceae) contienen también diosgenina (0,8-2,2%), además de los heterósidos furostánicos, trigofoenósidos A-O. Las hojas de *sisal* (*Agave sisalana*), ricas en heterósidos de hecogenina, producen un zumo rico en saponósidos que se deja fermentar durante siete días para completar la hidrólisis, obteniéndose por filtración hecogenina, cuya riqueza en el concentrado final alcanza un 12%. Otras especies con interés farmacéutico son las raíces de diferentes especies de *zarzaparrilla* (*Smilax sp*, Liliaceae) que contiene las saponinas esteroidales, esmilagenina y sarsapogenina y las especies de *Solanum*, que se caracterizan por producir alcaloides esteroídicos, análogos nitrogenados de la diosgenina. El insaponificable del aceite de las semillas de soja (*Glycine, Leguminosa*) es rico en estigmasterol y sitosterol.

A partir de estas materias primas se sigue un proceso general de síntesis química para la elaboración de los esteroides. El descubrimiento en 1952 por Peterson y Murray de la hidroxilación en posición 11 de la progesterona, por la cepa del hongo *Rhizopus arrhizus*²⁷, resultó clave para el desarrollo de una tecnología comercialmente viable, tanto por la reducción de los costos de producción como del número de pasos en la síntesis de cortisona. La diosgenina se transforma a través de una serie de reacciones en un derivado preg-16-en-20-ónico y posteriormente en progesterona.

²⁵ Kipp, M.; Beyer, C. *Front. Neuroendocrinol.* **2009**, *30*, 188.

²⁶ McAnuff-Harding, M. A.; Omoruyi, F. O.; Asemota, H. N. *Life Sci.*, **2006**, *78*, 2595.

²⁷ Peterson, D. H.; Murray, H. C.; Epptein, S. H.; Reineke, L. M.; Wientraub, P.; Maister, P. D.; Leigh, H. M. *J. Am. Chem. Soc.*, **1952**, *74*, 1872.

Hidroxilación microbiana de ésta, da lugar al 11 α -hidroxi-progesterona y tras modificaciones químicas, la hidrocortisona, que sufre de nuevo por medios microbianos, oxidación en C-11 y deshidrogenación en C-1, dando lugar a prednisolona²⁸, corticoesteroide sintético que se utiliza en clínica como antiinflamatorio e inmunosupresor.

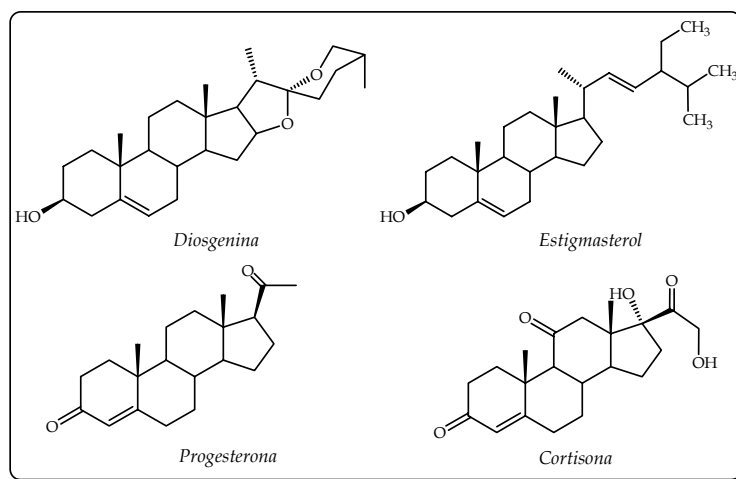


Figura 4.1.13. Ejemplos de esteroides de interés farmacológico

En lo que a las actividades farmacológicas de las withanolidas se refiere, el interés generado por este tipo de metabolitos, se ha incrementado dado la amplia gama de actividades biológicas que presentan¹⁰ y que pasaremos a comentar a continuación.

4.1.1.5.1. Actividad insecticida y antialimentaria

Durante siglos el hombre ha establecido una lucha por proteger sus cultivos del ataque de insectos. En las últimas décadas, el control convencional de plagas se ha llevado a cabo mediante la aplicación de compuestos orgánicos de naturaleza sintética, lo que ha ocasionado la aparición de resistencia, desequilibrios ecológicos y la aparición de nuevas plagas, así como problemas de contaminación del medio ambiente y graves consecuencias para la salud humana. En este contexto, las plantas se revelan como una importante fuente de nuevas estructuras y mecanismos de acción alternativos en el campo de la agricultura.

Las especies de la familia Solanaceae son conocidas por su uso tradicional en la agricultura en todo el mundo, destacando las especies del género *Nicotiana*. Así,

²⁸ Mesaik, M. A.; Zaheer-ul-Haq; Murad, S.; Ismail, Z.; Abdullah, N. R.; Gill, H. K.; Atta-Ur-Raman; Yousaf, M.; Siddiqui, R. A.; Ahmad, A.; Choudhary, M. I. *Mol. Immunol.*, **2006**, *43*, 1855.

numerosos trabajos científicos hacen referencia a la actividad insecticida y antialimentaria de especies de solanáceas²⁹. Las propiedades insecticidas de las withanolidas se describen por primera vez en compuestos aislados de la especie peruana *Nicandra physaloides*. Nicandrenona³⁰, el componente mayoritario de la misma era conocido por su sabor amargo y sus propiedades insecticidas. Asher y col.³¹ demostraron que withanolida E y 4 β -hidroxewithanolida E, aisladas de *Physalis peruviana*, así como otros esteroides relacionados, presentaban actividad antialimentaria. Posteriormente, Waiss y col.³² examinaron esta especie como posible fuente de insecticidas y encontraron que inhibe el crecimiento y desarrollo de *Helicoverpa zea*, un insecto que genera daños económicos en numerosos cultivos, incluyendo el tabaco y el tomate.

La actividad antialimentaria de tres withanolidas, salpichrolidas A, C y G, aisladas de *Salpichroa origanifolia* fue investigada sobre larvas de la mosca doméstica (*Musca domestica*)³³, el insecto que afecta al almacenamiento del grano, *Tribolium castaneum*³⁴ y la mosca mediterránea *Ceratitis capitata*³⁵. Salpichrolida A fue el compuesto que mostró mayor inhibición del desarrollo de las tres especies de insectos. Dado los resultados obtenidos se prepararon análogos sintéticos para llevar a cabo un estudio de relación estructura-actividad, ello permitió establecer que la oxidación a lactona del hemiacetal en la cadena lateral del esqueleto base elimina la actividad biológica sobre estas especies, mientras que la acetilación no afectó a la actividad sobre *M. domestica*, pero aumentó considerablemente su potencia sobre *T. castaneum*; por otra parte, la reducción del doble enlace $\Delta^{2,3}$ tiene un ligero efecto negativo sobre la actividad antialimentaria.

Estos resultados sugieren que estos compuestos pueden proporcionar protección frente al ataque por ciertos insectos fitopatógenos, actuando como agentes de defensa y podrían ser potencialmente útiles en la protección de los cultivos, evitándose así los problemas de contaminación del medio ambiente y las graves

²⁹ Farnham, A. S.; Flora, J. W.; Ingram, S. S.; Faustini, D. L. J. *Stored Prod. Res.* **2007**, *43*, 171.

³⁰ Yamamoto, R.; Fraenkel, G. *Ann. Entomol. Soc. Amer.*, **1960**, *53*, 503.

³¹ Glotter, E. *Nat. Prod. Rep.*, **1991**, 415.

³² Waiss, A. C. Jr.; Elliger, C. A.; Benson, M. *Nat. Prod. Lett.* **1993**, *2*, 115.

³³ Mareggiani, G.; Picollo, M. I.; Zerba, E.; Burton, G.; Tettamanzi, M. C.; Benedetti-Doctorovich, M. O. V.; Veleiro, A. S. J. *Nat. Prod.*, **2000**, *63*, 1113.

³⁴ Mareggiani, G.; Picollo, M. I.; Veleiro, A. S.; Tettamanzi, M. C.; Benedetti-Doctorovich, M. O. V.; Burton, G.; Zerba, E. *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, *50*, 104.

³⁵ Bado, S.; Mareggiani, G.; Amiano, N.; Burton, G.; Veleiro, A. S. *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, *52*, 2875.

consecuencias para la salud humana que presentan en numerosos casos los insecticidas de síntesis.

La actividad antialimentaria de los componentes mayoritarios de *Jaborosa odonelliana*, jaborosalactona P y jaborosalactona 10, fue estudiada frente a *Tribolium castaneum*. En este caso, solo jaborosalactona P produjo un retraso significativo en el desarrollo de la larva³⁶.

Dinan y *col.*³⁷ analizaron una serie de withanolidas como agonistas y antagonistas de los ecdiesteroides, para estudiar su mecanismo de acción y su potencial como nuevos agentes para el control de plagas. Se evaluaron 16 withanolidas, aisladas de *Ioichroma gesneroides*, usando la línea celular *Drosophila melanogaster* B11. Aquellos compuestos con una función oxigenada en C-3 (hidroxilo o metoxilo) y una cetona α,β -insaturada en la cadena lateral mostraron actividad antagonista, siendo la 2,3-dihidro-3 β -hidroxiwitacnistina el más activo (ED_{50} 2.5×10^{-6} M). Las funciones oxigenadas en C-3 no son frecuentes en las withanolidas naturales y en muchos casos son artefactos del procedimiento de aislamiento (especialmente los grupos metoxilo), por lo que los autores no concluyen si la actividad antagonista es casualidad o bien las withanolidas pueden ser activas después de su ingestión por el insecto.

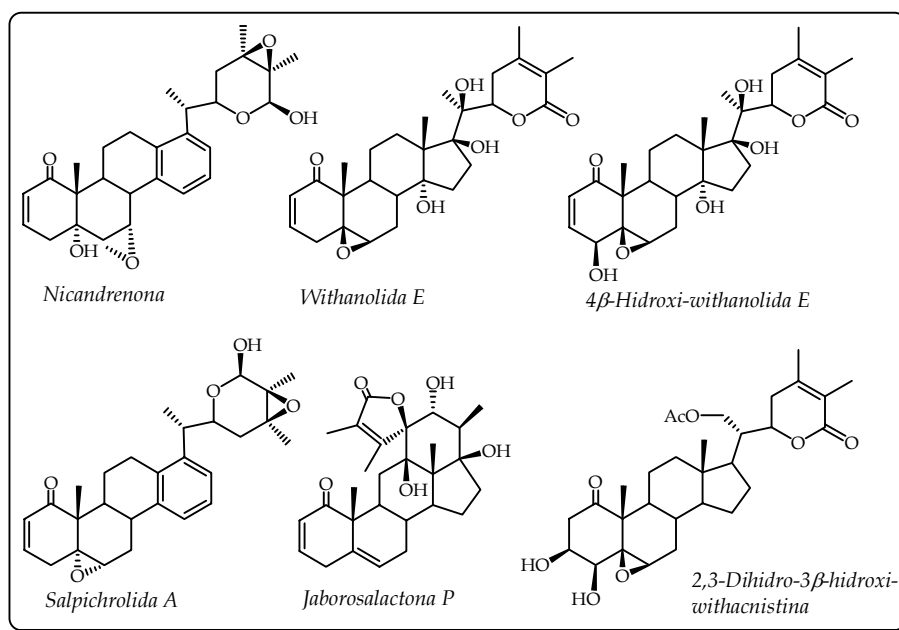


Figura 4.1.14. Withanolidas con actividad insecticida y antialimentaria

³⁶ Cirigliano, A. M.; Veleiro, A. S.; Oberti, J. C.; Burton, G. J. *Nat. Prod.*, **2002**, 65, 1049.

³⁷ Dinan, L.; Whiting, P.; Alfonso, D.; Kapetanidis, I. *Entomol. Exp. Appl.*, **1996**, 80, 415.

Recientemente, Dinan y col.³⁸ examinaron 128 especies de solanáceas por la presencia de agonistas/antagonistas de ecdiesteroides; sin embargo, sólo se encontró una débil actividad antagonista en algunos extractos metanólicos, incluyendo especies con un alto contenido en withanolidas.

4.1.1.5.2. Actividad antiparasitaria

Las enfermedades parasitarias como la leishmaniasis, malaria y tripanosomiasis tienen un importante impacto en los países en vías de desarrollo, donde la incidencia anual se estima en 2 millones³⁹. En la actualidad los fármacos utilizados para tratar las principales parasitosis de interés presentan serios problemas, ya sea porque los medicamentos en uso son poco eficaces, inadecuados, tóxicos o porque los parásitos hayan desarrollado algún tipo de resistencia.

En diversos trabajos de investigación se ha descrito que los esteroides con esqueleto de withanolida presentan actividad antiparasitaria. Así, del fraccionamiento bioguiado de las hojas de *Dunalia brachyacantha*, dentro de un estudio de especies bolivianas, se aislaron dos acetoxiwithanolidas, 18-acetoxiwithanolida D y 18-acetoxi-5,6-deoxi-5-withanolida D con actividad antiparasitaria⁴⁰, siendo la primera vez que se publica la actividad leishmanicida y tripanocida de lactonas esteroidales.

Recientemente, Abe y col.⁴¹ realizaron la evaluación de diez withanolidas, aisladas de la parte aérea de *Physalis angulata* por su actividad antiparasitaria frente a *Tripanosoma cruzi*, el agente etiológico causante de la enfermedad de Chagas. En un estudio de la relación estructura-actividad se concluyó que grupos β -epóxidos en C5-C6 y en C16-C17, como ocurre en los compuestos physagulina C y 4-deshidroxi-physagulina C, es un factor estructural importante para la actividad tripanocida. Los resultados obtenidos sugieren a los autores el potencial de estos compuestos como agentes quimioterápicos para el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

³⁸ Savchenko, T.; Whiting, P.; Germade, A.; Dinan, L. *Biochem. Syst. Ecol.*, **2000**, 28, 403.

³⁹ Cavalli, A.; Bolognesi, M. L. *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 7339.

⁴⁰ Bravo, J. A.; Sauvain, M.; Gimenez, A.; Balanza, T. E.; Serani, L.; Laprévote, O.; Massiot, G.; Lavaud, C. *J. Nat. Prod.*, **2001**, 64, 720.

⁴¹ Nagafuji, S.; Okabe, H.; Akahane, H.; Abe, F. *Biol. Pharm. Bull.*, **2004**, 27, 193.

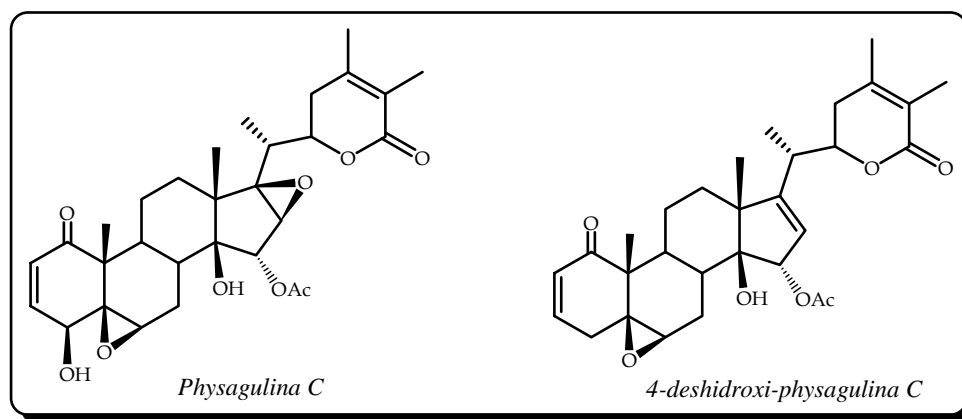


Figura 4.1.15. Withanolidas con actividad frente a *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico de la enfermedad de Chagas

4.1.1.5.3. Actividad quimiopreventiva y citotóxica

El cáncer constituye la segunda causa de mortalidad en los países desarrollados y el aumento paralelo de la incidencia de esta enfermedad, con respecto a la esperanza de vida de la población, explica el interés médico y social por la misma. La naturaleza ha proporcionado muchos agentes anticancerígenos efectivos de uso actual⁴².

La inducción de la enzima quinona-reductasa (QR) ha sido usado como estrategia para determinar el potencial quimiopreventivo del cáncer de withanolidas, evaluación que proporciona no sólo un índice de la potencia anticarcinogénica de los compuestos sino información de su posible toxicidad. El primer estudio sobre esta actividad la realizó Kennelly y *col.*⁴³ en withanolidas aisladas de *Phylaxis philadelphia*. Los compuestos más potentes fueron 4 β ,7 β ,20R-trihidroxi-1-oxowitha-2,5-dien-22,26-olida, philadelphicalactona A, ixocarpalactona A e ixocarpalactona B, compuestos que contienen una unidad estructural de 4 β -hidroxi-2-en-1-ona.

Posteriormente, fueron evaluadas por su potencial para inducir la quinona-reductasa 37 withanolidas aisladas de especies de solanáceas de América del Sur⁴⁴. Jaborosalactona 1, jaborosalactona O, jaborosalactona P, trechonolida A y withaphysalina J, mostraron una inducción significativa con valores de CD (concentración requerida para doblar la actividad de la QR) en un rango de 0.27-1.52

⁴² Gragg, G. M.; Newman, D. J. *Phytochem. Rev.* **2009**, *8*, 313.

⁴³ Kennelly, E. J.; Gerhauser, C.; Song, L. L.; Beecher, J. G.; Pezzuto, J. M.; Kinghorn, A. D. *J. Agric. Food Chem.*, **1997**, *45*, 3771.

⁴⁴ Misico, R. I.; Song, L. L.; Veleiro, A. S.; Cirigliano, A. M.; Tettamanzi, M. C.; Burton, G.; Bonetto, G. M.; Nicotra, V. E.; Silva, G. L.; Gil, R. R.; Oberti, J. C.; Kinghorn, A. D.; Pezzuto, J. M. *J. Nat. Prod.*, **2002**, *65*, 677.

μM . Los resultados obtenidos indicaron que el Me-18 funcionalizado juega un importante papel en la actividad, mientras que la presencia de sustituyentes en C-5 hace que ésta se reduzca. En general, las withanolidas tipo espiranoide y trechonolida exhibieron buena inducción de la QR. Entre los compuestos evaluados, jaborosalactona P resultó uno de los más prometedores en términos de inducción de la potencia y baja toxicidad, realizándose ensayos *in vivo*, que confirmaron los ensayos *in vitro*, lo que indicó que la withanolidas se comportan como potentes inductores de esta enzima.

Recientemente, Minguzzi y col.⁴⁵ aislaron dos withanolidas de *Acnistus arborescens*, que resultaron potentes inductores de la QR, pero su selectividad fue marginal. Del extracto clorofórmico de la especie *Deprea subtriflora*, Su y col.⁴⁶ aislaron, mediante fraccionamiento bioguiado, los últimos ejemplos de withanolidas con actividad quimiopreventiva por activación de la enzima quinona-reductasa. Los resultados obtenidos sugieren que la presencia de una cetona α,β -insaturada en el anillo A es importante para la actividad inductora en dicho ensayo.

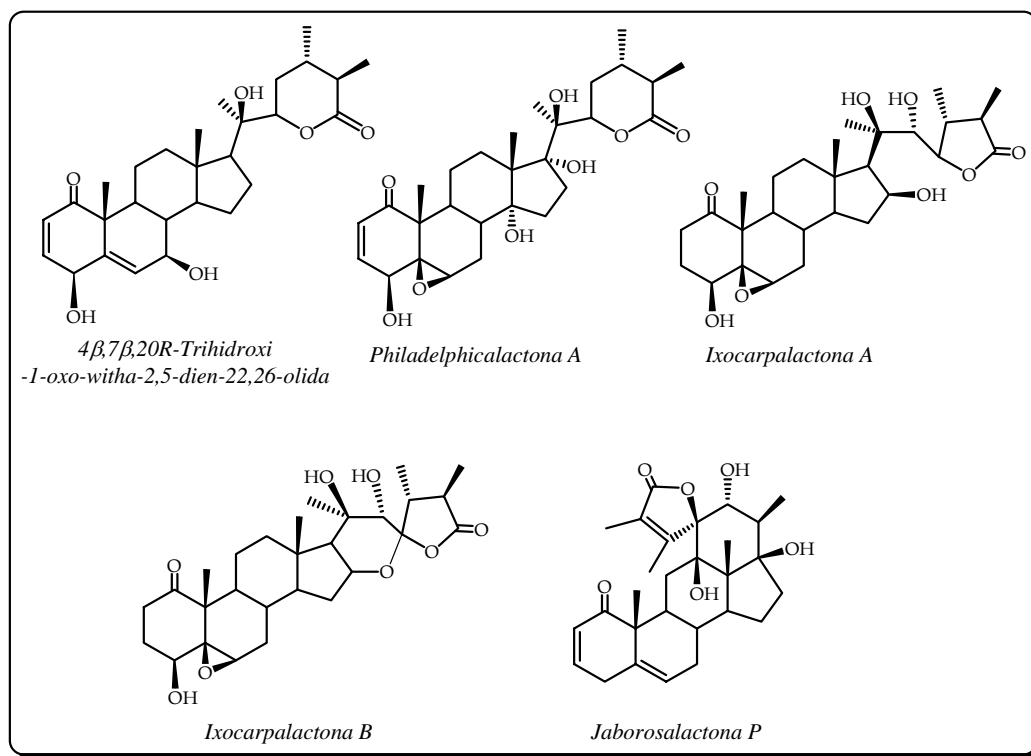


Figura 4.1.16. Withanolidas con potencial quimiopreventivo del cáncer (inducción de la enzima quinona-reductasa QR)

⁴⁵ Minguzzi, S.; Barata, L. E. S.; Geun Shin, Y.; Jonas, P. F.; Chai, H.; Park, E. J.; Pezzuto, J. M.; Cordell, G. A. *Phytochemistry*, **2002**, 59, 635.

⁴⁶ Su, B.; Gu, J.; Kang, Y.; Park, E.; Pezzuto, J. M.; Kinghorn, A. D. *Mini-Rev. Org. Chem.*, **2004**, 1, 115.

Por otro lado, una serie de withanolidas aisladas de *W. somnifera* fueron evaluadas por su actividad citotóxica frente a cuatro líneas celulares: NCI-H460 (pulmón), HCT-116 (colon), SF-268 (sistema nervioso central) y MCF-7 (mama)⁴⁷. Las withanolidas que presentan una unidad de withaferina A resultaron ser las más activas, lo que indica que la cetona α,β -insaturada del anillo A y el grupo hidroxilo en C-27 contribuyen considerablemente a la actividad antiproliferativa. *W. somnifera* es una de las plantas más usadas en la medicina tradicional en Asia como remedio para numerosas enfermedades y hoy día es uno de los constituyentes de más de 100 preparados medicinales. Dado los resultados obtenidos, los autores postulan que el consumo de las hojas de *W. somnifera* como suplemento de la dieta, puede prevenir o reducir el desarrollo de tumores.

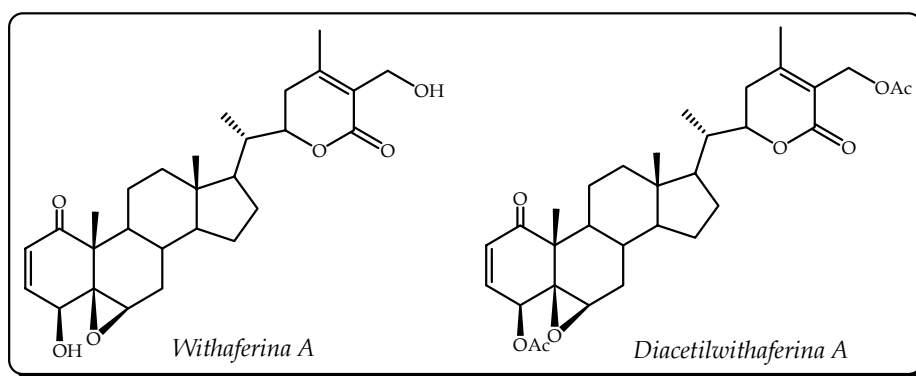


Figura 4.1.17. Withanolidas aisladas de *W. somnifera* con actividad citotóxica

4.1.1.5.4. Actividad inhibidora de la acetilcolinesterasa (AChE): tratamiento de enfermedades neurodegenerativas

Las enfermedades neurodegenerativas suponen, junto con las enfermedades vasculares y las oncológicas, la principal causa de mortalidad y morbilidad de los países desarrollados. Estas enfermedades se caracterizan por una disminución en el número de células en determinadas poblaciones neuronales, lo que ocurre por ejemplo en enfermedades como el Alzheimer, Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, etc.

La acetilcolinesterasa (AChE) es un componente clave en la sinapsis colinérgica en el cerebro y en la sinapsis neuromuscular y su principal papel biológico es la terminación del impulso nervioso mediante la hidrólisis del neurotransmisor catiónico,

⁴⁷ Jayaprakasam, B.; Zhang, Y.; Seeram, N. P.; Nair, M. G. *Life Sci.*, **2003**, *74*, 125.

acetilcolina. Ello permite el uso de inhibidores de la AChE para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer en sus primeros estadios⁴⁸.

Recientemente, se han descrito 5 withanolidas, aisladas de *Ajuga bracteosa* y *Withania somnifera*, con actividad inhibitoria de la enzima acetilcolinesterasa⁴⁹, relacionada con la sinapsis neuromuscular del sistema nervioso somático y con propiedades antagonistas del calcio, lo que permite prevenir los altos niveles de calcio intracelular en las neuronas y prolongar la vida y función de las células. La combinación de ambas actividades, unido a que estos compuestos no resultaron tóxicos en neutrófilos humanos, hacen de los mismos excelentes candidatos⁵⁰ para su estudio en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y problemas asociados a la misma.

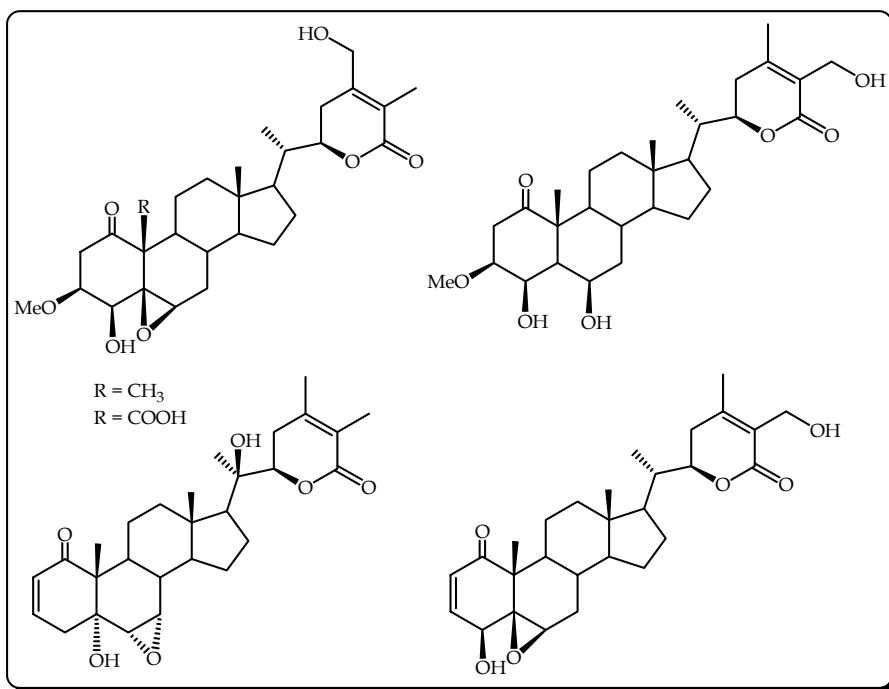


Figura 4.1.18. Withanolidas con actividad inhibitoria de la acetilcolinesterasa, componente clave en la sinapsis colinérgica en el cerebro.

⁴⁸ Quinn, D. M. *Chem. Rev.*, **1987**, 87, 955.

⁴⁹ Choudhary, M. I.; Nawaz, S. A.; Zaheer-ul-Haq; Lodhi, M. A.; Ghayur, M. N.; Jalil, S.; Riaz, N.; Yousuf, S.; Malik, A.; Gilani, A. H.; Atta-ur-Raman. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2005**, 334, 276.

⁵⁰ Nair, M. G.; Jayaprakasam, B. *U. S. Pat. Appl. Publ* 20050059727 A1 918284, **2005**.

4.1.1.5.5. Actividad antiinflamatoria

La inflamación es una reacción local del organismo para hacer frente a una agresión, pero muchas veces dicha reacción puede ser excesiva y producir daño, por lo que es necesario, en ese caso, frenar el proceso inflamatorio. Ello puede lograrse con los fármacos antiinflamatorios dentro de los cuales se encuentran los antiinflamatorios no específicos, que inhiben procesos inflamatorios con variada etiología, siendo los principales los antiinflamatorios esteroidales, generalmente corticoesteroides, que guardan una gran similitud estructural con las withanolidas aisladas del género *Withania*.

Las enzimas ciclooxigenasas-1 (COX-1) y -2 (COX-2) son enzimas responsables de la conversión del ácido araquidónico en prostaglandinas, las cuales causan la respuesta inflamatoria en el organismo. Sin embargo, la inhibición de la COX-1 puede producir úlceras y por lo tanto los compuestos inhibidores selectivos de la COX-2 presentan ventajas sobre los fármacos antiinflamatorios no esteroidales que no son selectivos. Por otra parte, se ha observado la sobreexpresión de la COX-2, no solo en células inflamadas sino también en diversas células tumorales, por lo que los inhibidores de la COX-2 son de enorme interés como quimiopreventivos del cáncer.

Una serie de doce withanolidas aisladas de *W. somnifera* resultaron excelentes inhibidores selectivos de la COX-2⁵¹, siendo inactivos frente a la COX-1, incluso a una concentración de 500 µg/ml. Los resultados obtenidos en un estudio de la relación estructura-actividad indicaron que el doble enlace en la δ -lactona α,β -insaturada es esencial para la expresión de esta actividad. Este es el primer trabajo sobre la actividad inhibidora de la COX-2 de este tipo de metabolitos y proporciona una base científica al uso de preparaciones de las hojas de *W. somnifera* en la medicina tradicional Ayurvédica por sus propiedades antiinflamatorias. Por ello, dado que tanto las raíces como las hojas de esta especie contienen withanolidas, su consumo como un suplemento de la dieta podría reducir el dolor producido por la inflamación, así como el riesgo de cáncer y su progresión.

⁵¹ Jayaprakasam, B.; Nair, M. G. *Tetrahedron*, **2003**, 59, 841.

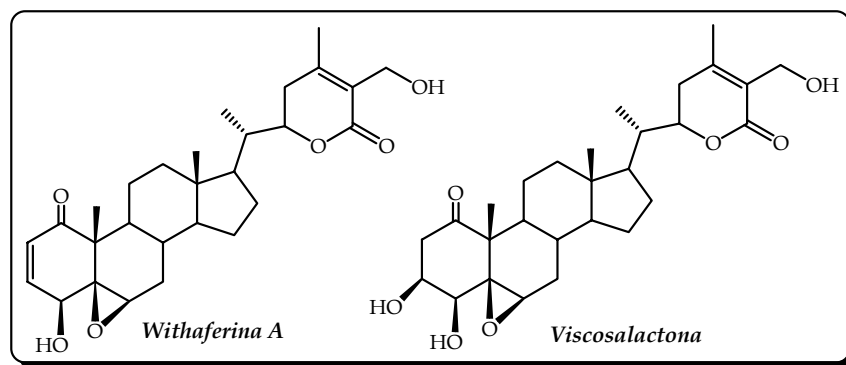


Figura 4.1.19. *Withanolidas inhibidoras selectivas de la enzima ciclooxigenasa-2, involucrada en la respuesta inflamatoria*

4.1.1.5.6. Actividad inmunomoduladora

Aunque la respuesta inmunitaria es un mecanismo de defensa, cada vez es mayor el número de enfermedades cuyo origen radica en alguna alteración a este nivel (enfermedades autoinmunes); en otras ocasiones la respuesta inmunitaria puede ser desfavorable, como es en el caso de los trasplantes. Por el contrario, esta respuesta puede llegar a ser deficiente para el control de agentes externos (inmunodeficiencias) o de las propias células (neoplasias). En cualquier caso, todas estas situaciones, requieren un control de la respuesta inmunitaria, bien deprimiéndola (fármacos inmunosupresores) o estimulándola (fármacos inmunoestimulantes).

Existen numerosas referencias bibliográficas sobre withanolidas, aisladas del género *Withania*, con actividad inmunomoduladora, tanto inmunosupresora como inmunoestimulante. Así, por ejemplo, withaferina A y withanolida E se describieron desde 1978 como compuestos con actividad inmunosupresora⁵² y tres withanolidas, aisladas de *Datura quercifolia*, fueron evaluadas por su actividad inmunomoduladora, observándose su efecto sobre la producción de anticuerpos, la activación de células T y B y de citoquinas, resultando la daturalactona 1 el más prometedor como inmunoestimulante⁵³.

Recientemente, coagulina-H, una withanolida aislada *Withania coagulans*, fue evaluada por su efecto sobre varias funciones celulares relacionadas con la respuesta

⁵² Shohat, B.; Kirson, I.; Lavie, D. *Biomedicine*, **1978**, *28*, 18.

⁵³ Bhat, B. A.; Dhar, K. L.; Puri, S. C.; Qurishi, M. A.; Khajuria, A.; Gupta, A.; Qazi, G. N. *Biorg. Med. Chem.*, **2005**, *13*, 6672.

inmune, incluyendo la proliferación de linfocitos y la expresión de interleuquinas-2 (IL-2) y los resultados fueron comparados con prednisolona, un fármaco usado actualmente en clínica como inmunomodulador. Basándose en los resultados experimentales y el uso de herramientas informáticas, los autores sugieren que coagulina-H es un candidato como potencial inmunosupresor.

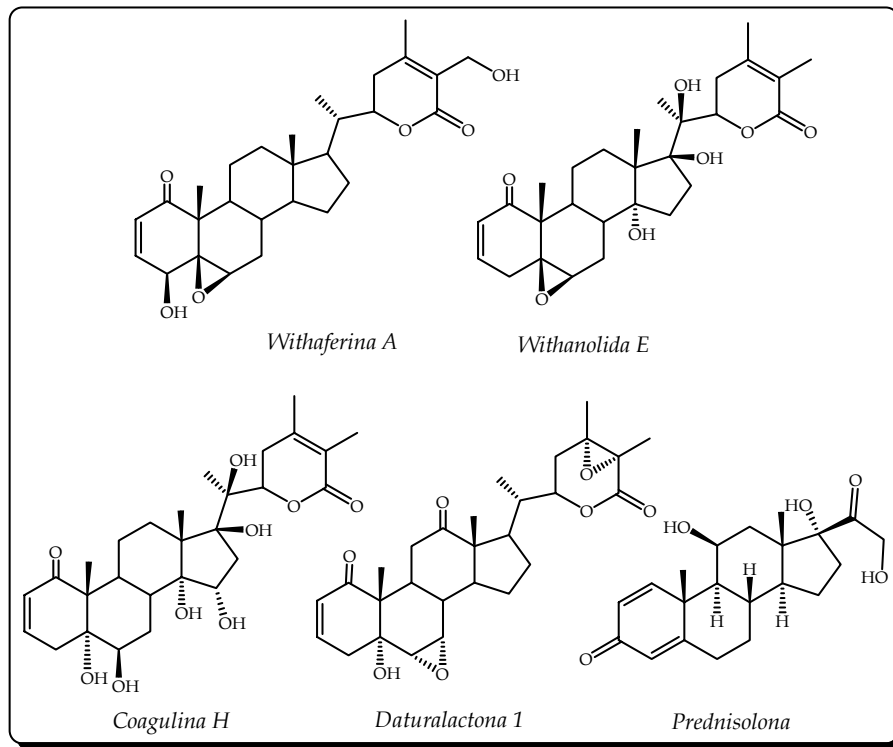


Figura 4.1.20. *Withanolidas con actividad inmunomoduladora y estructura de la prednisolona de uso clínico*

4.1.2 Resultados y discusión

Con los antecedentes anteriormente citados y siguiendo los objetivos propuestos de aislamiento y elucidación estructural de los esteroides de *Withania aristata* para la posterior evaluación de su actividad biológica, llevamos a cabo el estudio fitoquímico de hojas y tallos de *W. aristata*. Se aíslan un total de cuarenta fitoesteroides, de los cuales treinta y cinco fueron withanolidas, siendo veinte de éstas nuevas en la bibliografía química. Estos compuestos los hemos agrupado para facilitar el estudio, siguiendo las consideraciones que exponemos a continuación:

➤ **Withanolidas con doble enlace C5-C6**, que hemos denominado de **W-1 a W-10**, de las cuales siete resultaron ser nuevas en la bibliografía química (**W-1 a W-7**). El resto de estos compuestos fueron identificados como: 4 β ,17 α ,27-trihidroxi-1-oxo-witha-2,5,24-trienolida⁵⁴ (**W-8**), 4 β -hidroxi-1-oxo-witha-2,5,24-trienolida⁵⁵ (**W-9**) y 4 β ,27-dihidroxi-1-oxo-witha-2,5,24-trienolida⁵⁶ (**W-10**).

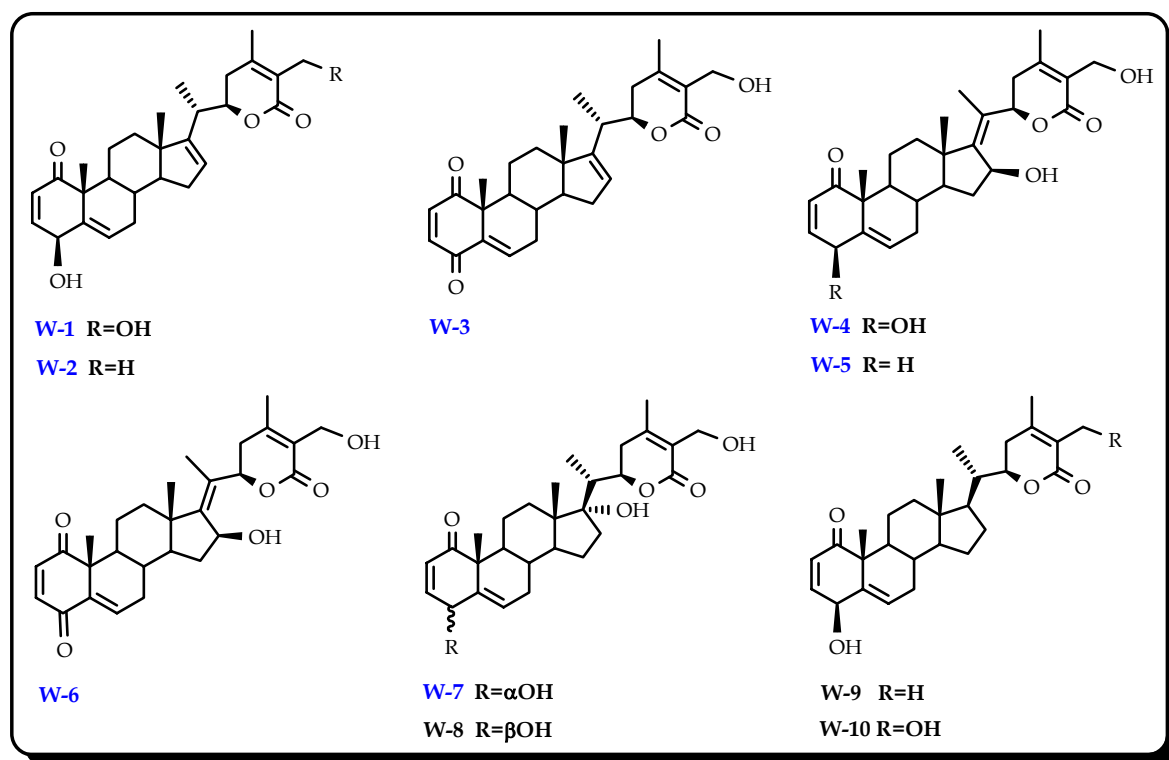


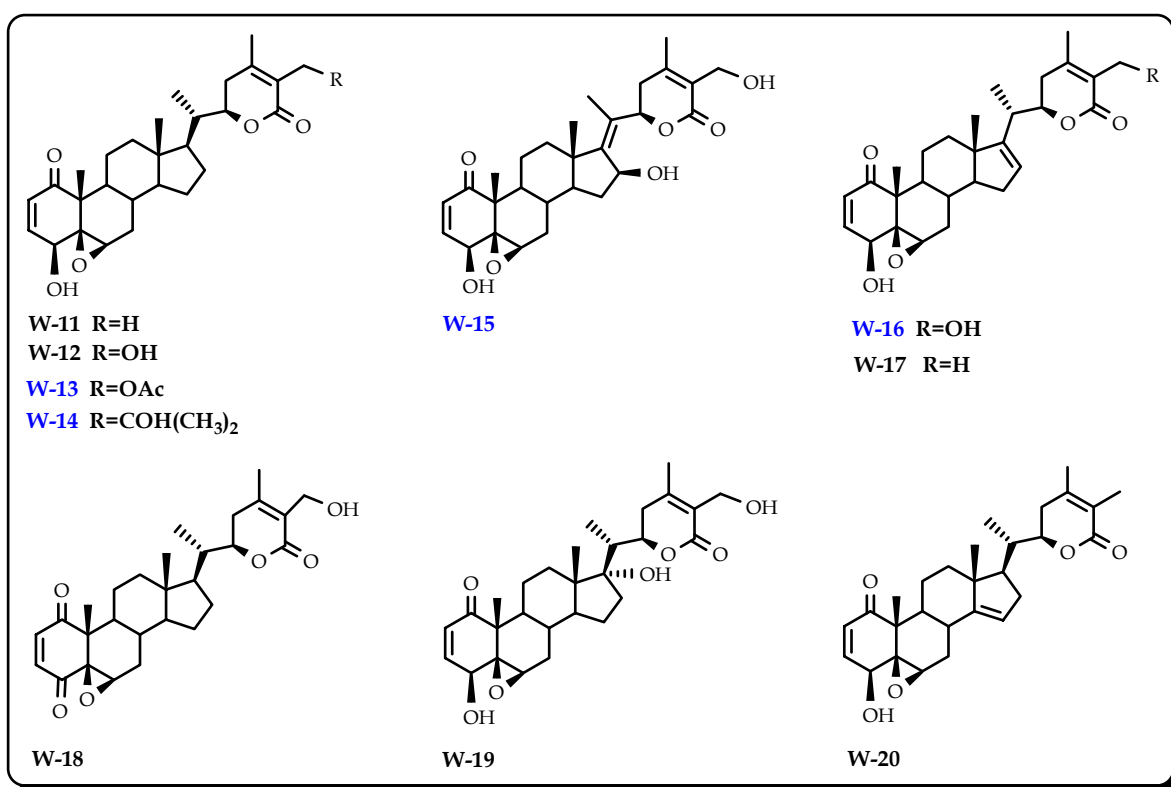
Figura 4.2.1. Withanolidas con doble enlace C5-C6 aisladas de *Withania aristata*. En azul se resaltan las withanolidas que resultaron nuevas en la bibliografía química.

⁵⁴ González, A. G.; Bretón, J. L.; Trujillo, J. M. *An. Quím.* **1974**; 70, 69.

⁵⁵ Hirayama M.; Gamoh K.; Ikekawa N. *Tetrahedron Lett.* **1982**, 23, 4725.

⁵⁶ Nittala S. S.; Lavie D. *Phytochemistry*, **1981**, 20, 2735.

➤ **Withanolidas con epóxido C5-C6 ó alcohol en C-5 y/ó C-6**, que hemos denominado de **W-11 a W-29**, de las cuales ocho fueron nuevas en la bibliografía química (**W-13 a W-16**, **W-23 a W-24** y **W-28**). 4-Dehidro-withaferina A⁵⁷ (**W-18**) y (22R)-5β-formal-6β,27-dihidroxi-1-oxo-4-norwitha-24-enolida⁵⁸ (**W-29**) fueron aisladas por primera vez de forma natural, el resto de estos metabolitos fueron identificados como: 27-deoxi-withaferina A⁵⁹ (**W-11**), withaferina A⁶⁰ (**W-12**), 27-deoxi-16-en-withaferina A⁶¹ (**W-17**), viscosalactona B⁶² (**W-21**), 2,3-dihidro-withaferina A⁶³ (**W-22**), 17α-hidroxi-withaferina A⁶⁴ (**W-19**), 4β-hidroxi-1-oxo-5β,6β-epoxi-22R-witha-2,14,24-trienolida⁶³ (**W-20**), somnifericina⁶⁵ (**W-25**), (+)-2,3-dehidrosomnifericina⁶⁵ (**W-26**) y 6α-cloro-5β-hidroxiwithaferina A⁵⁴ (**W-27**).



continuación en la siguiente página

⁵⁷ Pelletier, S. W.; Mody, N. V.; Nowacki, J.; Bhattacharyya, J. J. *Nat. Prod.* **1979**, *42*, 512.

⁵⁸ Nittala, S. S.; Lavie, D. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I.* **1982**, *12*, 2835.

⁵⁹ Kirson, I.; Glotter, E.; Abraham, A.; Lavie, D. *Tetrahedron*, **1970**, *26*, 2209.

⁶⁰ Lavie, D.; Glotter, E.; Shvo, Y. *J. Org. Chem.*, **1965**, 7517.

⁶¹ Misra, L.; Lal, P.; Sangwan, R. S.; Sangwan, N. S.; Uniyal, G. C.; Tuli, R. *Phytochemistry*. **2005**, *66*, 2702.

⁶² Pelletier, S. W.; Gebeyehu, G.; Nowacki, J.; Mody, N. V. *Heterocycles*. **1981**, *15*, 317.

⁶³ Gonzalez, A. G.; Breton, J. L.; Trujillo, J. M. *An. Quim.* **1972**, *68*, 107.

⁶⁴ Choudhary, M. I.; Yousuf, S.; Nawaz, S. A.; Ahmed, S.; Atta-ur-Rahman. *Chem. Pharm. Bull.* **2004**, *52*, 1358.

⁶⁵ Choudhary, M. I.; Abbas, S.; Jamal, S. A.; Atta-ur-Rahman. *Heterocycles*. **1996**, *42*, 555.

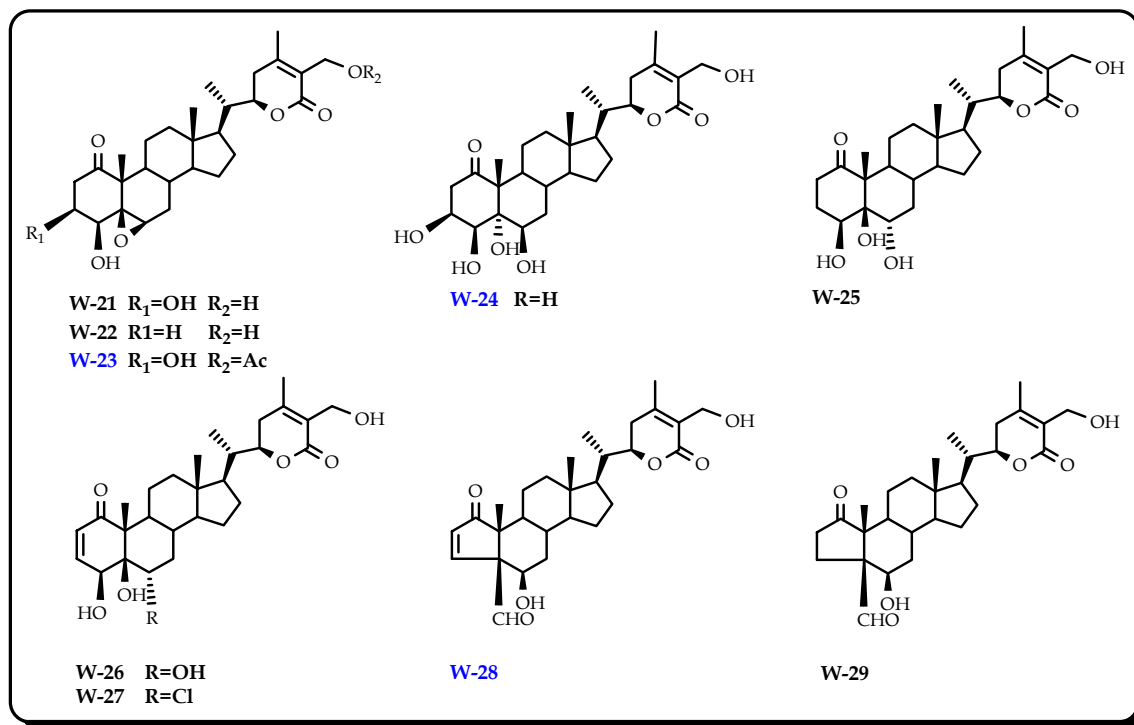


Figura 4.2.2. Withanolidas con epóxido C5-C6 aisladas de *Withania aristata*, se resaltan en azul las withanolidas que resultaron nuevas en la bibliografía química.

- **Withanolidas con doble enlace C3-C4**, que hemos denominado de W-30 a W-35, siendo todas nuevas en la bibliografía química.

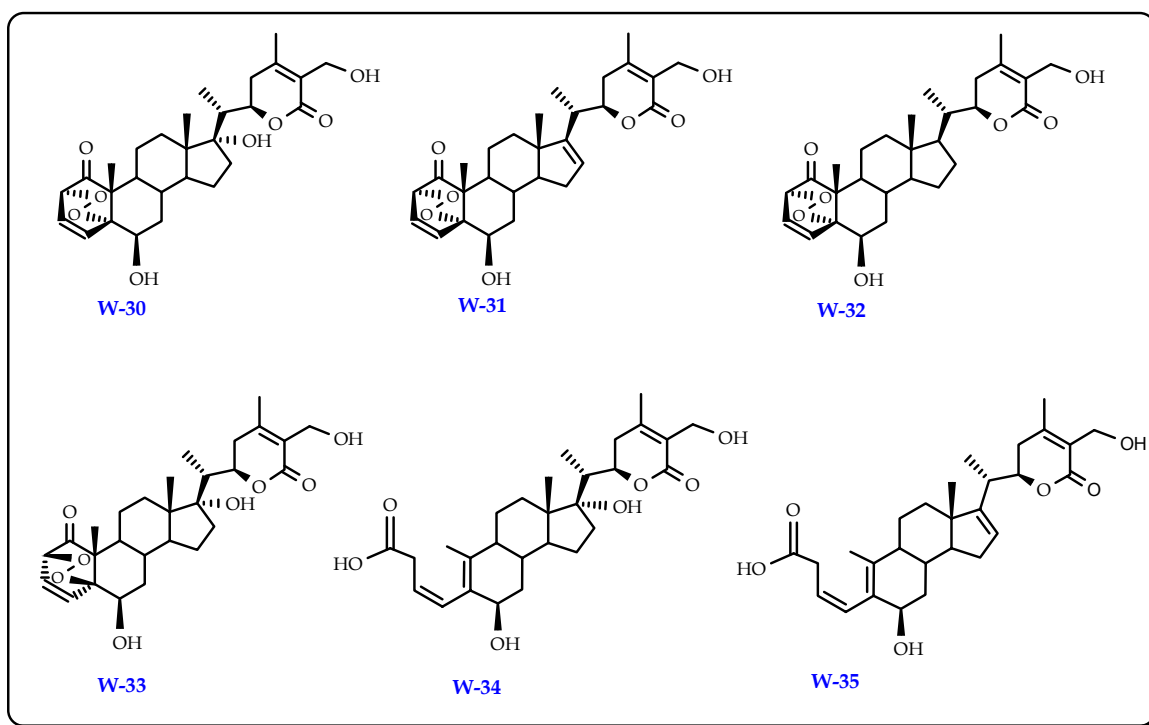


Figura 4.2.3. Withanolidas con doble enlace C3-C4 aisladas de *Withania aristata*, en azul se destacan las que resultaron nuevas en la bibliografía química.

➤ **Fitoesteroles**, se han aislado cinco fitoesteroles que hemos denominado de **W-36** a **W-40**, los cuales pueden ser considerados como productos intermedios en la biosíntesis de las withanolidas. Resultaron todos ellos conocidos en la bibliografía química, siendo identificados como: ergosta-5,24-dien-3 β ,24-diol⁶⁶ (**W-36**), phisalindicanol B⁶⁷ (**W-37**), β -sitosterol⁶⁸ (**W-38**), 3-O- β -D-glucosil- β -sitosterol⁶⁹ (**W-39**) y 3-O- β -D-glucopiranosil- β -sitosterol tetraacetato⁷⁰ (**W-40**).

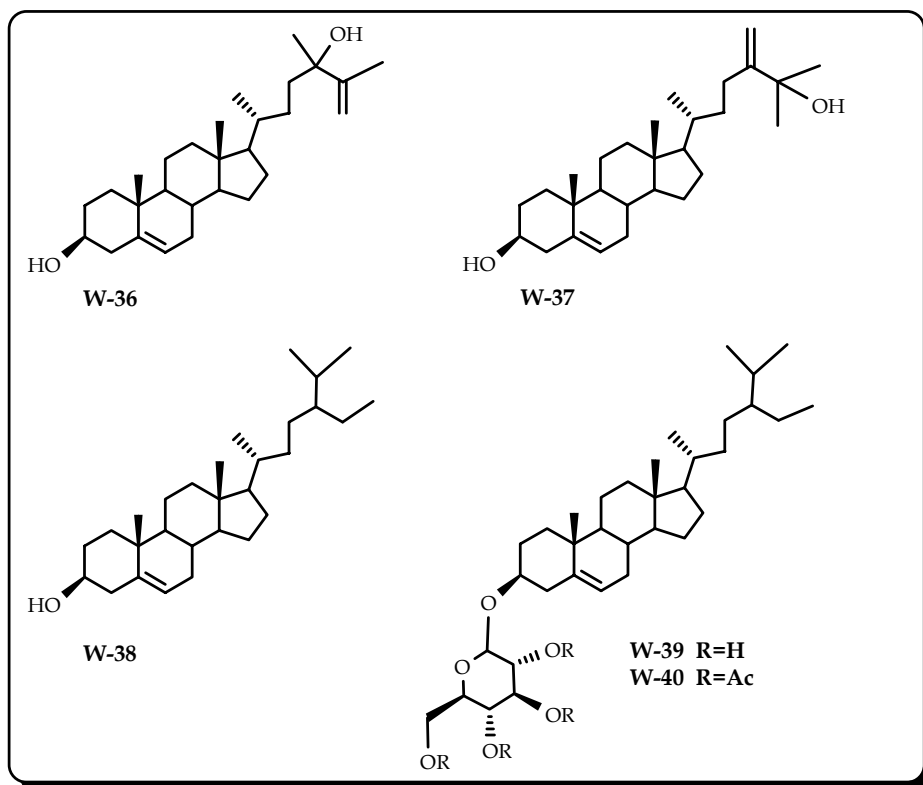


Figura 4.2.4. Fitoesteroles aislados de *Withania aristata*.

Las estructuras de los nuevos metabolitos aislados fueron elucidadas mediante el uso de técnicas espectroscópicas de resonancia magnética de protón (RMN ^1H) y carbono (RMN ^{13}C), incluyendo experimentos homonucleares, COSY (Correlated Spectroscopy) y ROESY (Rotating Frame Overhauser Effect Spectroscopy) y heteronucleares, HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) y HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation), infrarrojo (IR), ultravioleta (UV) y espectrometría de masas. Las estructuras de los compuestos anteriormente descritos se caracterizaron basándonos en sus datos espectroscópicos y comparación con los existentes en la bibliografía.

⁶⁶ Vande Velde, V.; Lavie, D.; Budhiraja, R. D.; Sudhir, S.; Garg, K. N. *Phytochemistry*, **1983**, 22, 2253.

⁶⁷ Sinha, S. C.; Ali, A.; Bagchi, A.; Sahai, M.; Ray, A. B. *Planta Med.*, **1987**, 53, 55.

⁶⁸ Fieser, L.; Fieser, M. *Steroids. Reinhold pubs*, **1950**.

⁶⁹ Joshi, D. V.; Boyce, S. F. *J. Org. Chem.*, **1957**, 22, 95.

⁷⁰ Kind, C. A.; Celentano, V. D. *J. Org. Chem.*, **1953**, 18, 1473.

A continuación pasamos a discutir la elucidación estructural de las nuevas withanolidas, aisladas de *Withania aristata*, que resultaron nuevos en la bibliografía química.

Withanolida W-1

El compuesto que hemos denominado **W-1** presentó una fórmula molecular de $C_{28}H_{36}O_5$, determinada mediante espectrometría de masas de alta resolución, fórmula que está de acuerdo con once grados de insaturación en el compuesto. En su espectro de IR se observaron bandas de absorción a 3429 y 1689 cm^{-1} , que indican la presencia de grupos hidroxilo y carbonilo α,β -insaturado, respectivamente. En el espectro de UV se puede observar una banda de absorción a 216 nm , característica de carbonilo α,β -insaturado. El espectro de masas de baja resolución presentó fragmentos correspondientes a la pérdida de agua (M^+-18 , 434 m/z) y de metilo ($M^+-18-15$, 419 m/z), así como un fragmento característico de una lactona (141 m/z , $C_7H_9O_3^+$).

Un cuidadoso estudio de los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C (Tablas 1 y 2) y de los experimentos bidimensionales $^1\text{H}-^1\text{H}$ (COSY) y $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ (HSQC) nos permitieron la asignación de las señales correspondientes a los protones existentes en la molécula.

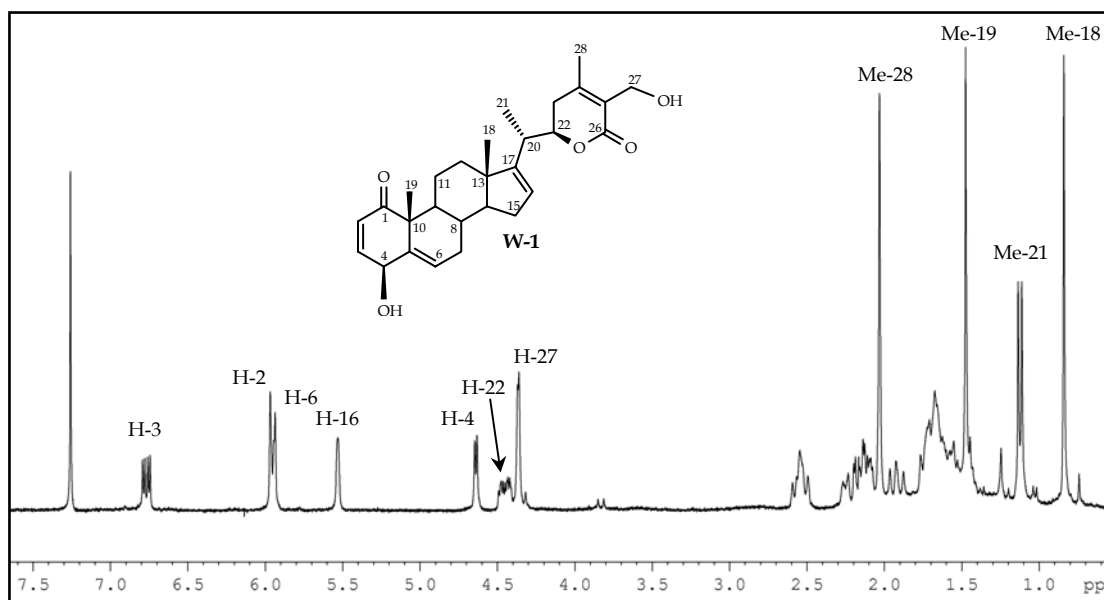


Figura 4.2.5. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de **W-1**.

Así, en su espectro de RMN de ^1H se observaron seis protones metínicos, cuatro de ellos olefínicos a $6.76 \delta_{\text{H}}$ (dd, $J= 4.4, 10.1$ Hz, H-3), $5.91 \delta_{\text{H}}$ (d, $J= 10.1$ Hz, H-2), $5.90 \delta_{\text{H}}$ (sa, H-6) y $5.51 \delta_{\text{H}}$ (sa, H-16) y los dos restantes protones sobre carbono unido a oxígeno a $4.61 \delta_{\text{H}}$ (d, $J= 4.4$ Hz, H-4) y $4.43 \delta_{\text{H}}$ (m, H-22). Así mismo, se observan señales correspondientes a un alcohol primario a $4.31, 4.36 \delta_{\text{H}}$ ($d_{\text{AB}}, J= 12.8$ Hz, H-27), a tres metilos singuletes, uno sobre doble enlace a $2.02 \delta_{\text{H}}$ (Me-28) y dos sobre carbonos alifáticos a $0.81 \delta_{\text{H}}$ (Me-18) y $1.44 \delta_{\text{H}}$ (Me-19) y un metilo como doblete a $1.10 \delta_{\text{H}}$ ($J= 6.9$ Hz, Me-21).

Estos datos fueron confirmados mediante RMN ^{13}C y experimentos DEPT 90 y 135 (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer), donde se observan señales para 28 carbonos distribuidos de la siguiente forma: cuatro carbonos de metilos a $16.2 \delta_{\text{C}}$ (C-18), $16.5 \delta_{\text{C}}$ (C-21), $19.7 \delta_{\text{C}}$ (C-28) y $22.5 \delta_{\text{C}}$ (C-19); seis carbonos metilénicos a $22.5 \delta_{\text{C}}$ (C-11), $30.5 \delta_{\text{C}}$ (C-15), $31.1 \delta_{\text{C}}$ (C-7), $32.6 \delta_{\text{C}}$ (C-23), $34.3 \delta_{\text{C}}$ (C-12) y $57.0 \delta_{\text{C}}$ (C-27); diez carbonos metínicos a $31.0 \delta_{\text{C}}$ (C-8), $35.6 \delta_{\text{C}}$ (C-20), $43.2 \delta_{\text{C}}$ (C-9), $56.9 \delta_{\text{C}}$ (C-14), $69.0 \delta_{\text{C}}$ (C-4), $78.8 \delta_{\text{C}}$ (C-22), $124.3 \delta_{\text{C}}$ (C-16), $128.7 \delta_{\text{C}}$ (C-2), $130.7 \delta_{\text{C}}$ (C-6) y $143.0 \delta_{\text{C}}$ (C-3) y ocho carbonos cuaternarios a $46.6 \delta_{\text{C}}$ (C-13), $49.3 \delta_{\text{C}}$ (C-10), $125.3 \delta_{\text{C}}$ (C-25), $138.6 \delta_{\text{C}}$ (C-5), $152.9 \delta_{\text{C}}$ (C-24), $155.2 \delta_{\text{C}}$ (C-17), $166.7 \delta_{\text{C}}$ (C-26) y $203.5 \delta_{\text{C}}$ (C-1).

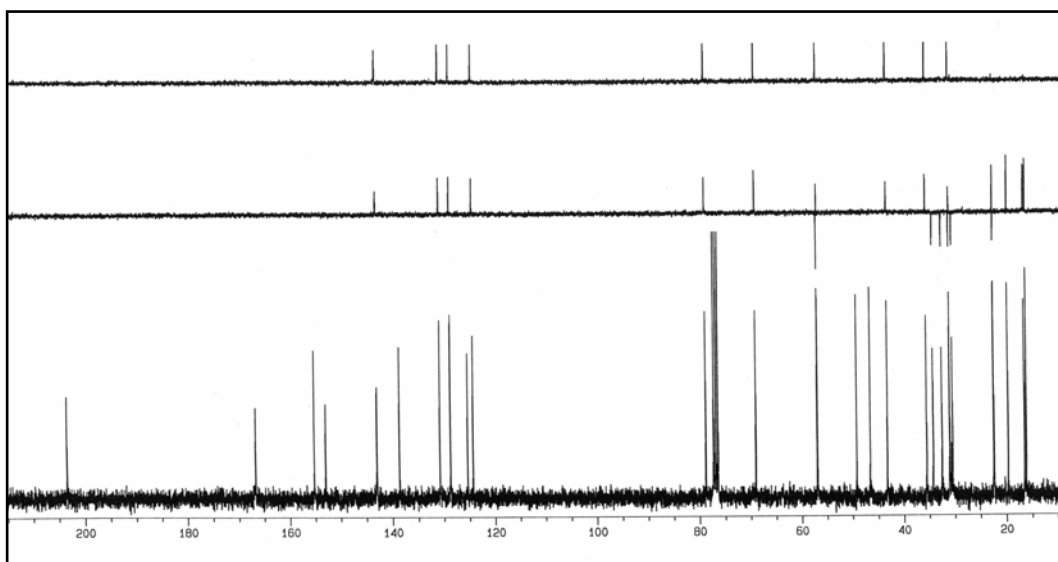


Figura 4.2.6. Espectro de RMN ^{13}C y experimentos DEPT (CDCl_3 , 100 MHz) de W-1.

El conjunto de estos datos nos indicaron que el producto **W-1** es una withanolida pentacíclica que presenta una 2-en-1-ona, una lactona α,β -insaturada, un alcohol secundario y dos dobles enlaces.

El estudio de los experimentos bidimensionales homonucleares (COSY y ROESY) y heteronucleares (HSQC y HMBC) nos permitieron establecer la posición y estereoquímica relativa de los diferentes grupos sobre la molécula.

El experimento ^1H - ^1H COSY confirmó la presencia de un sistema ABX en el anillo A, con acoplamiento entre los protones H-2, H-3 y H-4; así mismo, se observó correlación del protón H-6 con H-7, de H-15 con H-16, del metilo Me-21 con el protón H-20 y del protón H-22 con H-20 y H-23.

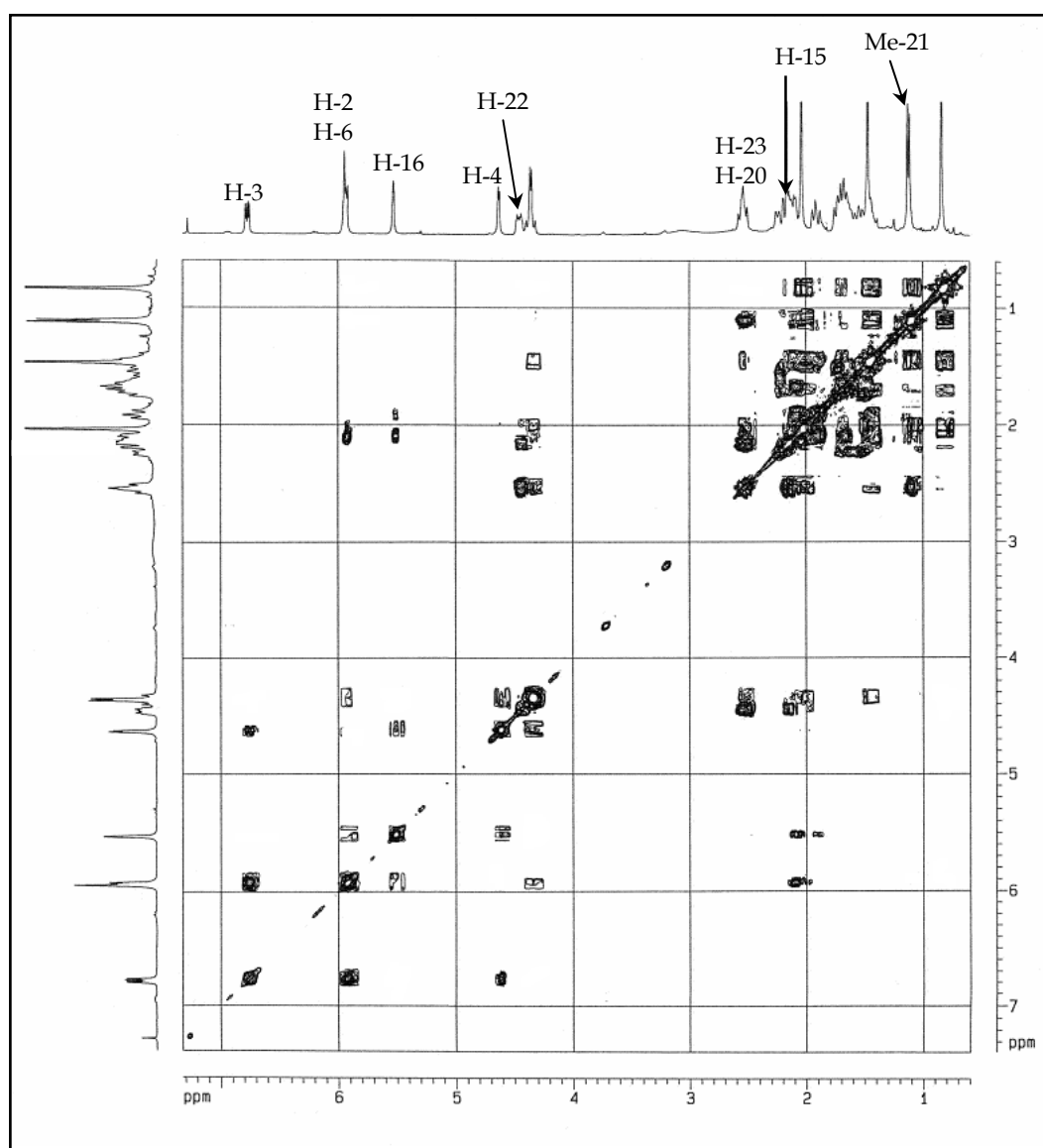


Figura 4.2.7. Experimento COSY de W-1.

La localización de los distintos grupos funcionales en la molécula se determinó a partir de las correlaciones a larga distancia observadas en un experimento HMBC. Así, las correlaciones del protón H-3 con C-1 y C-5; del protón H-4 con los carbonos C-2, C-6 y C-10; de H-6 con los carbonos C-4, C-8 y C-10 y las correlaciones entre el Me-19 y los carbonos C-1, C-5 y C-9, nos permitieron fijar los distintos grupos sobre los anillos A y B. La estructura del anillo D se estableció en base a las correlaciones de los hidrógenos de los metilos Me-18 y Me-21 con el carbono C-17. El anillo lactónico, característico de las withanolidas, fue confirmado por las correlaciones observadas, siendo las más significativas las de los protones geminales al alcohol primario H-27 y los carbonos C-24, C-25 y C-26, así como correlación de los hidrógenos del Me-28 con C-23 y C-25.

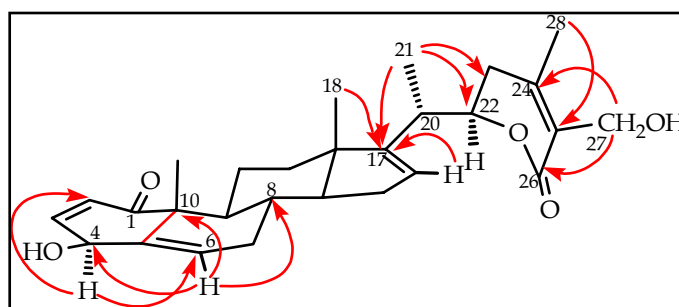


Figura 4.2.8. Correlaciones observadas en el experimento HMBC de W-1.

La estereoquímica relativa de **W-1** fue establecida por comparación con los datos obtenidos en la bibliografía para este tipo de compuestos⁷¹ y confirmada mediante un experimento ROESY, donde se observó efecto ROE entre los protones H-4 y H-9, lo que nos permitió establecer la estereoquímica del protón sobre el C-4 como H-4 α y por consiguiente el grupo hidroxilo sobre C-4 se situaría en β ; los protones metilénicos sobre C-7 se asignaron dado el efecto ROE observado entre los protones del metilo Me-18 β con H-8 β y de éste con H-7 β . Así mismo, se observó correlación entre el metilo Me-21 y H-22 y correlación entre el metilo Me-18 y H-20 y de este último con H-23 β , lo que nos permitió fijar los desplazamientos de los dos protones sobre el carbono C-23.

Estos datos nos permitieron establecer la estructura de **W-1** como **4 β ,27-hidroxi-1-oxo-witha-2,5,16,24-tetraenolida**.

⁷¹ Veleiro, A. S.; Burton, G.; Gros, E. G. *Phytochemistry*, **1985**, *24*, 1799.

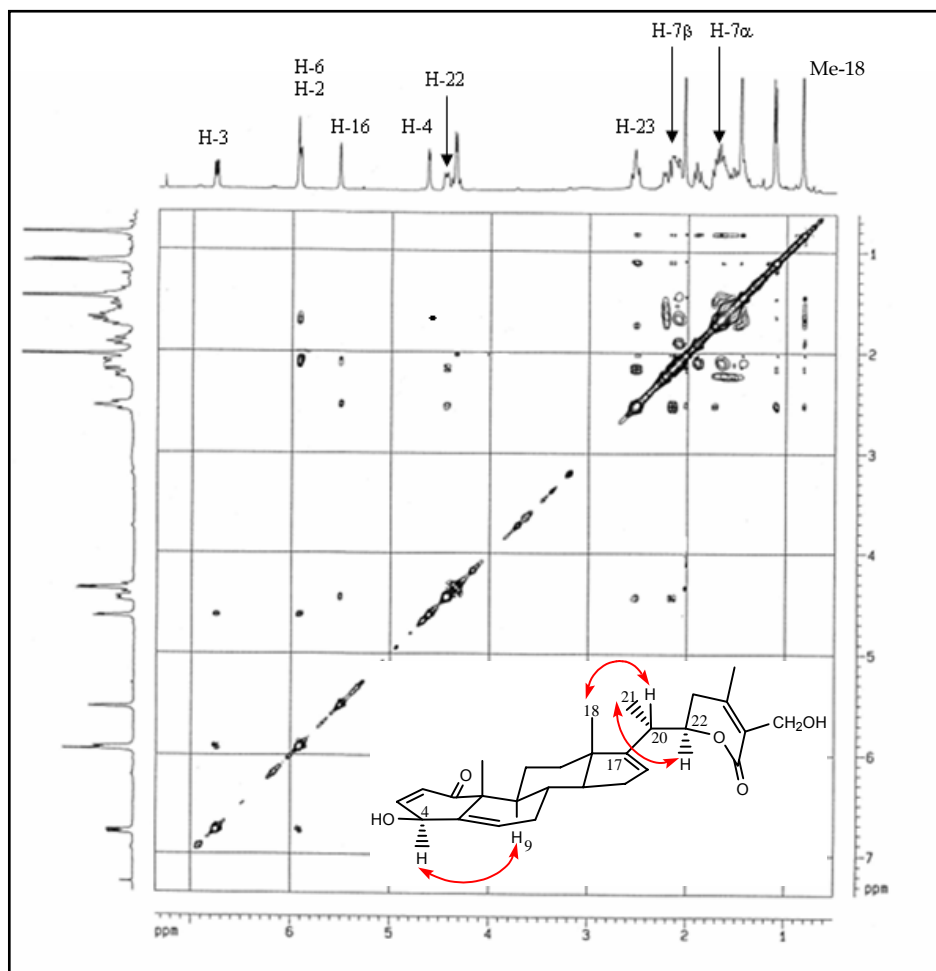


Figura 4.2.9. Experimento ROESY de W-1.

Withanolida W-2

La estructura del compuesto que hemos denominado **W-2** fue establecida mediante el análisis de sus datos espectroscópicos y espectrométricos, tal como se muestra a continuación. Su fórmula molecular $C_{28}H_{36}O_4$, fue fijada basándonos en sus datos de espectrometría de masas de alta resolución.

El estudio de los datos espectroscópicos de IR, UV, RMN de 1H y ^{13}C , nos indicó la presencia de un alcohol secundario, una lactona α,β -insaturada, una cetona α,β -insaturada, dos dobles enlaces y un alcohol secundario en un esqueleto de withanolida. Un estudio comparativo de los datos espectroscópicos de **W-1** y **W-2** mostró que ambos productos están relacionados, siendo la única diferencia en sus espectros de RMN de 1H y ^{13}C (Tablas 1 y 2) la ausencia de la señal asignada al alcohol primario sobre C-27 y presente en **W-1** ($4.31, 4.36 \delta_H$, $57.0 \delta_C$) y la presencia de una señal correspondiente a un metilo adicional en **W-2** [$1.88 \delta_H$ (3H, s, H-27) y $12.3 \delta_C$ (c, C-27)].

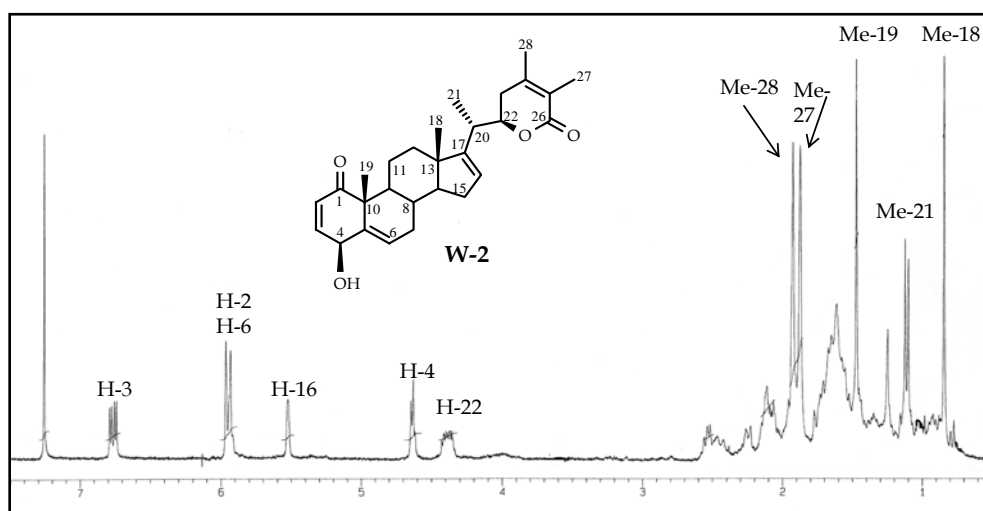


Figura 4.2.10. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de W-2.

La estructura propuesta fue confirmada mediante el estudio de los experimentos 2D homo (COSY y ROESY) y heteronucleares (HSQC y HMBC). Así, podemos destacar las correlaciones observadas, entre el metilo Me-27 y C-24, C-25 y C-26 en un experimento HMBC, lo que permitió fijar de forma inequívoca la presencia de un metilo en C-27 en el esqueleto de withanolida para W-2. El conjunto de estos datos nos permiten proponer la estructura de **4 β -hidroxi-1-oxo-witha-2,5,16,24-tetraenolida** para W-2.

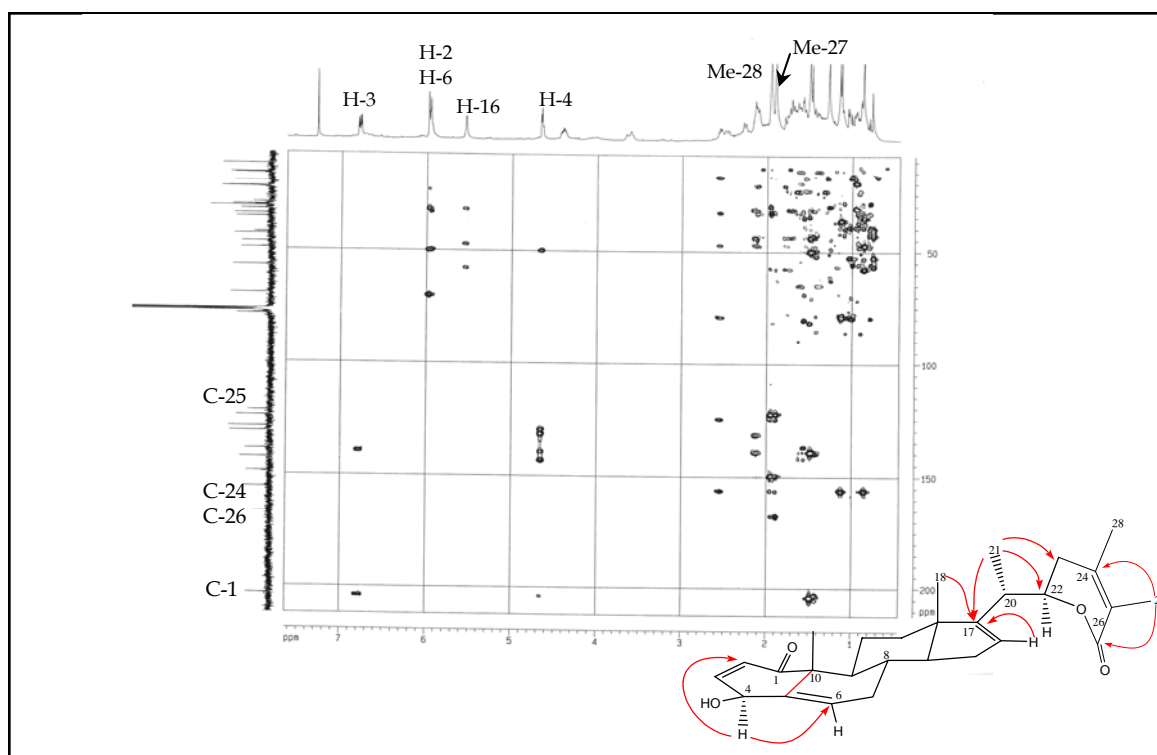


Figura 4.2.11. Experimento HMBC de W-2.

Determinación de la configuración absoluta de W-1 y W-2 mediante dicroísmo circular.

Existen diversos métodos para la determinación de la configuración absoluta. Los procedimientos más usados se basan en el uso de técnicas espectroscópicas: la cristalografía de Rayos X, el dicroísmo circular (DC) y la resonancia magnética nuclear (RMN). Aunque el análisis cristalográfico por Rayos X constituye una de las técnicas más fiables, su utilización está limitada a la necesidad de poseer monocristales adecuados, la incorporación en muchas ocasiones de átomos pesados en la estructura y el requerimiento de un equipo especializado. Los otros dos métodos (DC y RMN) se aplican en disolución, determinándose la configuración absoluta mediante correlación de unos determinados centros quirales de la molécula con el resto.

Un método particularmente útil para la determinación de configuraciones absolutas, dentro de las técnicas de **dicroísmo circular**, es el de **excitón quiralidad**. Este método se basa en la mecánica cuántica (figura 4.2.12) y fue aplicado por primera vez por Mason⁷² en 1966, para la determinación de la configuración absoluta de un producto natural.

Los Profesores Nakanishi y Harada^{73,74} pusieron a punto el “**método de la quiralidad del dibenzoato**”. Este método está basado en el hecho de que grupo benzoato presente en una molécula da lugar a una banda de absorción a 227 nm, pero cuando existen dos grupos, no necesariamente en posiciones 1, 2 pero que estén lo suficientemente próximos en el espacio, se produce una interacción entre ambos que da lugar a dos efectos Cotton de la misma amplitud ($\Delta\epsilon = 9-18$) pero de signos opuestos a 233 nm y 219 nm (curva bi-signada).

Este tipo de acoplamiento debidos a las interacciones del dipolo-dipolo entre los momentos de transición electrónica de dos grupos cromóforos, se denomina excitón o acoplamiento Davydov. Si los grupos cromóforos están en una disposición tal que nos dan un ángulo de torsión en sentido de las agujas del reloj, se dice que existe una quiralidad positiva y existirá un máximo a 233 nm y un mínimo a 219 nm y consecuentemente, si se da el hecho opuesto se dice que hay una quiralidad negativa

⁷² Mason, S. F.; Vane, G. W. *J. Chem. Soc.*, **1966**, 370-374.

⁷³ Harada, N.; Nakanishi, K. *Acc. Chem. Res.*, **1972**, 5, 257-263.

⁷⁴ Harada, N.; Nakanishi, K. *Circular Dichroism Spectroscopy Exciton Coupling in Organic Spectroscopy*. **1983**, University Science Book: Mill Valley.

(figura 4.2.13). Este método se puede generalizar usando otros grupos cromóforos, como por ejemplo benzoatos y benzoatos *para*-sustituídos. El método se puede aplicar cuando la molécula tiene tres cromóforos, en cuyo caso se produce una combinación de efectos, que bien da lugar a la suma o a una cancelación de los mismos.

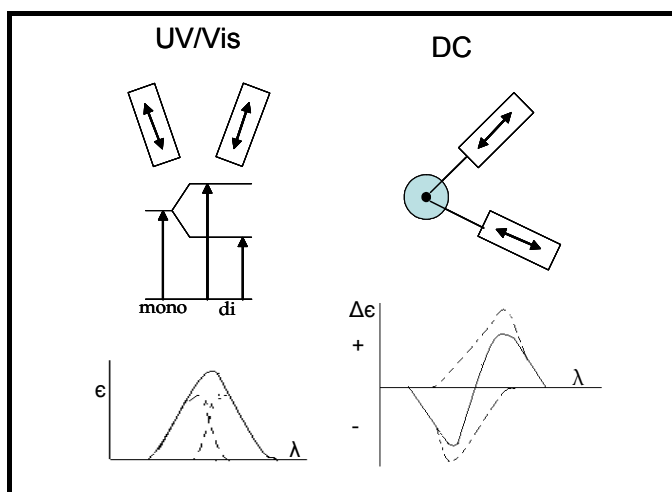


Figura 4.2.12. Método del excitón quiralidad. La orientación oblicua de los dos grupos cromóforos (rectángulos) y de ambos momentos dipolares (flechas de doble sentido), origina un ensanchamiento o división de la banda de absorción en el espectro de UV o visible, debido a la interacción de los dos cromóforos. Si los momentos dipolares no son coplanares, la curva de dicroísmo muestra un efecto Cotton positivo y otro negativo.

La rapidez, sencillez, fiabilidad y la poca cantidad de muestra necesaria, unido a que las withanolidas presentan grupos cromóforos como sistemas enónicos, hace que estos metabolitos sean susceptibles al análisis por técnicas de dicroísmo circular.

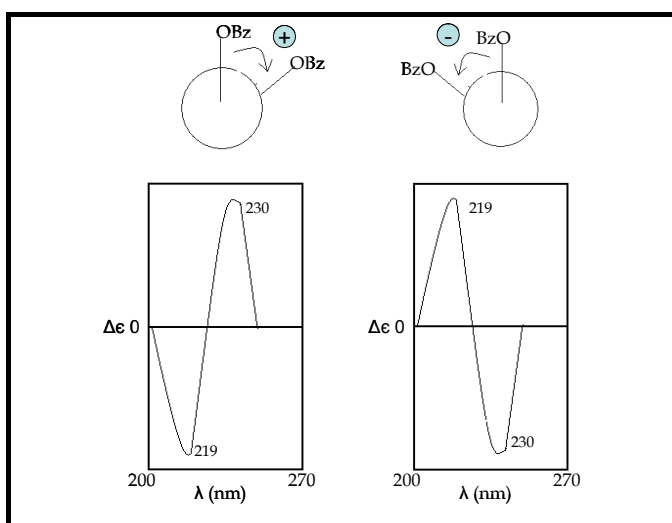


Figura 4.2.13. Determinación de la configuración absoluta por el "método de la quiralidad del dibenzoato". Se observa que según la disposición de los grupos benzoatos se obtienen diferentes efectos Cotton.

La configuración absoluta del grupo hidroxilo sobre C-4 en withanolidas con un doble enlace en los carbonos C5-C6 ha sido poco estudiada, de hecho, no se encuentra en la bibliografía ningún ejemplo en el que se haya aplicado la difracción de Rayos X a un monocristal. Como base para establecer la configuración absoluta en este centro, sólo se ha utilizado consideraciones biogénicas.

Así, la configuración absoluta de los compuestos **W-1** y **W-2** se determinó mediante dicroísmo circular (DC). Ambos compuestos presentan un amplio efecto Cotton negativo entorno a 335 nm, correspondiente a la transición $n-\pi^*$ del cromóforo enona, así como un amplio efecto Cotton positivo entorno a 240 nm, asignado a la superposición de las transiciones $\pi-\pi^*$ de la enona y $n-\pi^*$ del sistema α,β -insaturado de la δ -lactona, indicando que ambos compuestos pertenecen a la misma serie enantiomérica. Además, la estereoquímica del anillo lactónico se determinó a partir del efecto Cotton positivo a 240 nm (**W-1**, $\Delta\epsilon = +2.0$; **W-2**, $\Delta\epsilon = +2.6$). De acuerdo a las correspondientes reglas para cetonas, el efecto Cotton positivo está de acuerdo con la configuración absoluta de $2R$, como ya fue determinada para la jaborosalactona A^{75} , cuya configuración absoluta había sido determinada a su vez por comparación con el ácido parasorbico. Las cuatro moléculas mostraron intensidad casi idéntica a esta longitud de ondas^{76,77,78}. En general, las withanolidas, muestran los efectos Cotton positivos para las transiciones $n-\pi^*$ del cromóforo enona entorno a 340 nm. Sin embargo, los compuestos **W-1** y **W-2** presentan el signo opuesto. Esto podría ser debido a la ausencia de la función $5\beta,6\beta$ -epoxi presente en muchas withanolidas⁷⁹.

Con la finalidad de determinar la configuración absoluta del grupo hidroxilo sobre C-4 sin ambigüedad, se preparó el derivado *p*-bromobenzoilado (según se detalla en el apartado 5.2.4.), con un segundo grupo cromóforo en C-4 del compuesto **W-1**, protegiendo previamente el alcohol primario (según se indica en el esquema) y aplicar, posteriormente, el método de excitón quiralidad^{80,81}.

⁷⁵ Hirayama, M.; Gamoh, K.; Ikekawa, N. *J. Am. Chem. Soc.*, **1982**, *104*, 3735.

⁷⁶ Lavie, D.; Kirson, I.; Glotter, E.; Snatzke, G. *Tetrahedron*, **1970**, *26*, 2221.

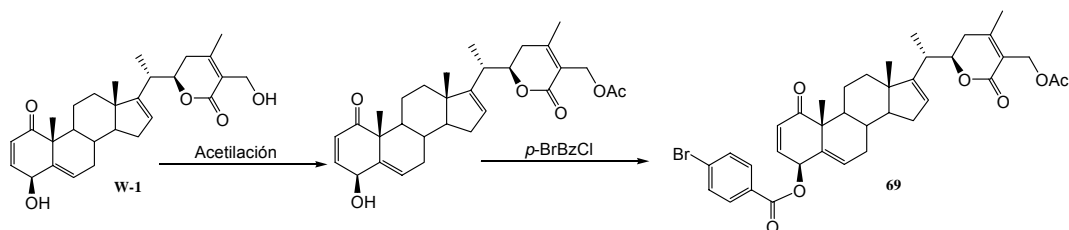
⁷⁷ Snatzke, G. *Angew. Chem. Internat. Edit.*, **1968**, *7*, 14.

⁷⁸ Snatzke, G.; Snatzke, F. *The Carbonyl Chromophore: Unsaturated Ketones and Lactones in Fundamental Aspects and Recent Developments in Optical Rotatory Dispersion and Circular Dichroism*; Ciardelli, F., Salvadori, P. (Eds.); Heyden & Son Ltd.: New York, **1973**.

⁷⁹ Kuroyanagi, M.; Shibata, K.; Umehara, K. *Chem Pharm. Bull.*, **1999**, *47*, 1646.

⁸⁰ Harada, N.; Nakanishi, K. *Circular Dichroic Spectroscopy-Exciton Coupling in Organic Stereochemistry*; University Science Books: Mill Valley, CA, **1983**.

⁸¹ Nakanishi, K.; Berova, N. *The Exciton Chirality Method in Circular Dichroism: Principles and Applications*;



El espectro de DC del derivado con el grupo cromóforo sobre C-4 (**69**), mostró un efecto Cotton positivo a 243 nm ($\Delta\epsilon = +25.1$), adicional al efecto Cotton negativo esperado a 345 nm ($\Delta\epsilon = -1.5$). Las interacciones excitón positivas, con la participación de la banda 1L_a del cromóforo *p*-bromobenzoato y las transiciones $\pi-\pi^*$ del doble enlace en los cromóforos enona, están de acuerdo con la configuración absoluta 4*S* y por extensión, también se determina la configuración absoluta de los carbonos estereogénicos en los anillos A-D como se muestra en la Figura.

El análisis de DC nos permitió determinar la configuración absoluta de las withanolidas **W-1** y **W-2**, datos que están de acuerdo con la configuración absoluta dada para withaferina A por análisis rayos X⁸².

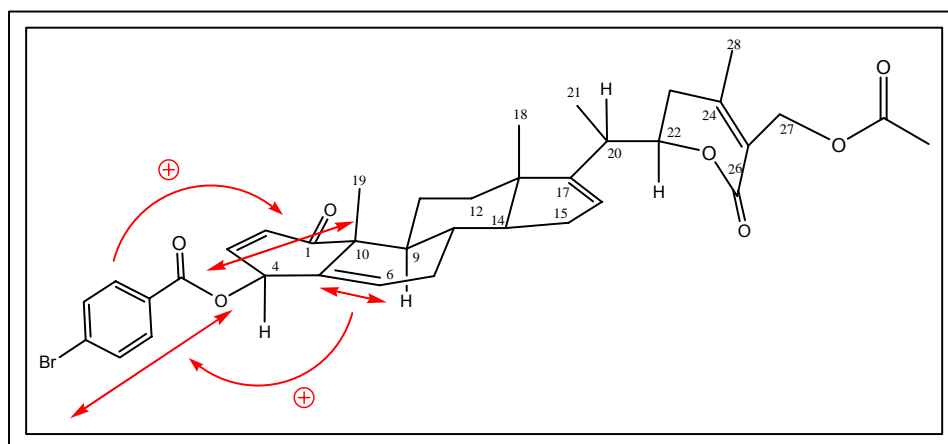


Figura 4.2.14. Dicroísmo circular del derivado *p*-bromobenzoilado en C-4.

Withanolida W-3

Al compuesto que hemos denominado **W-3** le hemos asignado la fórmula molecular $C_{28}H_{34}O_5$, fijada basándonos en sus datos de espectrometría de masas de alta resolución, fórmula que indica la presencia en el compuesto de doce grados de insaturación. En el estudio de su espectro de IR se observó la presencia de bandas de

Nakanishi, K.; Berova, N.; Woody, R. W. (Eds.); VCH Publishers: New York, 1994.

⁸² Kupchan, S. M.; Koskotch, R. W.; Bollinger, P.; McPhail, A. J.; Sim, G. A.; Saenz Renauld, J. A. *J. Am. Chem. Soc.*, 1965, 87, 5805.

absorción correspondientes a grupo hidroxilo (3446 cm^{-1}) y carbonilo α,β -insaturado (1694 cm^{-1}), este último confirmado además por la presencia de una banda de absorción característica a 218 nm en su espectro de UV.

El análisis de los datos espectroscópicos del compuesto **W-3**, indicaron que presentaba dos cetonas, una lactona, cuatro dobles enlaces y un alcohol primario. Comparación de los datos de RMN ^1H y ^{13}C (Tablas 1 y 2) con los del producto **W-1**, mostró que ambos productos están relacionados, siendo la única diferencia la oxidación del alcohol secundario sobre C-4 en **W-3** con respecto a **W-1**. Así, se observó en su espectro de RMN de ^{13}C una señal a $187.7\ \delta_{\text{C}}$ (s, C-4) y la correspondiente desaparición en los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de las señales asignadas al alcohol secundario sobre C-4 presentes en **W-1** a $4.61\ \delta_{\text{H}}$ (1H, d, $J = 4.4\text{ Hz}$, H-4) y $69.0\ \delta_{\text{C}}$ (d, C-4).

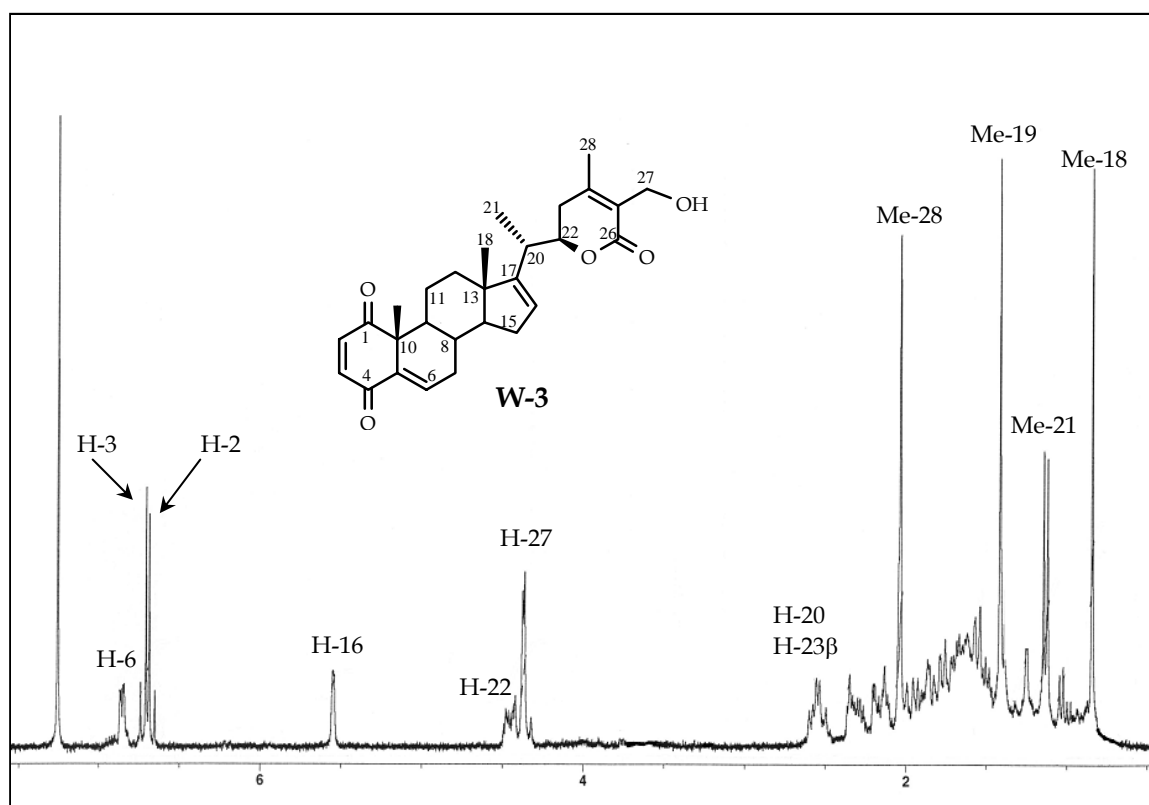


Figura 4.2.15. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de **W-3**.

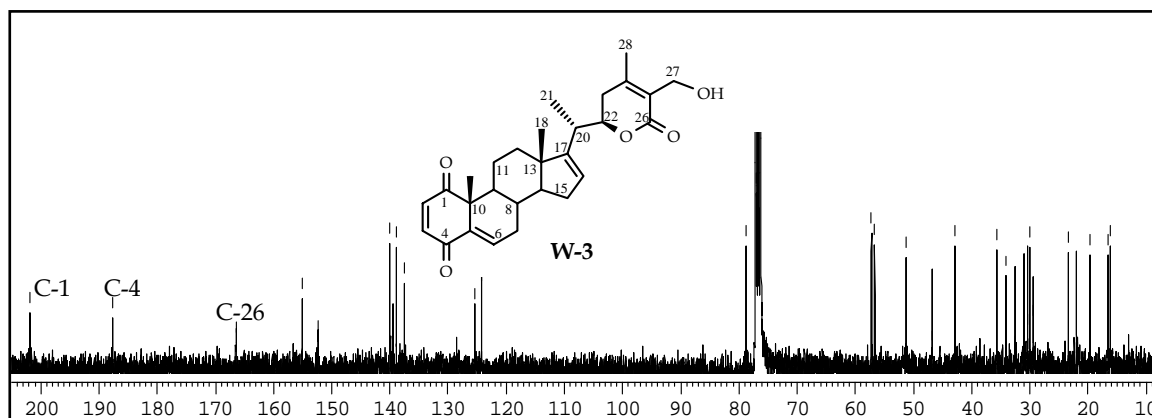


Figura 4.2.16. Espectro de RMN ^{13}C y DEPT (CDCl_3 , 100 MHz) de W-3.

La regiosustitución en los anillos A y B se confirmó mediante un experimento HMBC, en el que se observó correlación de los protones H-2 y H-3 con los carbonos C-4 y C-1, respectivamente; correlación entre el protón H-6/C-4, C-8, C-10 y del metilo Me-19/C-1, C-5, C-9.

El conjunto de estos datos, junto con el estudio de los experimentos COSY, ROESY y HSQC, nos permitió establecer la estructura de nuestro producto como **27-hidroxi-1,4-dioxo-witha-2,5,16,24-tetraenolida**.

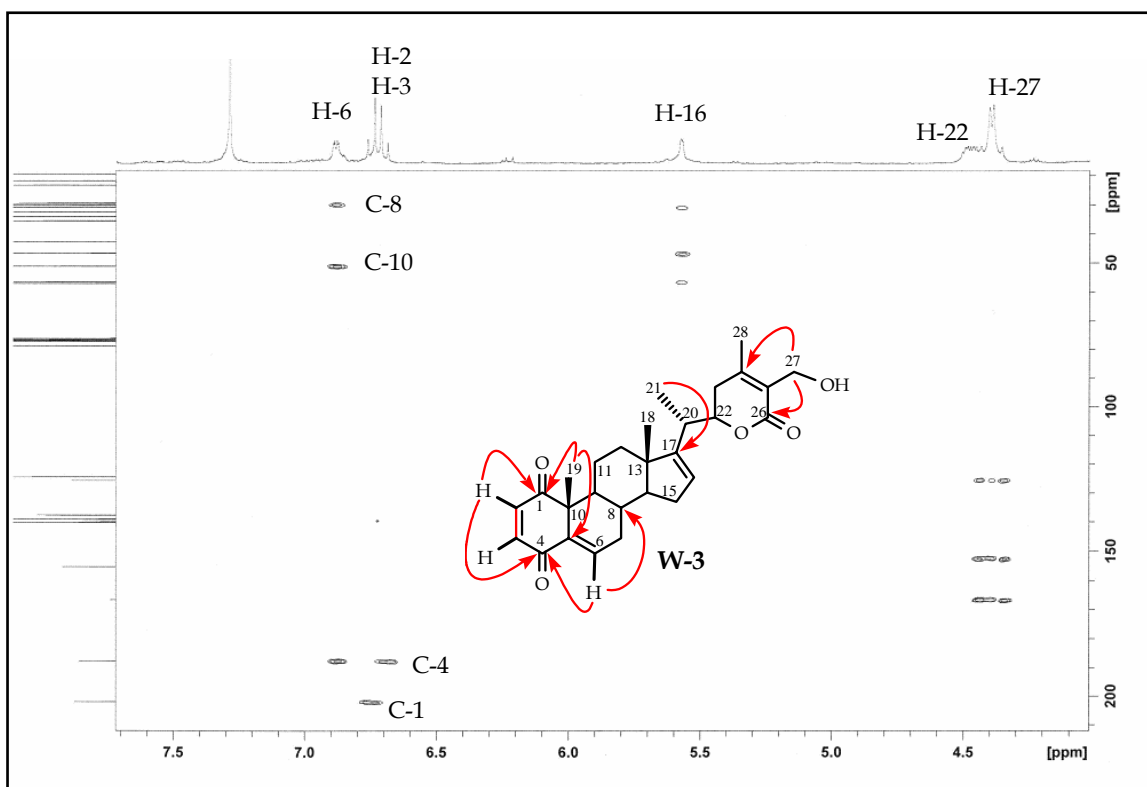


Figura 4.2.17. Ampliación del experimento HMBC de W-3.

Los metabolitos que hemos denominado **W-1** a **W-3**, presentan una estructura de oxo-withatetraenolida, que poseen junto con los usuales dobles enlaces en C-2 y C-24, insaturaciones en C-5 y C-16, a diferencia del grupo de withanolida mas extenso que presentan un epóxido en C5-C6.

Withanolida W-4

El compuesto que hemos denominado **W-4** presentó una fórmula molecular de $C_{28}H_{36}O_6$, determinada mediante espectrometría de masas de alta resolución, fórmula que está de acuerdo con once grados de insaturación en el compuesto. En su espectro de IR se observaron bandas de absorción a 3420 y 1688 cm^{-1} , que indican la presencia de grupos hidroxilo y carbonilo α,β -insaturado, respectivamente. En el espectro de UV se puede observar una banda de absorción a 212 nm, característica de carbonilo α,β -insaturado.

Un cuidadoso estudio de los espectros de RMN de 1H y ^{13}C (Tablas 1 y 2) y de los experimentos bidimensionales, nos permitieron establecer la estructura de **W-4**.

Así, en su espectro de RMN de 1H se observaron señales correspondientes a seis protones metínicos, tres de los cuales forman un sistema ABX a 6.78 δ_H (dd, $J= 4.5, 10.1$ Hz), 5.96 δ_H (d, $J= 10.1$ Hz) y 4.64 δ_H (d, $J= 4.5$ Hz) asignadas a los protones H-3, H-2 y H-4, respectivamente y señales correspondientes a un protón olefínico a 5.95 δ_H (sa, H-6) y a dos alcoholes secundarios a 4.72 δ_H (sa, H-16) y 5.41 δ_H (dd, $J= 3.5, 12.8$ Hz, H-22). Así mismo, se observaron señales correspondientes a un alcohol primario a 4.38, 4.43 δ_H (2H, $d_{AB}, J= 12.4$ Hz, H-27) y cuatro metilos singuletes a 2.03 δ_H (Me-28), 1.84 δ_H (Me-21), 1.46 δ_H (Me-19) y 0.93 δ_H (Me-18).

Estos datos fueron confirmados en su espectro de RMN ^{13}C , donde se observaron señales para 28 carbonos. La asignación inequívoca de todas las señales de RMN 1H y ^{13}C de la molécula se realizó mediante un cuidadoso análisis de los experimentos DEPT, HMBC y HSQC, lo que nos permitió concluir que el producto **W-4** es una withanolida pentacíclica que presenta una cetona y una lactona α,β -insaturadas, dos alcoholes secundarios, un alcohol primario y dos dobles enlaces.

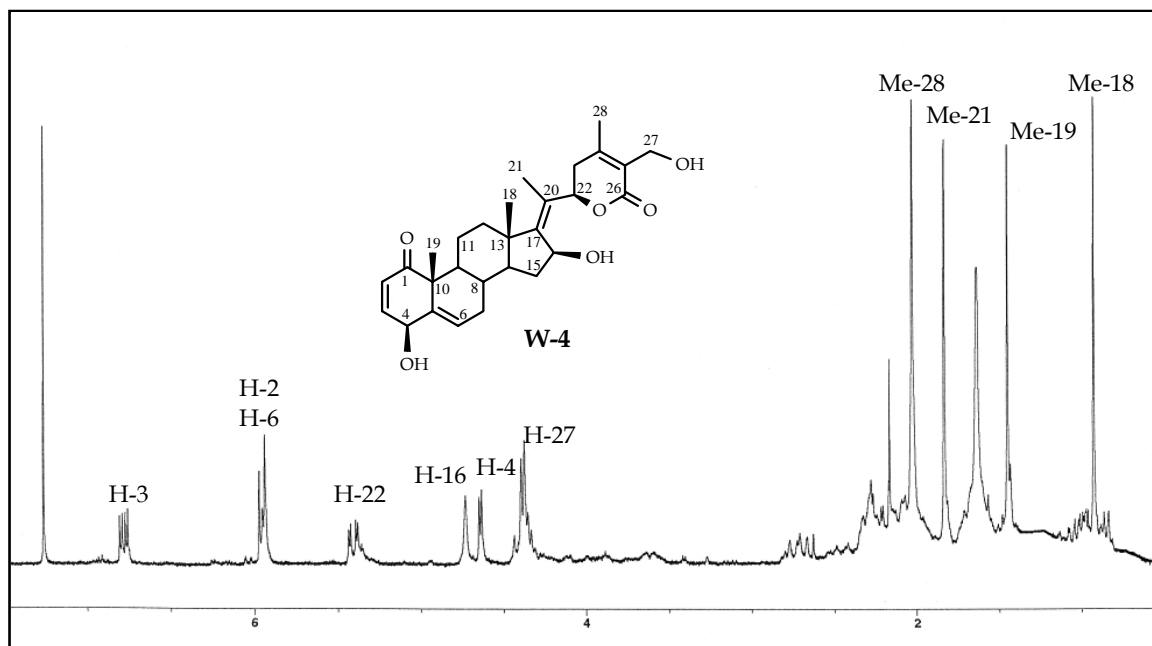


Figura 4.2.18. Espectro de RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) de W-4.

El análisis del experimento HMBC nos permitió situar cada uno de los grupos sobre el esqueleto de withanolida. Así, las correlaciones observadas de H-2/C-4, H-4/C-2, C-3, C-5, C-10, H-6/C-4, C-8, C-10, y Me-19/C-1, C-5, C-9, C-10, nos permitieron establecer la estructura de **4β-dihidroxi-2,5-dien-1ona** para los anillos A y B de W-4. La lactona hexacíclica α,β-insaturada (anillo E) que presenta un alcohol primario se confirmó mediante las correlaciones observadas de los protones geminales al alcohol primario sobre C-27 con C-24, C-25 y C-26 y las correlaciones del Me-28 con C-23, C-24, C-25 y C-26.

La regiosustitución del doble enlace y del alcohol secundario en el anillo D y la cadena lateral, se determinó mediante las siguientes correlaciones a tres enlaces: correlación de la señal a 0.93 δ_H (Me-18) con las señales de los carbonos a 52.5 δ_C (C-14) y 151.3 δ_C (C-17); el metilo sobre doble enlace a 1.84 δ_H (Me-21) se correlacionó con los carbonos a 151.3 δ_C (C-17) y 77.8 δ_C (C-22) y el protón geminal al grupo hidroxilo a 4.72 δ_H (H-16) se correlacionó con los carbonos a 44.4 δ_C (C-13), 52.5 δ_C (C-14), 151.3 δ_C (C-17) y a 129.2 δ_C (C-20).

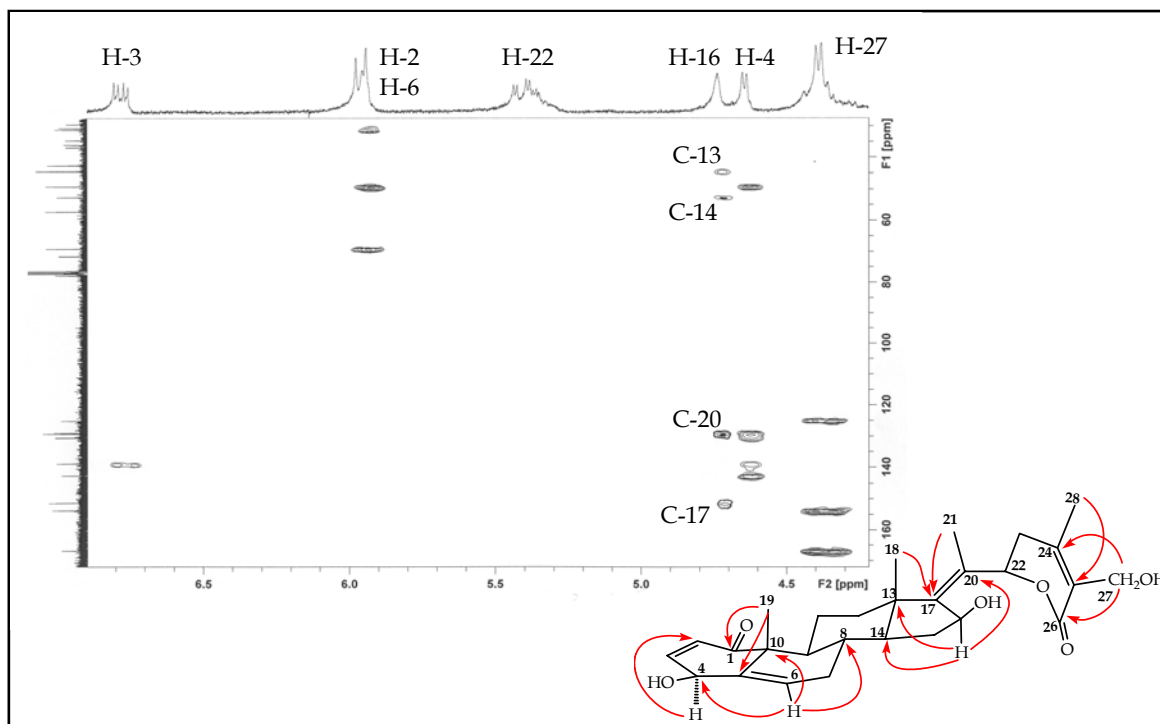


Figura 4.2.19. Ampliación del experimento HMBC de W-4.

La estereoquímica relativa del grupo hidroxilo sobre C-4 se estableció como β basándonos en la comparación de las constantes de acoplamiento con la de los compuestos anteriores y los datos espectroscópicos encontrados en la bibliografía, mientras que la del alcohol secundario sobre C-16 y el doble enlace C17-C20 se estableció mediante un experimento ROESY, donde se observó correlación entre H-16 y H-14 α y del Me-21 con Me-18 y H-12 β . Estos datos nos permitieron establecer la estructura del producto W-4 como $4\beta,16\beta,27$ -trihidroxi-1-oxo-witha-2,5,17,24-tetraenolida.

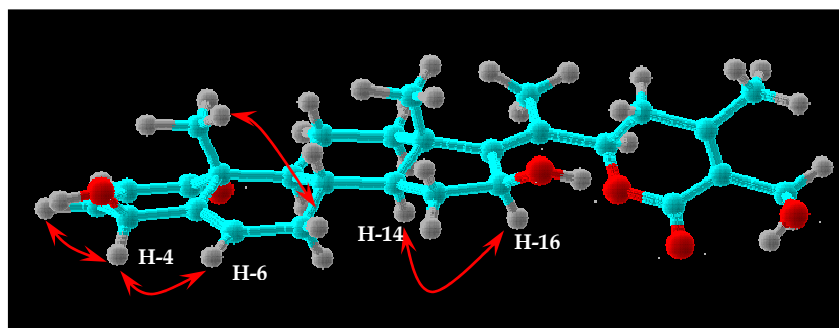


Figura 4.2.20. Efectos ROE observados en el experimento ROESY de W-4.

Withanolida W-5

La estructura del compuesto que hemos denominado como **W-5** fue establecida mediante el análisis de sus datos espectroscópicos y espectrométricos, tal como se muestra a continuación. Su fórmula molecular $C_{28}H_{36}O_5$, fue fijada basándonos en sus datos de espectrometría de masas de alta resolución.

El estudio de los datos espectroscópicos de IR, UV, RMN de 1H y ^{13}C , nos indicó la presencia de un alcohol secundario, una lactona α,β -insaturada, una cetona α,β -insaturada, dos dobles enlaces y un alcohol primario en un esqueleto de withanolida. Un estudio comparativo de los datos espectroscópicos de **W-4** y **W-5** mostró que ambos productos presentan como principal diferencia en sus espectros de RMN de 1H y ^{13}C (Tablas 1 y 2) la ausencia de la señal asignada al alcohol secundario sobre C-4 presente en **W-4** a $4.64 \delta_H$ (1H, d, $J= 4.5$ Hz, H-4) y $69.1 \delta_C$ (d, C-4) y la presencia de una señal correspondiente a un metileno adicional en **W-5** [$2.86 \delta_H$ (1H, dd, $J= 5.0, 21.0$ Hz, H-4 α) y $3.32 \delta_H$ (1H, dd, $J= 2.4, 21.0$ Hz, H-4 β) y $33.2 \delta_C$ (t, C-4)], datos que sugieren que el compuesto **W-5** es un 4-dehidroxi derivado de **W-4**.

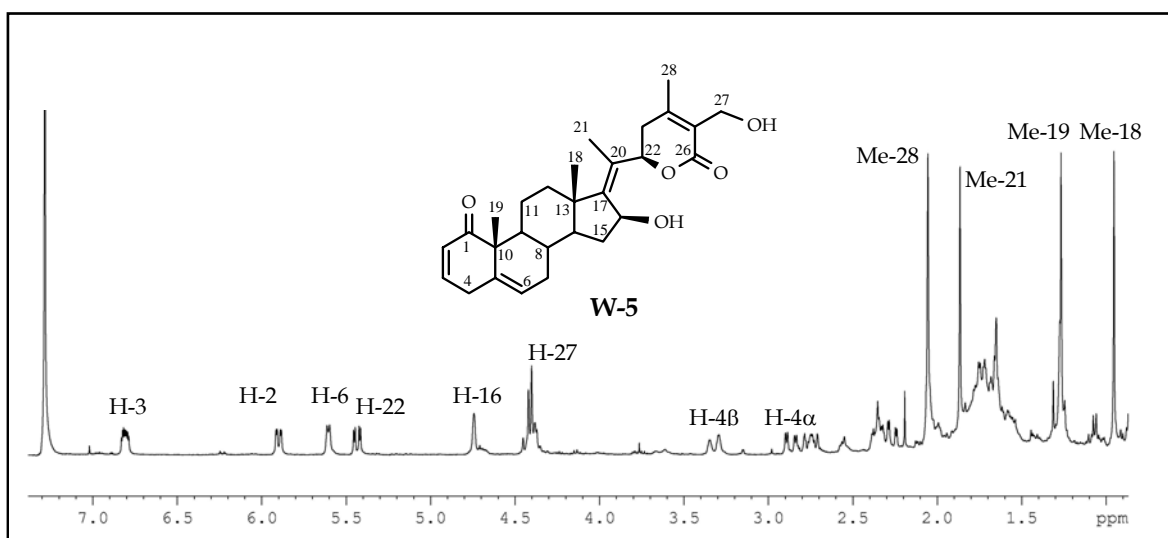


Figura 4.2.21. Espectro de RMN 1H ($CDCl_3$, 400 MHz) de **W-5**.

La asignación de los protones sobre el carbono C-4 se estableció mediante un experimento ROESY, donde se observó correlación entre H-4 β y el metilo Me-19. La estructura propuesta fue confirmada mediante el estudio de los experimentos bidimensionales homo (COSY y ROESY) y heteronucleares (HSQC y HMBC). Así,

podemos destacar las correlaciones observadas entre el protón H-4 α con C-2, C-3, C-5 y C-6 en un experimento HMBC, lo que permitió fijar de forma inequívoca la presencia del metileno en C-4 en el esqueleto de withanolida para **W-5**. Estos datos nos permitieron establecer la estructura del producto **W-5** como **16 β ,27-dihidroxi-1-oxo-witha-2,5,17,24-tetraenolida**.

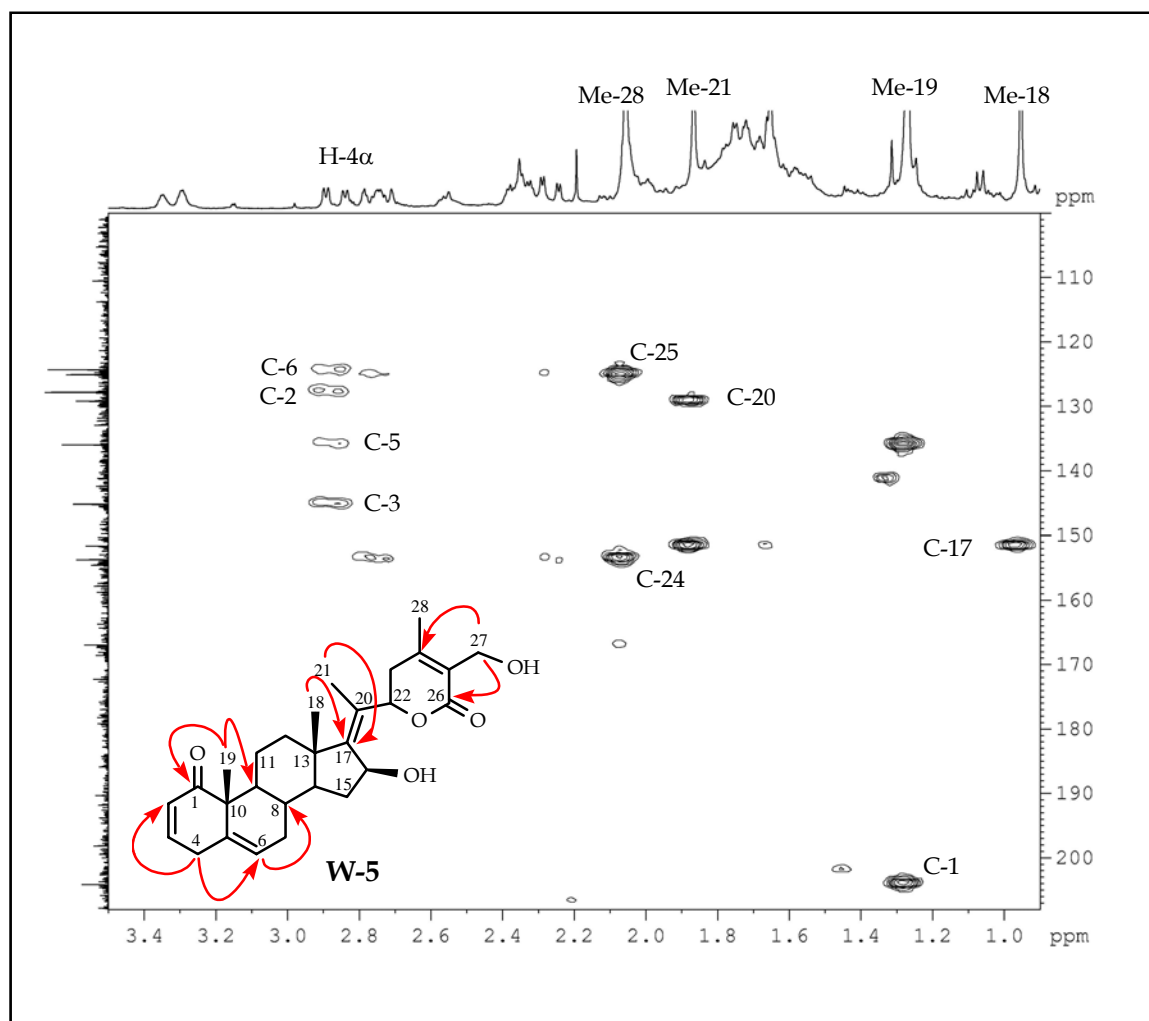


Figura 4.2.22. Ampliación del experimento HMBC de **W-5**.

Withanolida **W-6**

El compuesto que hemos denominado **W-6** presentó una fórmula molecular de $C_{28}H_{34}O_6$, determinada mediante espectrometría de masas de alta resolución. En su espectro de IR y UV se observaron bandas de absorción que indican la presencia de grupos hidroxilo y carbonilo α,β -insaturado.

El análisis de sus datos espectroscópicos, indicó que presentaba dos cetonas, una lactona, cuatro dobles enlaces y dos alcoholes, uno primario y otro secundario. Comparación de los datos de RMN ^1H y ^{13}C (Tablas 1 y 2) con los del producto **W-4**, mostró que ambos productos están relacionados, siendo la única diferencia la oxidación del alcohol secundario sobre C-4 en **W-6** con respecto a **W-4**. Así, se observó en los datos de RMN de ^1H y ^{13}C de **W-6** una señal a 187.8 δ_{C} (s, C-4) y la correspondiente desaparición de las señales asignadas al alcohol secundario sobre C-4 presente en **W-4** a 4.64 δ_{H} (1H, d, $J = 4.5$ Hz, H-4) y 69.1 δ_{C} (d, C-4), lo que sugiere que **W-6** es un 4-oxo derivado de **W-4**.

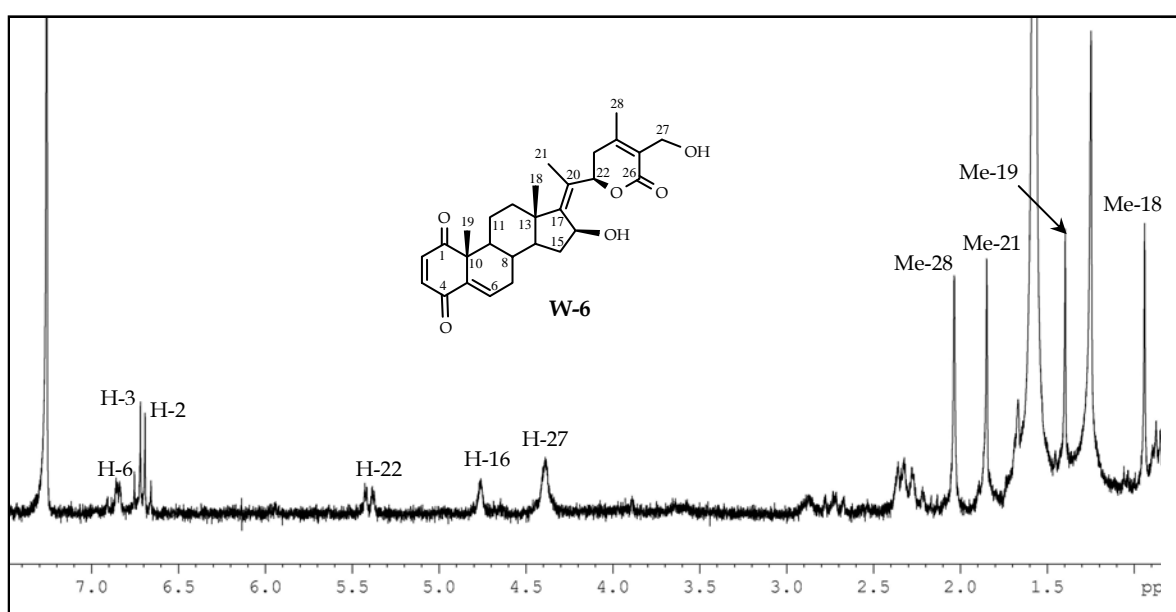


Figura 4.2.23. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de **W-6**.

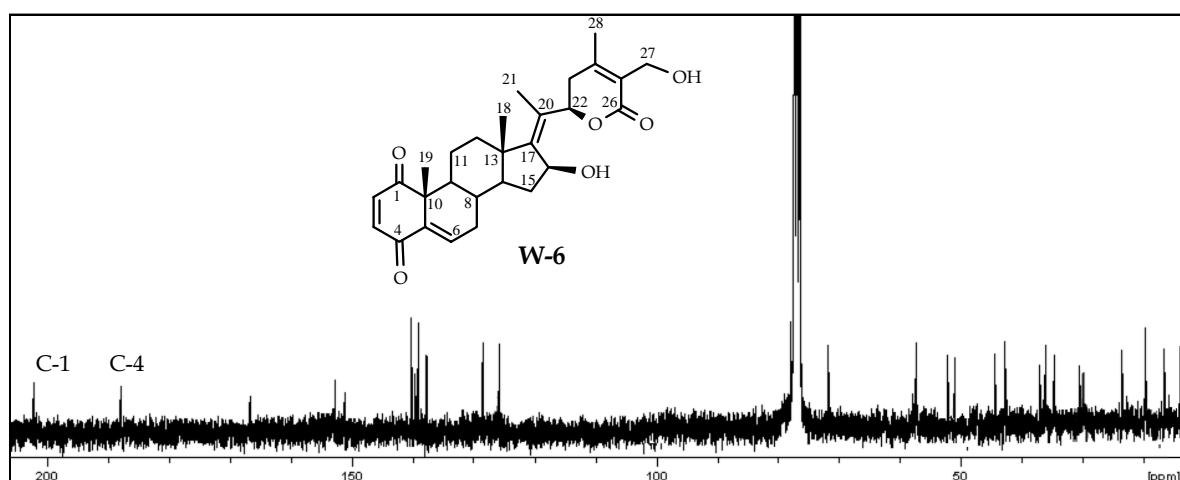
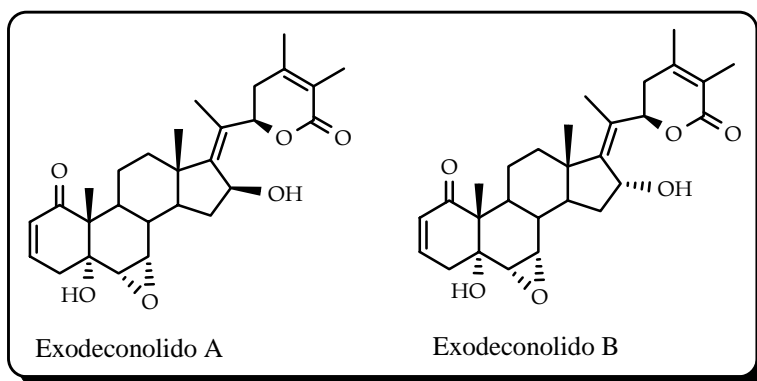


Figura 4.2.24. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) de **W-6**.

La regiosustitución en los anillos A y B se confirmó mediante un experimento HMBC, que presentó correlación de los protones H-2 y H-3 con los carbonos C-4 y C-1, respectivamente; correlación entre el protón H-6 y C-4, C-8 y C-10 y del metilo Me-19 con C-1, C-5 y C-9. El conjunto de estos datos, junto con el estudio de los experimentos COSY, ROESY y HSQC, nos permitió establecer la estructura de nuestro producto como **16 β ,27-dihidroxi-1,4-dioxo-witha-2,5,17,24-tetraenolida**.

Los metabolitos que aislamos y denominamos **W-4** a **W-6** representan los primeros ejemplos de withanolidas con doble enlace C5-C6 y un sistema 17-en-16 β -ólico. Revisada la bibliografía, sólo encontramos descritos dos metabolitos, aislados de *Exodeconus maritimus*⁸³, que presentan un doble enlace C17-C20 y un hidroxilo en C-16, pero con un grupo epóxido en los carbonos C6-C7.



⁸³ Gil, R. R.; Misico, R. I.; Sotes, I. R.; Oberti, J. C.; Veleiro, A. S.; Burton, G. J. *Nat. Prod.* **1997**, *60*, 568.

Tabla 1. Datos^a de RMN ¹H (δ, CDCl₃) de W-1 a W-6.

Protón	W-1	W-2	W-3	W-4	W-5	W-6
2	5.91 d (10.1)	5.95 d (10.0)	6.67 d (10.3)	5.96 d (10.1)	5.88 dt (2.6, 10.0)	6.67 d (10.3)
3	6.76 dd (4.4, 10.1)	6.77 dd (4.5, 10.0)	6.73 d (10.3)	6.78 dd (4.5, 10.1)	6.78 ddd (2.4, 5.0, 10.0)	6.73 d (10.3)
4	4.61 d (4.4)	4.64 d (4.5)		4.64 d (4.5)	2.86 dd (5.0, 21.0) ^α 3.32 dd (2.4, 21.0) ^β	
6	5.90 sa	5.92 sa	6.86 dd (2.2, 5.9)	5.95 sa	5.58 d (8.0)	6.87 dd (2.0, 5.7)
7	1.43* m 2.08 m	1.68 m 2.01 m	1.86 m 2.32 m	1.72 m 2.13 m	1.65 m 2.00 m	1.85 m 2.32* m
8	1.89 m	1.91 m	1.72 m	1.66* m	1.70* m	1.62 m
9	1.64 m	1.65 m	1.87 m	1.65 m	1.72* m	1.87 m
11	1.57 m 2.21 m	1.44 m 2.23 m	1.56 m 2.34 m	1.67 m 2.30 m	1.72* m 2.37 m	1.67 m 2.31 m
12	1.50 m 1.71 m	1.52 m 1.73 m	1.96 m 2.15 m	1.71 m 2.34 m	1.70* m 2.34 m	1.69* m 2.32* m
14	1.43* m	1.43 m	1.51 m	1.66* m	1.64 m	1.69* m
15	1.55 m 2.13 m	1.56 m 2.10 m	1.57 m 1.78 m	1.64 m 2.36 m	1.85 m 2.64 m	1.75 m 2.36 m
16	5.51 sa	5.53 sa	5.55 sa	4.72 sa	4.72 sa	4.76 sa
18	0.81 s	0.85 s	0.85 s	0.93 s	0.96 s	0.97 s
19	1.44 s	1.48 s	1.42 s	1.46 s	1.27 s	1.42 s
20	2.52* m	2.53 m	2.56* m			
21	1.10 d (6.9)	1.11 d (7.0)	1.13 d (7.1)	1.84 s	1.88 s	1.88 s
22	4.43 m	4.39 m	4.45 m	5.41 dd (3.5, 12.8)	5.41 dd (3.6, 12.9)	5.40 dd (3.5, 13.0)
23	2.15 m 2.52* m	2.09 m 2.47 m	2.19 m 2.56* m	2.26 m 2.73 m	2.26 m 2.73 m	2.26 m 2.75 m
27	4.31, 4.36 d _{AB} (12.8)	1.88 s	4.37, 4.42 d _{AB} (11.8)	4.38, 4.43 d _{AB} (12.4)	4.39, 4.44 d _{AB} (12.6)	4.37, 4.42 d _{AB} (12.2)
28	2.02 s	1.93 s	2.04 s	2.03 s	2.06 s	2.06 s

^aCDCl₃, 400 MHz. *J* entre paréntesis en Hz.

*Señales solapadas.

Tabla 2. Datos^a de RMN ¹³C (δ , CDCl₃) de W-1 a W-6.

Carbono	W-1	W-2	W-3	W-4	W-5	W-6
1	203.5 s	203.2 s	201.9 s	203.1 s	203.6 s	202.1 s
2	128.7 d	128.9 d	140.0 d	128.8 d	127.7 d	140.2 d
3	143.0 d	142.5 d	138.8 d	142.7 d	145.1 d	139.0 d
4	69.0 d	69.3 d	187.7 s	69.1 d	33.2 t	187.8 s
5	138.6 s	138.7 s	139.5 s	138.8 s	135.8 s	139.6 s
6	130.7 d	130.9 d	137.5 d	130.4 d	124.2 d	137.4 d
7	31.1 t	31.1 t	30.5 t	30.7 t	30.4 t	30.7 t
8	31.0 d	30.8 d	30.0 d	31.2 d	31.7 d	30.1 d
9	43.2 d	42.5 d	42.9 d	42.5 d	42.7 d	42.7 d
10	49.3 s	49.3 s	51.3 s	49.1 s	50.3 s	51.5 s
11	22.6 t	22.6 t	22.0 t	22.9 t	23.4 t	23.5 t
12	34.3 t	34.3 t	31.0 t	36.8 t	37.0 t	37.1 t
13	46.6 s	46.6 s	46.8 s	44.4 s	44.4 s	44.9 s
14	56.9 d	57.0 d	56.7 d	52.5 d	52.6 d	52.6 d
15	30.5 t	30.5 t	34.2 t	36.0 t	36.0 t	36.0 t
16	124.3 d	124.0 d	124.3 d	71.5 d	71.6 d	71.7 d
17	155.2 s	155.5 s	155.2 s	151.3 s	151.4 s	151.4 s
18	16.2 c	16.2 c	16.2 c	16.3 c	16.3 c	16.6 c
19	22.5 c	22.5 c	23.4 c	22.5 c	18.7 c	23.6 c
20	35.6 d	35.7 d	35.7 d	129.2 s	129.2 s	129.5 s
21	16.5 c	16.4 c	16.5 c	12.0 c	12.0 c	12.1 c
22	78.8 d	78.4 d	78.8 d	77.8 d	77.8 d	77.8 d
23	32.6 t	32.3 t	32.6 t	34.6 t	34.6 t	34.8 t
24	152.9 s	148.7 s	152.3 s	153.7 s	153.8 s	153.8 s
25	125.3 s	121.8 s	125.5 s	125.0 s	124.9 s	125.1 s
26	166.7 s	166.7 s	166.5 s	166.8 s	166.6 s	166.7 s
27	57.0 t	12.3 c	57.3 t	57.2 t	57.3 t	57.4 t
28	19.7 c	20.2 c	19.7 c	19.6 c	19.6 c	19.7 c

^aDatos basados en experimentos DEPT, HSQC y HMBC.

*Señales solapadas.

Withanolida W-7

El compuesto que hemos denominado **W-7** presentó una fórmula molecular de $C_{28}H_{38}O_6$, determinada mediante espectrometría de masas de alta resolución, fórmula que indica diez grados de insaturación en la molécula. En su espectro de IR se observaron bandas de absorción que indican la presencia de grupos hidroxilo ($3428, 2930\text{ cm}^{-1}$), carbonilo α,β -insaturado (1690 cm^{-1}) y epóxido (1133 cm^{-1}). En el espectro de UV se puede observar una banda de absorción a 217 nm , característica de carbonilo α,β -insaturado.

El compuesto **W-7** presentó en su espectro de RMN de ^1H (Tabla 3), cinco protones metínicos, tres de ellos olefínicos a $6.79\text{ }\delta_{\text{H}}$ (dd, $J= 2.1, 10.2\text{ Hz}$, H-3), $5.90\text{ }\delta_{\text{H}}$ (dd, $J= 2.4, 10.2\text{ Hz}$, H-2) y $6.05\text{ }\delta_{\text{H}}$ (d, $J= 6.1\text{ Hz}$, H-6), mientras que los dos restantes se encuentran sobre carbono unido a oxígeno a $5.05\text{ }\delta_{\text{H}}$ (sa, H-4) y $4.70\text{ }\delta_{\text{H}}$ (dt, $J= 2.6, 8.8\text{ Hz}$, H-22). Además, se observaron señales correspondientes a tres metilos singuletes a $0.87\text{ }\delta_{\text{H}}$ (Me-18), $1.29\text{ }\delta_{\text{H}}$ (Me-19) y $2.05\text{ }\delta_{\text{H}}$ (Me-28), un metilo como doblete a $1.07\text{ }\delta_{\text{H}}$ ($J= 7.0\text{ Hz}$, Me-21) y un alcohol primario a $4.37, 4.42\text{ }\delta_{\text{H}}$ (2H, $d_{\text{AB}}, J= 12.5\text{ Hz}$, H-27). En su espectro de RMN ^{13}C , cabe destacar la presencia adicional de un carbono terciario unido a oxígeno a $\delta_{\text{C}} 84.4$ característico de un alcohol en disposición α sobre el carbono C-17 en un esqueleto de withanolida⁸⁴.

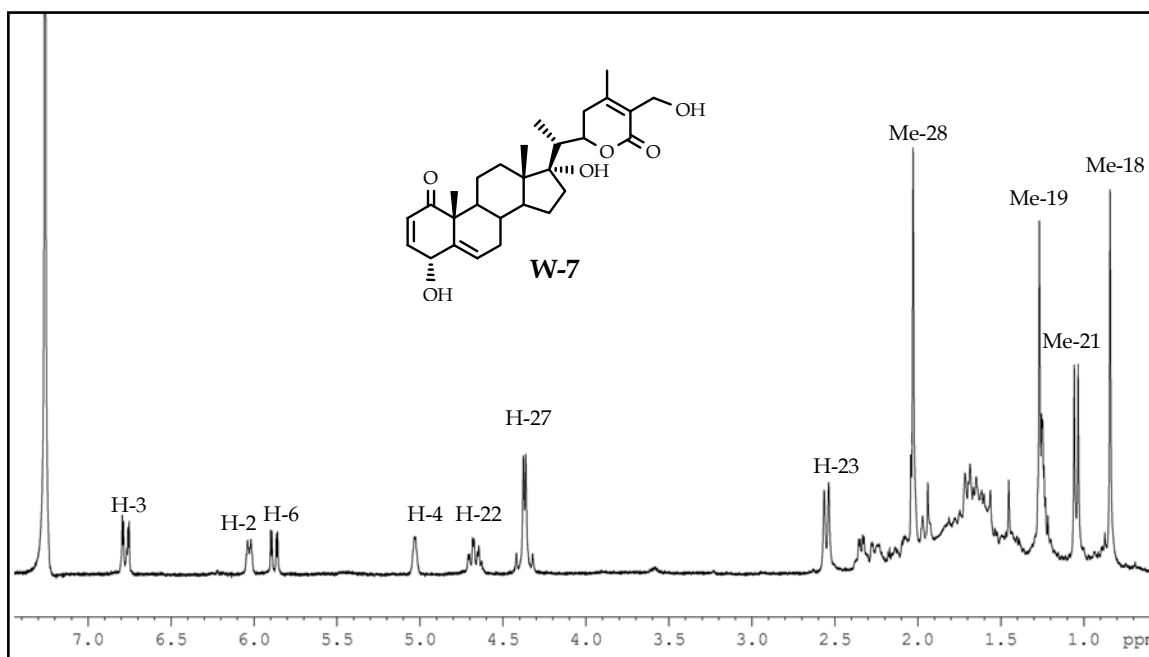


Figura 4.2.25. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de **W-7**.

⁸⁴ Choudhary, M. I.; Yousuf, S.; Nawaz, S. A.; Ahmed, S.; Atta-ur-Rahman. *Chem. Pharm. Bull.*, **2004**, 52, 1358.

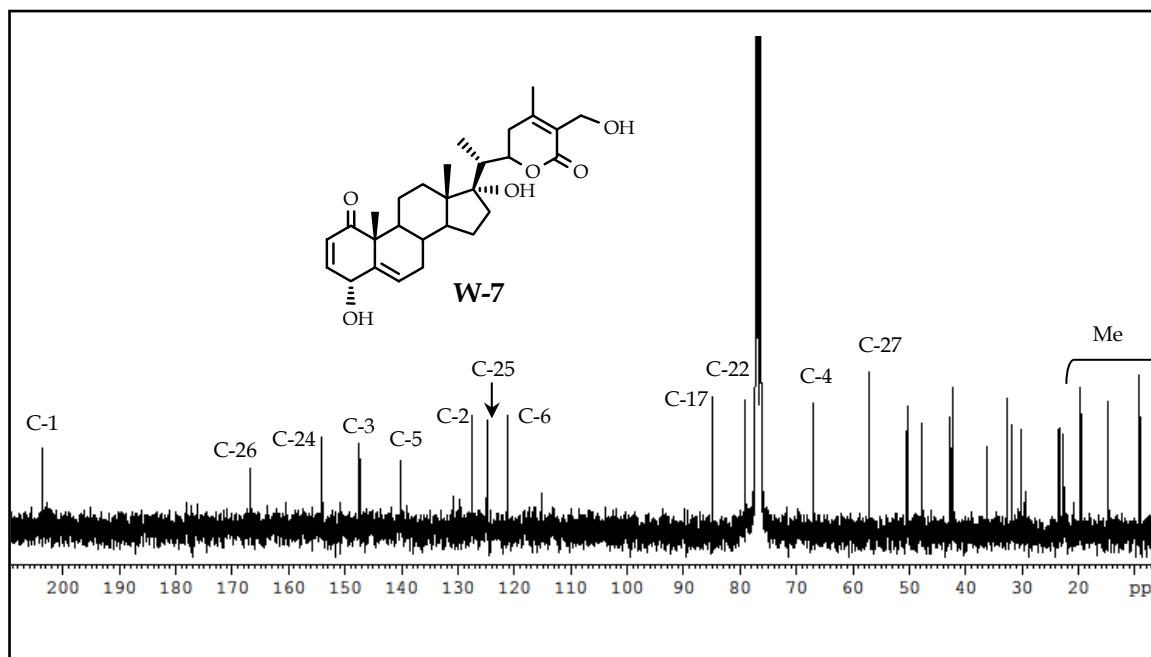


Figura 4.2.26. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de W-7.

La regiosustitución de los diferentes sustituyentes se determinó mediante el análisis de un experimento HMBC. Así, se observaron como correlaciones más significativas las de H-2 ($5.90 \delta_{\text{H}}$) con el C-4 ($67.0 \delta_{\text{C}}$), H-3 ($6.79 \delta_{\text{H}}$) con C-1 ($203.7 \delta_{\text{C}}$) y C-5 ($140.2 \delta_{\text{C}}$) y H-6 ($6.05 \delta_{\text{H}}$) con los carbonos a $67.0 \delta_{\text{C}}$ (C-4), $32.7 \delta_{\text{C}}$ (C-8) y $50.5 \delta_{\text{C}}$ (C-10), lo que confirmó la posición del grupo hidroxilo secundario sobre el carbono C-4. La correlación de los Me-18 ($0.87 \delta_{\text{H}}$) y Me-21 ($1.07 \delta_{\text{H}}$) con el carbono a $84.4 \delta_{\text{C}}$ (C-17) confirmó el hidroxilo terciario en esta posición, mientras que correlación de H-27 (4.37 , $4.42 \delta_{\text{H}}$) con los carbonos a $154.1 \delta_{\text{C}}$ (C-24), $124.9 \delta_{\text{C}}$ (C-25) y $166.9 \delta_{\text{C}}$ (C-26), situó el alcohol primario sobre el anillo lactónico. La estereoquímica relativa del hidroxilo sobre C-4 se estableció como α mediante un experimento ROESY, donde se observó efecto ROE del Me-19 con H-4 β .

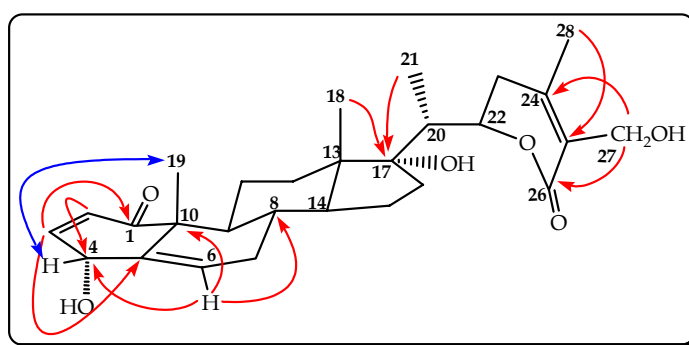
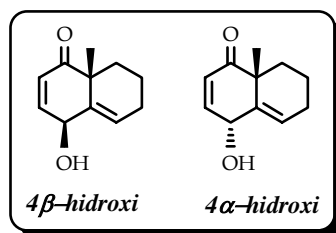


Figura 4.2.27. Correlaciones observadas en el experimento HMBC (rojo) ROESY (azul) de W-7

Así mismo, la multiplicidad de la señal de H-4, un singulete ancho en **W-7**, difiere en las J observadas en aquellos compuestos con H-4 α ($J_{3,4} \approx 4.5$ Hz). Estos datos y basándonos en un estudio realizado por Hirayama y col.⁸⁵ en el que sintetizan los epímeros que se muestran en la figura y estudian sus desplazamientos y constantes de acoplamiento para cada uno de ellos, nos permiten establecer su estructura como **4 α ,17 α ,27-trihidroxi-1-oxo-witha-2,5,24-trienolida**.



Cabe destacar, que todas las withanolidas descritas en la bibliografía química presentan el grupo hidroxilo en C-4 en disposición β . Por lo tanto **W-7** representa el primer ejemplo de withanolida con un alcohol en disposición α en este tipo de esqueleto.

Withanolida **W-8**

El compuesto que hemos denominado **W-8** presentó la misma fórmula molecular $C_{28}H_{38}O_6$ que el compuesto anterior **W-7**, determinada mediante espectrometría de masas de alta resolución. Esta coincidencia, junto con las similitudes mostradas en sus datos de RMN nos indicó que ambos productos son isómeros. Así, las principales diferencias entre sus espectros de RMN 1H fueron el desplazamiento en **W-8** de H-4 y H-6 a campos más altos, el desplazamiento del Me-19 a campos más bajos y la multiplicidad de la señal de H-4 ($J_{3,4} =$ sa en **W-7** y $J_{3,4} = 4.6$ Hz en **W-8**). Así mismo, en sus espectros de RMN ^{13}C se apreciaron pequeñas variaciones en los carbonos C-2, C-3, C-4, C-6 y C-19.

Revisada la bibliografía química encontramos que **W-8** había sido descrito anteriormente por González y col.⁸⁶, aislándose de *Withania frutescens* en 1974. Sin embargo, los datos de algunos protones y los carbonos no fueron asignados. Por ello, en la presente Memoria de Tesis aportamos la asignación completa de sus datos de RMN de 1H y ^{13}C , haciendo uso de experimentos bidimensionales.

⁸⁵ Hirayama, M.; Fukatsu, S.; Ikekawa, N. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*: **1981**, 88.

⁸⁶ González, A.G.; Bretón, J.L.F.; Trujillo, J.M. *Ann. de Quím.* **1974**, 70, 69.

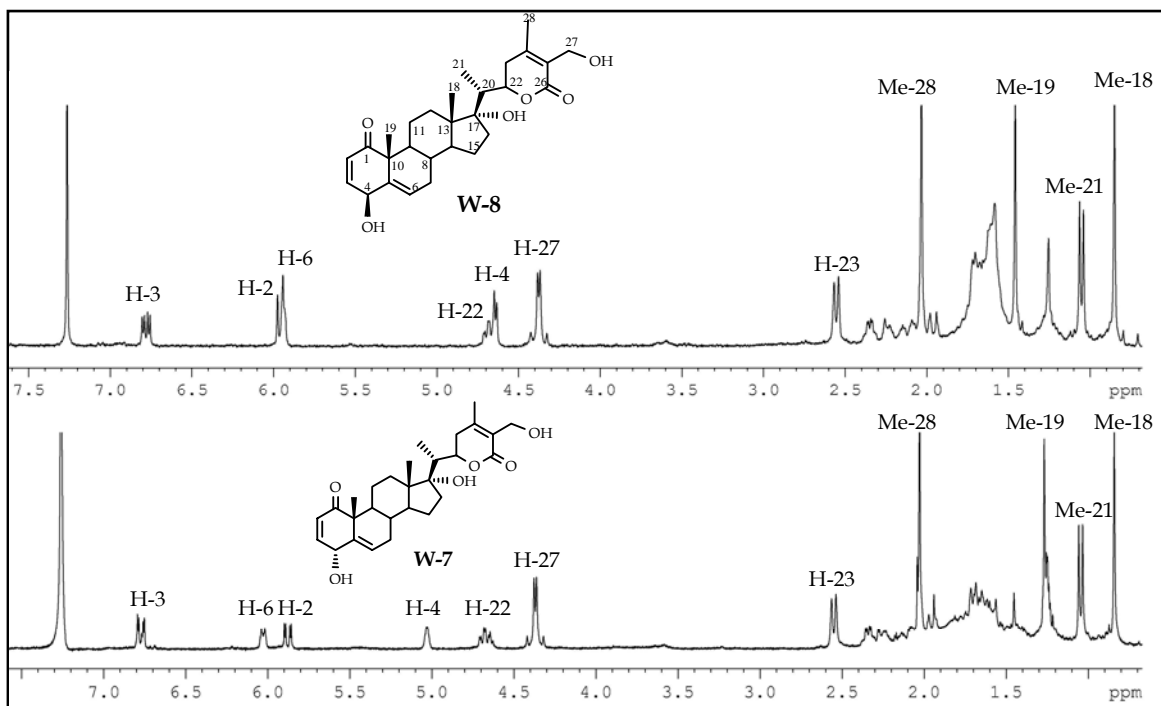


Figura 4.2.28. Espectros de RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) de W-7 y W-8.

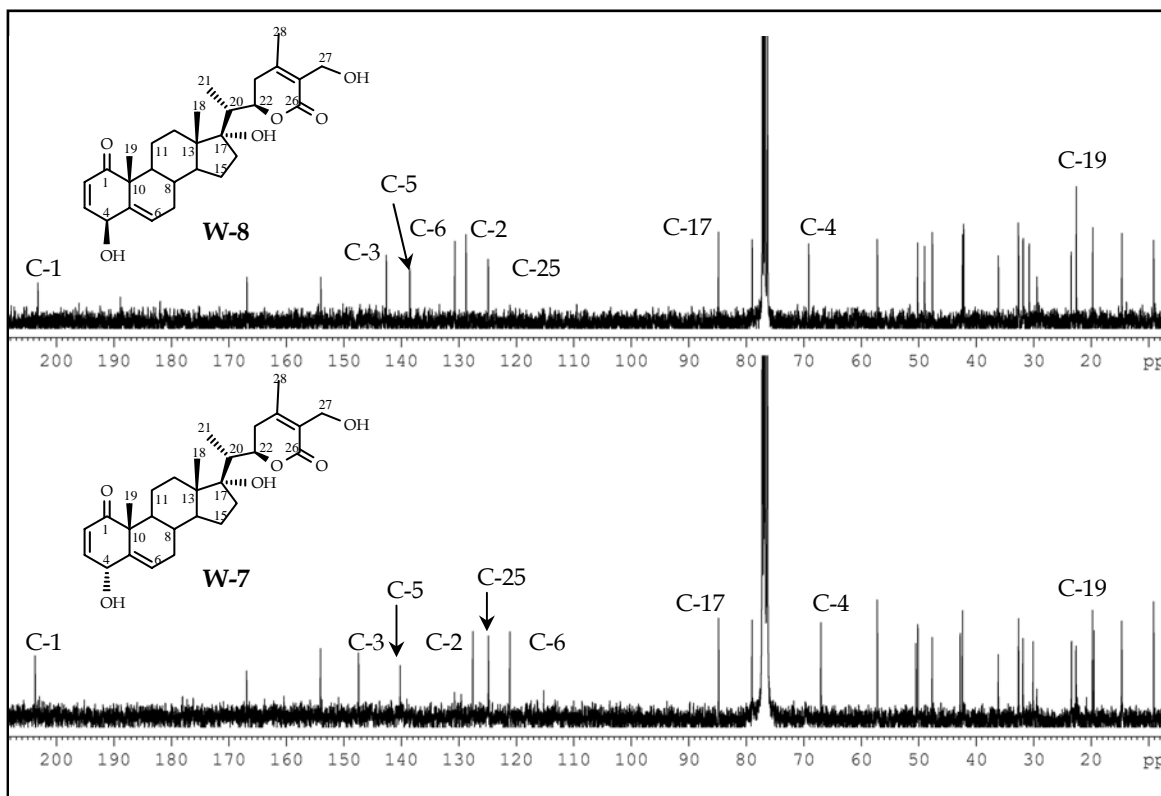


Figura 4.2.29. Espectros de RMN ¹³C (CDCl₃, 400 MHz) de W-7 y W-8.

Tabla 3. Datos de RMN ^1H y ^{13}C (δ , CDCl_3) de W-7 y W-8.

Posición	W-7		W-8	
	δ_{H}	δ_{C}^a	δ_{H}	δ_{C}^a
1		203.7 s		203.1 s
2	5.90 dd (2.4, 10.2)	127.6 d	5.95 d (10.0)	128.8 d
3	6.79 dd (2.1, 10.2)	147.5 d	6.77 dd (4.4, 10.0)	142.6 d
4	5.05 sa	67.0 d	4.64 d (4.6)	69.3 d
5		140.2 s		138.7 s
6	6.05 d (6.1)	121.2 d	5.93 s	130.8 d
7	1.65, 2.13 m	30.1 t	1.68, 2.13 m	30.8 t
8	1.68 m	32.7 d	1.56 m	32.7 d
9	1.66 m	42.8 d	1.59 m	42.2 d
10		50.5 s		49.0 s
11	1.57, 2.31 m	22.7 t	1.33, 1.60 m	22.6 t*
12	1.62, 1.72 m	31.9 t	1.61, 1.70 m	31.9 t
13		47.7 s		47.6 s
14	1.69 m	50.2 d	1.69 m*	50.2 d
15	1.27, 1.76 m	23.4 t	1.25, 1.75 m	23.6 t
16	1.70, 2.00 m	36.2 t	1.69*, 1.99 m	36.1 t
17		84.4 s		84.9 s
18	0.87 s	14.7 c	0.84 s	14.7 c
19	1.29 s	19.5 c	1.45 s	22.6 c*
20	2.37 m	42.4 d	2.34 m	42.4 d
21	1.07 d (7.0)	9.1 c	1.05 d (7.0)	9.2 c
22	4.70 dt (2.6, 8.8)	79.0 d	4.68 dt (2.8, 8.1)	79.0 d
23	1.47 m 2.57 m	32.6 t	2.51 d (7.8)	32.6 t
24		154.1 s		154.0 s
25		124.9 s		125.0 s
26		166.9 s		167.0 s
27	4.37, 4.42 d_{AB} (12.5)	57.2 t	4.35, 4.40 d_{AB} (12.6)	57.2 t
28	2.05 s	19.8 c	2.03 s	19.7 c

^aDatos basados en experimentos DEPT, HSQC y HMBC.

*Señales solapadas.

Withanolida W-13

El compuesto que hemos denominado **W-13** presentó una fórmula molecular de $C_{30}H_{40}O_7$, determinada mediante espectrometría de masas de alta resolución, fórmula que indica once grados de insaturación en la molécula. En su espectro de IR se observaron bandas de absorción que indican la presencia de grupos hidroxilo (3748 cm^{-1}), carbonilo α,β -insaturado (1701 cm^{-1}) y epóxido (1066 cm^{-1}). En el espectro de UV se puede observar una banda de absorción a 215 nm , característica de carbonilo α,β -insaturado.

En su espectro de RMN de ^1H (Tabla 4) se observaron cinco protones metínicos, dos de ellos olefínicos a $6.95\text{ }\delta_{\text{H}}$ (dd, $J= 5.9, 10.0\text{ Hz}$, H-3) y $6.21\text{ }\delta_{\text{H}}$ (d, $J= 10.0\text{ Hz}$, H-2), mientras los tres restantes metinos se encuentran sobre carbono unido a oxígeno a $3.76\text{ }\delta_{\text{H}}$ (d, $J= 5.9\text{ Hz}$, H-4), $4.41\text{ }\delta_{\text{H}}$ (dt, $J= 3.3, 13.2\text{ Hz}$, H-22) y $3.24\text{ }\delta_{\text{H}}$ (sa, H-6). Además, se observaron señales correspondientes a cuatro metilos singuletes a $0.70\text{ }\delta_{\text{H}}$ (Me-18), $1.41\text{ }\delta_{\text{H}}$ (Me-19), $2.06\text{ }\delta_{\text{H}}$ (Me-28), $2.08\text{ }\delta_{\text{H}}$ (OAc), un metilo como doblete a $1.00\text{ }\delta_{\text{H}}$ ($J= 6.6\text{ Hz}$, Me-21) y señales para dos protones sobre carbono unido a oxígeno a $4.88, 4.92\text{ }\delta_{\text{H}}$ (2H, $d_{\text{AB}}, J= 11.9\text{ Hz}$, H-27).

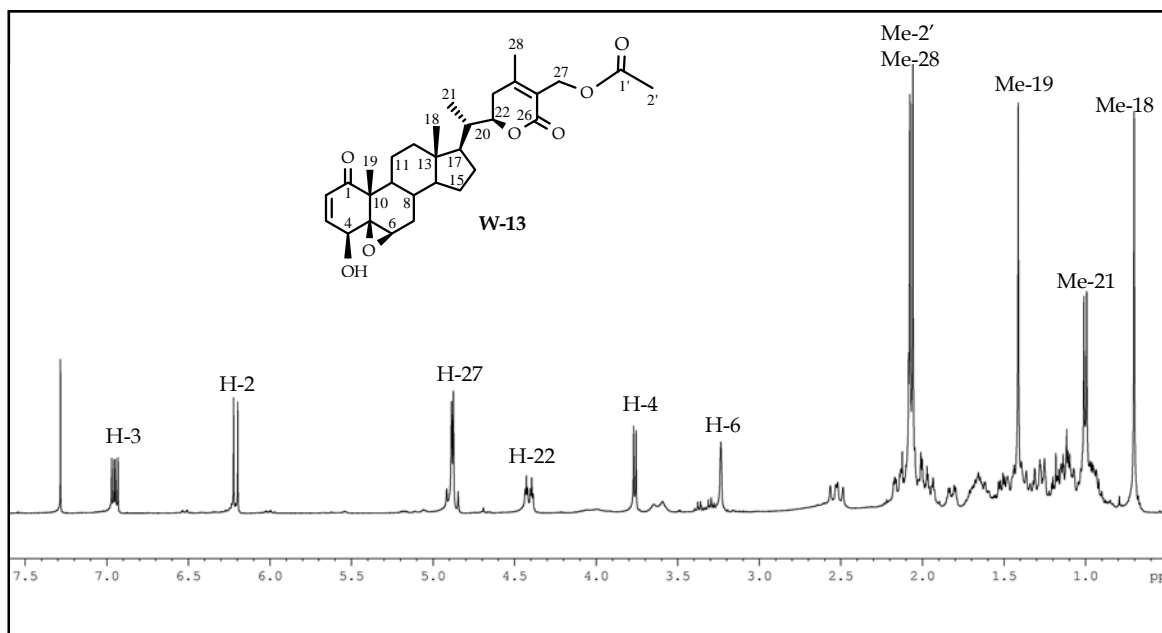


Figura 4.2.30. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de **W-13**.

Estos datos sugieren una estructura de withanolida hexacíclica para el producto **W-13**, el cual presenta una cetona α,β -insaturada, una lactona α,β -insaturada, un epóxido, un grupo acetato y un alcohol secundario. Ello fue confirmado en su espectro de RMN ^{13}C

(Tabla 5) y experimentos DEPT, donde se observan señales para treinta carbonos, correspondiendo a ocho carbonos cuaternarios, diez metinos, siete metilénicos y cinco metilos. La presencia en la molécula de un grupo epóxido, que no contienen los compuestos descritos anteriormente, se determinó por las señales observadas, en sus espectros de RMN ^1H y ^{13}C a 3.24 δ_{H} (sa, H-6), 63.6 δ_{C} (s, C-5) y 62.3 δ_{C} (d, C-6).

Un cuidadoso estudio de los experimentos bidimensionales, ^1H - ^1H (COSY) y ^1H - ^{13}C (HSQC), nos permitieron la asignación de todas las señales correspondientes a los protones y carbonos existentes en la molécula.

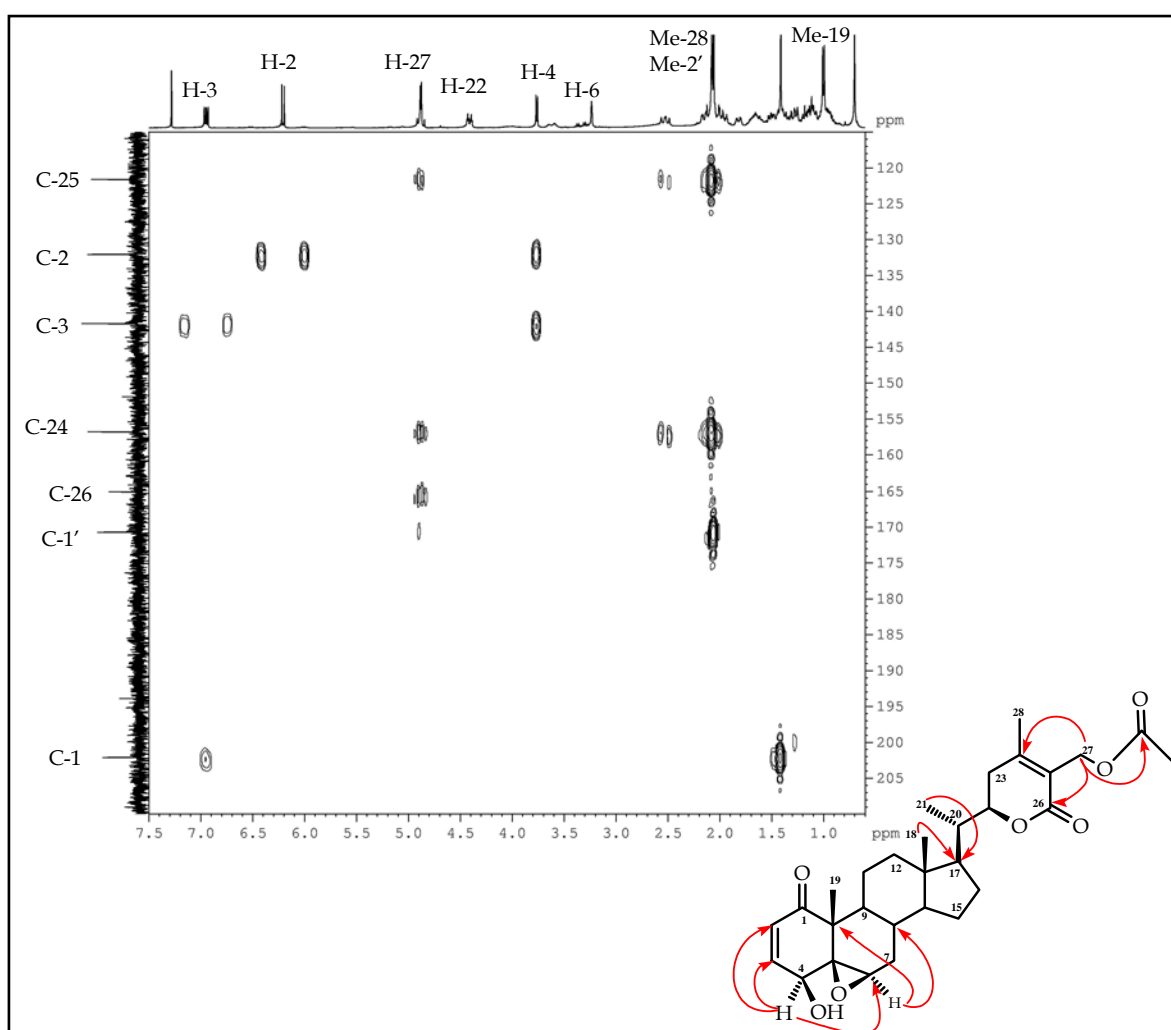
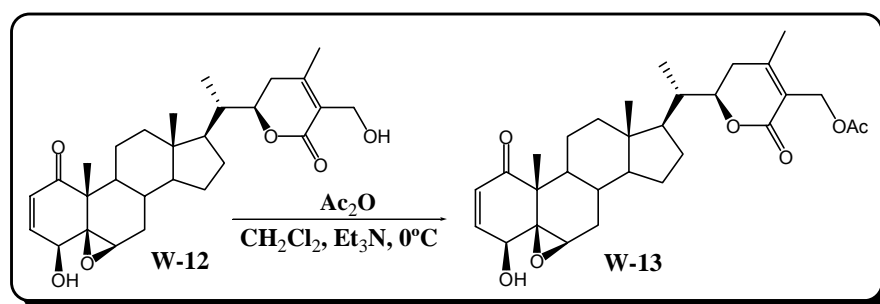


Figura 4.2.31. Ampliación del experimento HMBC de W-13.

La regiosustitución de los diferentes sustituyentes se determinó mediante el análisis de un experimento HMBC. Así, se observaron como correlaciones más significativas la de H-6 (3.24 δ_{H}) con los carbonos a 69.6 (C-4), 29.5 (C-8) y 30.9 δ_{C} (C-7), lo

que confirmó la posición del grupo epóxido sobre C5-C6, mientras que las correlaciones de H-27 (4.88, 4.92 δ_H) con los carbonos a 156.8 (δ_C C-24), 165.2 (δ_C C-26) y 170.7 δ_C (OAc) situó el grupo acetato sobre el carbono C-27 del anillo lactónico.

La estereoquímica relativa del producto **W-13** fue establecida por comparación con los datos existentes en la bibliografía para este tipo de compuestos y un experimento ROESY, donde se observó efecto ROE de H-6 con H-4, del Me-18 con H-20 y H-23 β y correlación de H-22 con el Me-21 y H-23 α . Así, comparación con los datos espectroscópicos dados en la bibliografía para withaferina A⁸⁷ (**W-11**), producto que ya había sido aislado de esta misma especie en un estudio previo llevado a cabo en los años 70⁶³ y correlación química por acetilación de la withaferina A en las condiciones habituales, que rindió un producto cuyos datos físicos y espectroscópicos fueron superponibles con los de **W-13**, nos permitió establecer la estructura de **27-O-acetilwithaferina A** para **W-13**.



Withanolida W-14

La estructura del compuesto que hemos denominado **W-14** fue establecida mediante el análisis de sus datos espectroscópicos y espectrométricos, tal como se muestra a continuación. Su fórmula molecular $\text{C}_{32}\text{H}_{44}\text{O}_8$, fue fijada basándonos en sus datos de espectrometría de masas de alta resolución.

El estudio de los datos espectroscópicos de IR, UV, RMN de ^1H y ^{13}C nos indicó la presencia de un alcohol secundario, una lactona α,β -insaturada, una cetona α,β -insaturada, dos dobles enlaces y un grupo (1-metiletil)formato en un esqueleto de withanolida. Un estudio comparativo de los datos espectroscópicos de **W-13** y **W-14** mostró que ambos productos están relacionados, siendo la principal diferencia en sus espectros de RMN de ^1H y ^{13}C (Tablas 4 y 5) la ausencia de las señales asignadas al grupo

⁸⁷ McPhail, A. T.; Sim, G. A. J. *Chem. Soc.* **1968**, 9, 962.

acetato sobre C-27, presente en **W-13** [$2.08 \delta_{\text{H}}$ (3H, s, H-2'), $170.7 \delta_{\text{C}}$ (s, C-1') y $20.7 \delta_{\text{C}}$ (c, C-2')] y la presencia de señales correspondiente a un grupo 27-O-(1-metiletil)formato en **W-14** [$104.9 \delta_{\text{C}}$ (s, C-1'); $1.46 \delta_{\text{H}}$ (3H, s, Me-2'); $22.4 \delta_{\text{C}}$ (c, C-2'); $1.48 \delta_{\text{H}}$ (3H, s, Me-3'); $22.7 \delta_{\text{C}}$ (c, C-3'); 10.62 (1H, s, H-4' y 161.5 (d, C-4')].

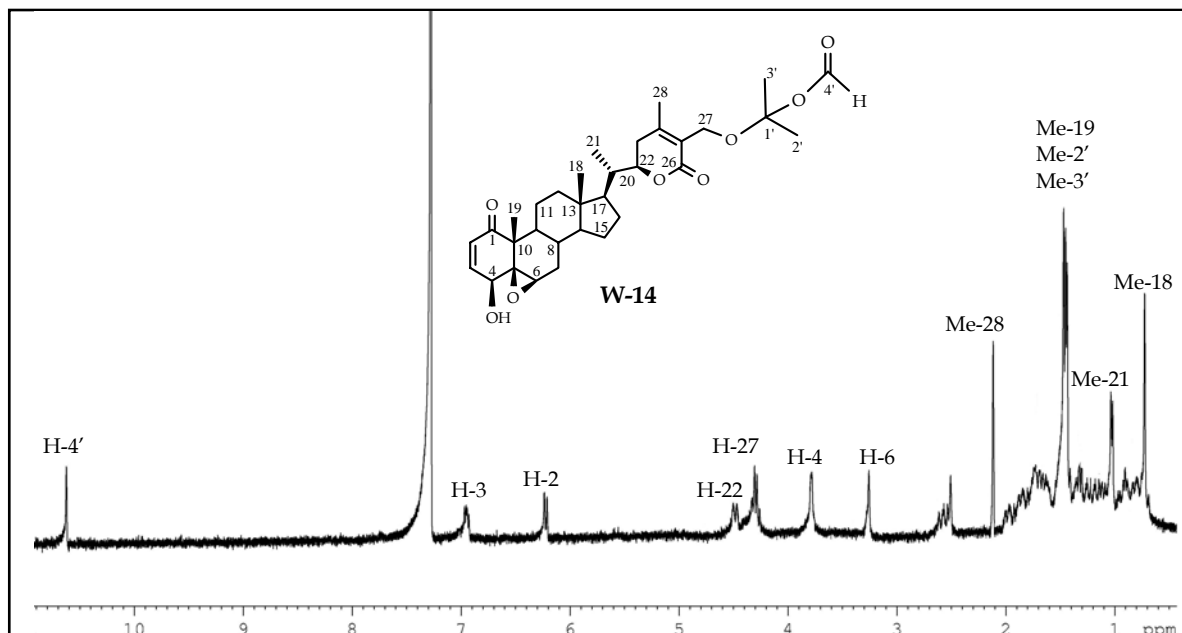


Figura 4.2.32. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 600 MHz) de **W-14**.

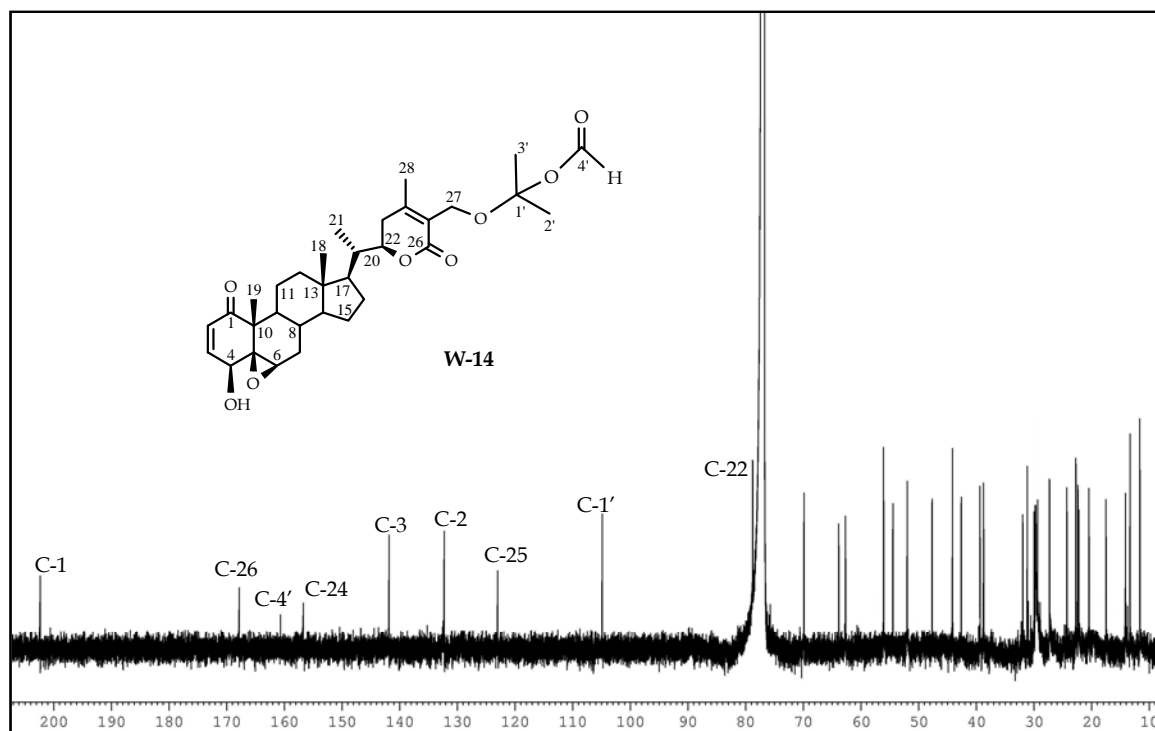


Figura 4.2.33. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 150 MHz) de **W-14**.

La estructura propuesta fue confirmada mediante el estudio de los experimentos bidimensionales homo (COSY y ROESY) y heteronucleares (HSQC y HMBC). Así, podemos destacar las correlaciones observadas de los protones H-27 con C-24, C-25, C-26 y C-1' y de H-4' con C-1' en un experimento HMBC, lo que permitió fijar de forma inequívoca la presencia del grupo 27-O-(1-metiletil) formato sobre C-27 en el esqueleto de withanolida para **W-14**. Estos datos nos permitieron establecer la estructura de **W-14** como **formato de 27-O-(1-metiletil)withaferina A**.

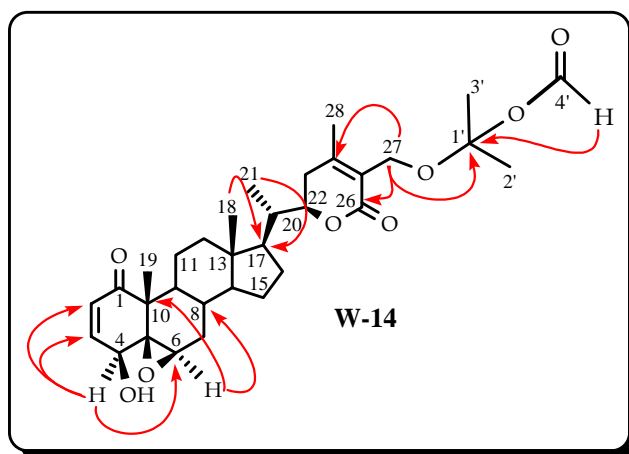


Figura 4.2.34. Correlaciones observadas en el experimento HMBC de **W-14**.

Cabe destacar que **W-14** constituye el primer ejemplo de metabolito con esqueleto de withanolida con un grupo 27-O-(1-metiletil) formato en C-27.

Withanolida **W-15**

La estructura del compuesto **W-15** fue establecida mediante el análisis de sus datos espectroscópicos y espectrométricos, tal como se describe a continuación. Su fórmula molecular $C_{28}H_{36}O_7$, fue fijada basándonos en sus datos de espectrometría de masas de alta resolución. Su espectro de RMN de 1H y RMN ^{13}C (Tablas 4 y 5) presentan señales características de una withanolida hexacíclica con tres dobles enlaces, una cetona, una lactona, tres alcoholes, uno primario y dos secundarios y un epóxido. Comparación de sus datos con los de **W-4** mostraron que ambos productos están muy relacionados, siendo la única diferencia estructural la presencia de un grupo epóxido entre los carbonos C-5 y C-6 en el compuesto **W-15**, en lugar del doble enlace que presenta **W-4** en dicha posición.

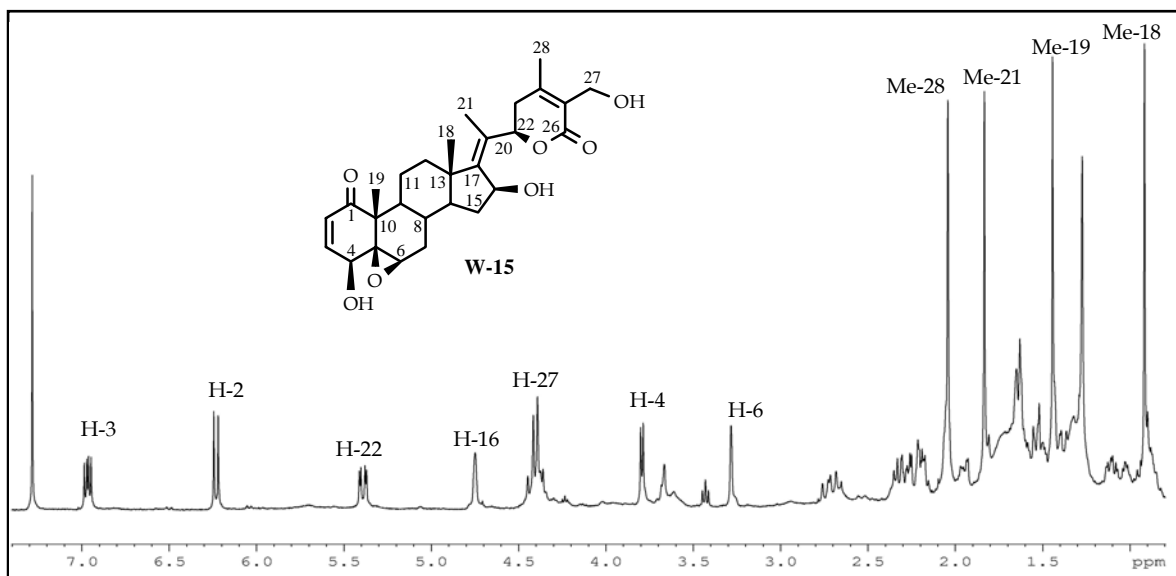


Figura 4.2.35. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de **W-15**.

Un cuidadoso estudio de los experimentos 2D nos permitió establecer la posición y estereoquímica relativa de los diferentes grupos sobre la molécula. Así, en un experimento HMBC se observaron correlaciones a tres enlaces de la señal a 3.77 δ_{H} (H-4) con C-2 (132.0 δ_{C}) y C-10 (47.5 δ_{C}) y de la señal a 3.26 δ_{H} (H-6) con C-4 (69.6 δ_{C}), lo que permitió fijar la regiosustitución en los anillos A y B; correlación de la señal a 4.73 δ_{H} (H-16) con C-13 (44.2 δ_{C}), C-14 (52.4 δ_{C}) y C-20 (129.5 δ_{C}) confirmó la posición de un alcohol secundario sobre C-16; correlación de la señal a 1.81 δ_{H} (Me-21) con C-17 (150.9 δ_{C}) y C-22 (77.6 δ_{C}), estableció la estructura del anillo D y la cadena lateral y correlación a tres enlaces de la señal asignada a los protones geminales al hidroxilo primario a 4.38, 4.43 δ_{H} (H-27) con C-24 (153.5 δ_{C}) y C-26 (166.7 δ_{C}), determinó la estructura lactónica del anillo E.

La estereoquímica relativa de los grupos funcionales sobre la molécula se determinó mediante un experimento ROESY, donde se observó efecto ROE entre H-4 y H-6, correlación del Me-19 con los protones H-7 β y H-11 β y efecto ROE de H-22 α con H-23 α , de H-16 con H-14 α y H-23 α y del Me-21 con H-12 β y Me-18, fijó la disposición del alcohol secundario sobre C-16 como β y del doble enlace C17-C20 como Z. Estos datos nos permitieron establecer la estructura del compuesto **W-15** como **16 β -hidroxi-17,20-didehidro-withaferina A**.

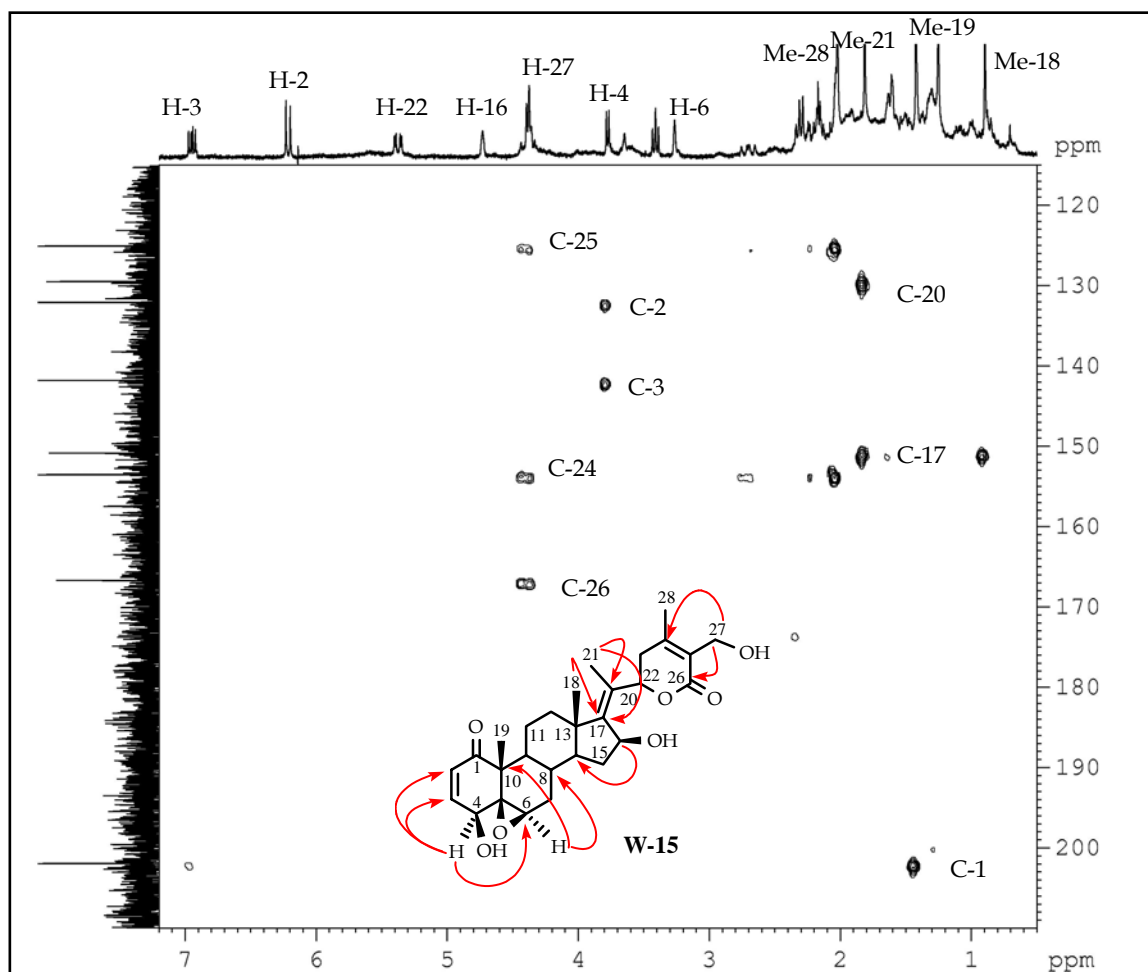


Figura 4.2.36. Ampliación del experimento HMBC de W-15.

Withanolida W-16

El compuesto que hemos denominado **W-16** presentó una fórmula molecular de $C_{28}H_{36}O_6$, determinada mediante espectrometría de masas de alta resolución, fórmula que indica la presencia un átomo de oxígeno adicional al producto **W-1**.

El análisis de sus datos de RMN de 1H y ^{13}C (Tablas 4 y 5) mostró como principales diferencias con respecto a los datos de **W-1**, la presencia de señales asignables a un grupo epóxido a $3.26 \delta_H$ (sa, H-6), $63.8 \delta_C$ (s, C-5) y $62.2 \delta_C$ (d, C-6), el desplazamiento a campos más altos de la señal de H-4 a $3.77 \delta_H$ (d, $J = 5.9$ Hz, H-4), así como la desaparición de las señales correspondientes al doble enlace C5-C6.

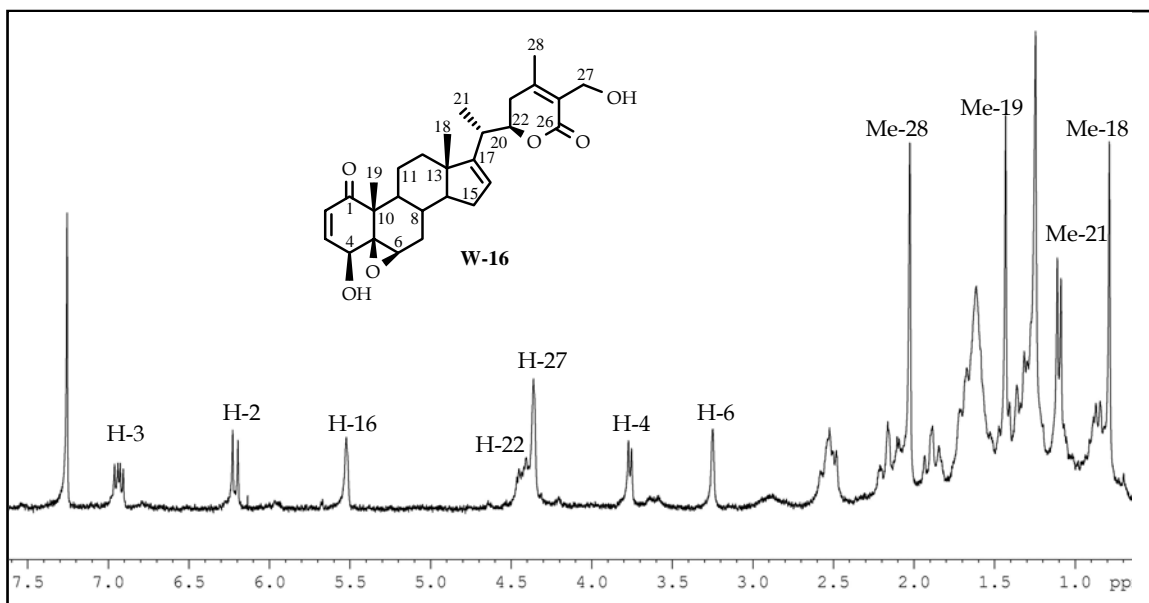


Figura 4.2.37. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de **W-16**.

Un cuidadoso estudio de los experimentos bidimensionales, ^1H - ^1H (COSY) y ^1H - ^{13}C (HSQC), nos permitieron la asignación de todas las señales correspondientes a los protones y carbonos existentes en la molécula. La regiosustitución de los diferentes sustituyentes se confirmó mediante el análisis de un experimento HMBC. Así, se observó como correlación más significativa la de H-6 ($3.26 \delta_{\text{H}}$) con los carbonos a 69.8 (C-4), 28.1 (C-8) y $31.0 \delta_{\text{C}}$ (C-7), lo que confirmó la posición del grupo epóxido sobre C5-C6.

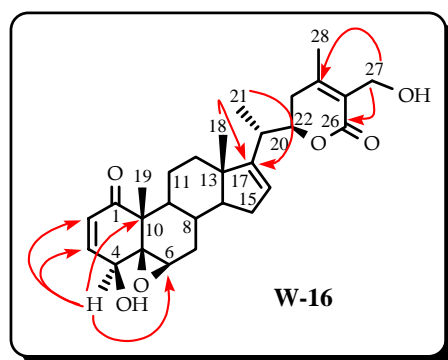


Figura 4.2.38. Correlaciones observadas en el experimento HMBC de **W-16**.

La estereoquímica relativa de **W-16** fue establecida por comparación con los datos existentes en la bibliografía para este tipo de compuestos⁸⁸ y un experimento ROESY, donde se observó efecto ROE de H-6 con H-4, del Me-18 con H-20 y H-23 β y correlación de H-22 con el Me-21 y H-23 α . Estos datos nos permitieron proponer la estructura de **16,17-Didehidro-withaferina A** para el producto **W-16**.

⁸⁸ Misra, L.; Lal, P.; Sangwan, R. S.; Sangwan, N. S.; Uniyal, G. C.; Tuli, R. *Phytochemistry*. **2005**, *66*, 2702.

Withanolida W-23

El compuesto que hemos denominado **W-23** presentó una fórmula molecular de $C_{30}H_{42}O_8$, determinada mediante espectrometría de masas de alta resolución. En su espectro de IR se observaron bandas de absorción a 3401 y 1678 cm^{-1} , que indican la presencia de grupos hidroxilo y carbonilo α,β -insaturado, respectivamente. En el espectro de UV se puede observar una banda de absorción a 214 nm, característica de carbonilo α,β -insaturado.

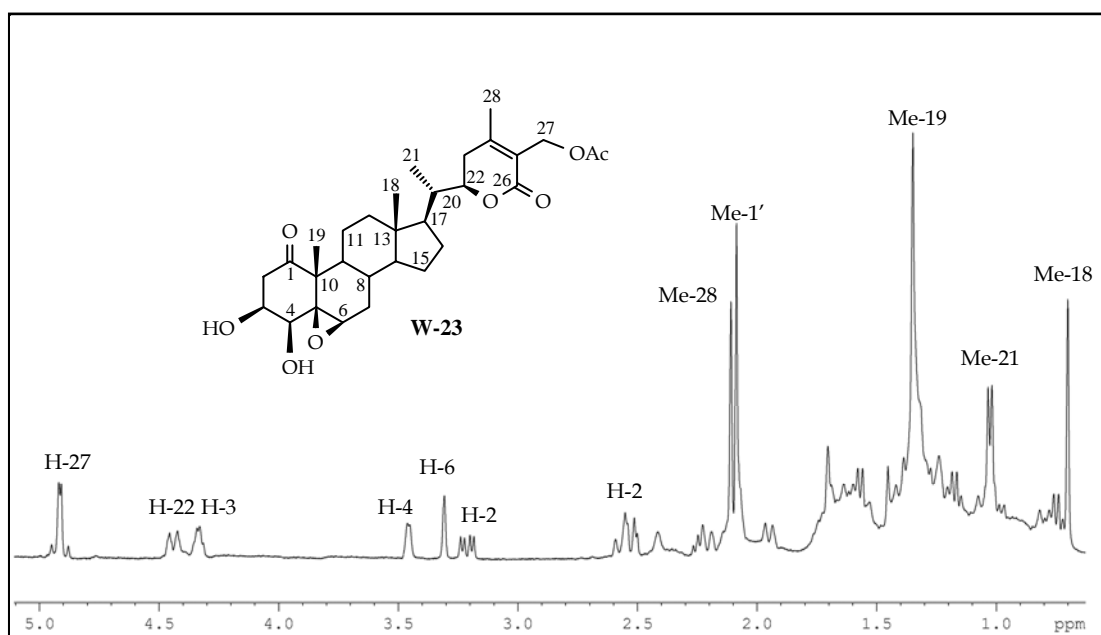


Figura 4.2.39. Espectro de RMN 1H ($CDCl_3$, 400 MHz) de **W-23**.

En su espectro de RMN de 1H se observaron señales correspondientes a cuatro protones sobre carbono unido a oxígeno a 4.34 δ_H (da, $J = 3.7$ Hz, H-3); 3.46 δ_H (d, $J = 3.7$ Hz, H-4); 3.31 δ_H (sa, H-6) y 4.44 δ_H (dt, $J = 3.0, 13.3$ Hz, H-22). Así mismo, se observaron señales correspondientes a un alcohol primario a 4.89, 4.92 δ_H (d_{AB} , $J = 12.0$ Hz, H-27), cuatro metilos singuletes, uno sobre doble enlace a 2.11 δ_H (Me-28), uno de grupo acetato a 2.09 δ_H y dos sobre carbonos alifáticos a 0.70 δ_H (Me-18) y 1.35 δ_H (Me-19), así como una señal para un metilo como doblete a 1.03 δ_H ($J = 6.4$ Hz, Me-21).

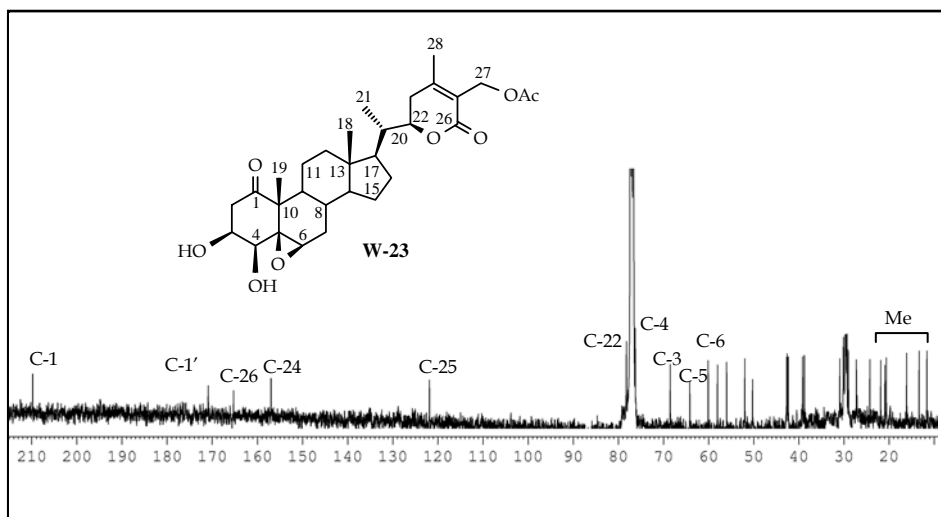


Figura 4.2.40. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) de **W-23**.

Estos datos fueron confirmados por RMN ^{13}C , donde se observan señales para treinta carbonos, donde podemos destacar las señales correspondientes a una cetona a 209.8 δ_{C} (C-1), un grupo acetato a 170.9 δ_{C} (OAc) y 20.9 δ_{C} (OAc), dos alcoholes secundarios a 68.5 δ_{C} (C-3) y 76.3 δ_{C} (C-4), un grupo epóxido a 64.2 δ_{C} (C-5) y 60.1 δ_{C} (C-6) y señales características del sistema lactónico a 20.6 δ_{C} (C-28), 58.0 δ_{C} (C-27), 78.2 δ_{C} (C-22), 121.9 δ_{C} (C-25), 157.0 δ_{C} (C-24) y 165.3 δ_{C} (C-26).

El conjunto de estos datos nos indicaron que el producto **W-23** presenta como única diferencia estructural con respecto a **W-13** la presencia de un hidroxilo en C-3 y la ausencia del doble enlace en C2-C3.

El estudio de los experimentos bidimensionales homonucleares (COSY y ROESY) y heteronucleares (HSQC y HMBC) nos permitió confirmar la posición y estereoquímica relativa de los diferentes grupos sobre la molécula. Así, en un experimento ^1H - ^1H COSY se observó acoplamiento entre los protones H-3/H-2, H-4; H-6/H-7; H-20/Me-21, H-22 y H-22/H-23.

La localización de los distintos grupos funcionales en la molécula se determinó a partir de las correlaciones a larga distancia observadas en un experimento HMBC. Así, se observó correlaciones del protón H-3/C-1, C-5; H-4/C-2, C-3, C-6, C-10; H-6/C-4, C-7, C-8 y Me-19/C-1, C-5, C-9, C-10, lo que nos permitió fijar el alcohol secundario sobre C-3. El grupo acetato en el anillo lactónico, fue localizado por las correlaciones observadas entre Me-28/C-23, C-25 y H-27/C-24, C-25, C-26, C-1'.

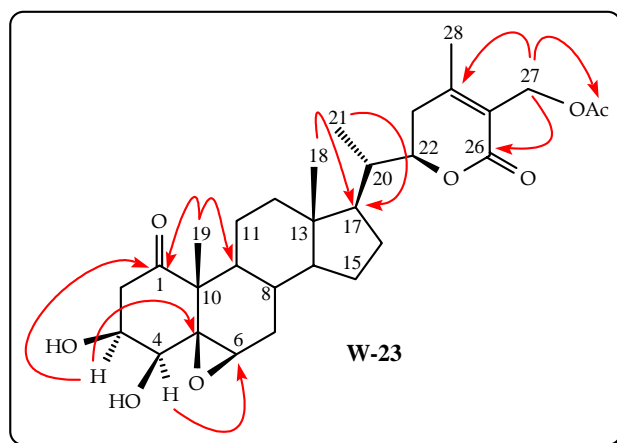


Figura 4.2.41. Correlaciones observadas en el experimento HMBC de W-23.

La estereoquímica relativa del alcohol secundario sobre C-3 en W-23 fue establecida por comparación con los datos obtenidos en la bibliografía para este tipo de compuestos y un experimento ROESY, donde se observó como efecto ROE más significativo el de H-6 α con H-4 α y de H-4 α con H-3, lo que permitió confirmar la estereoquímica del grupo hidroxilo sobre C-3 como β .

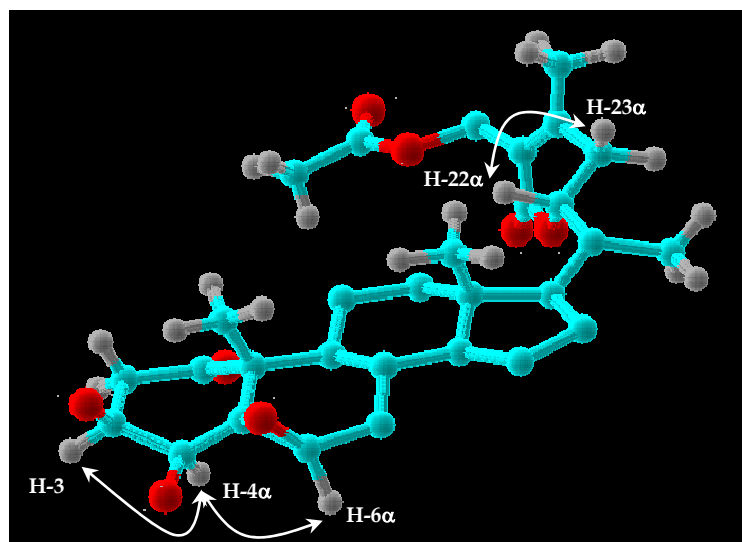


Figura 4.2.42. Efectos ROE observados en el experimento ROESY.

Estos datos nos permitieron proponer la estructura del compuesto W-23 como 27-O-acetil-viscosalactona B.

Withanolida W-24

El compuesto que hemos denominado **W-24** presentó una fórmula molecular de $C_{28}H_{42}O_8$, determinada mediante espectrometría de masas de alta resolución, fórmula que está de acuerdo con ocho grados de insaturación en el compuesto. En su espectro de IR se observaron bandas características para grupos hidroxilo y carbonilo α,β -insaturado, este último confirmado en su espectro de UV (215 nm).

En su espectro de RMN de 1H (tabla 4) se observaron señales para cuatro metinos de carbono unidos a oxígeno a 4.38 δ_H (m, H-3), 4.46 δ_H (m, H-4, H-22) y 4.15 δ_H (d, $J=7.9$ Hz, H-6) y señales correspondientes a un alcohol primario a 4.36, 4.42 δ_H (2H, d_{AB} , $J=12.4$ Hz, H-27). Además, se observaron tres metilos singuletes a 2.07 δ_H (Me-28), 1.28 δ_H (Me-19) y 0.72 δ_H (Me-18) y uno como doblete a 1.02 δ_H ($J=6.5$ Hz, Me-21).

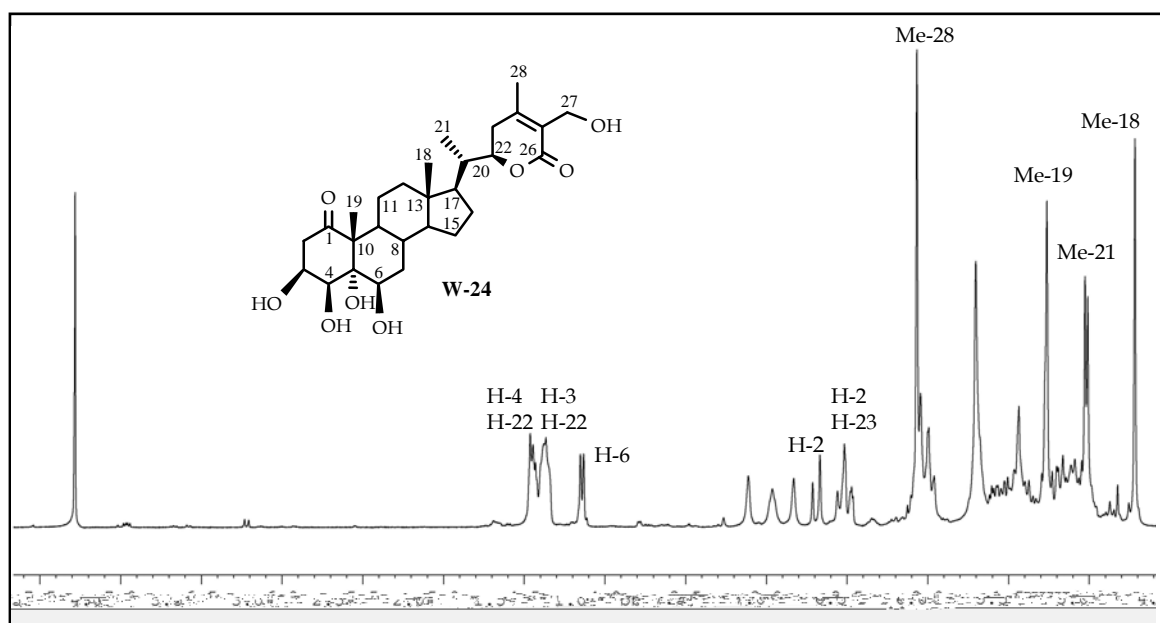


Figura 4.2.43. Espectro de RMN 1H ($CDCl_3$, 400 MHz) de **W-24**.

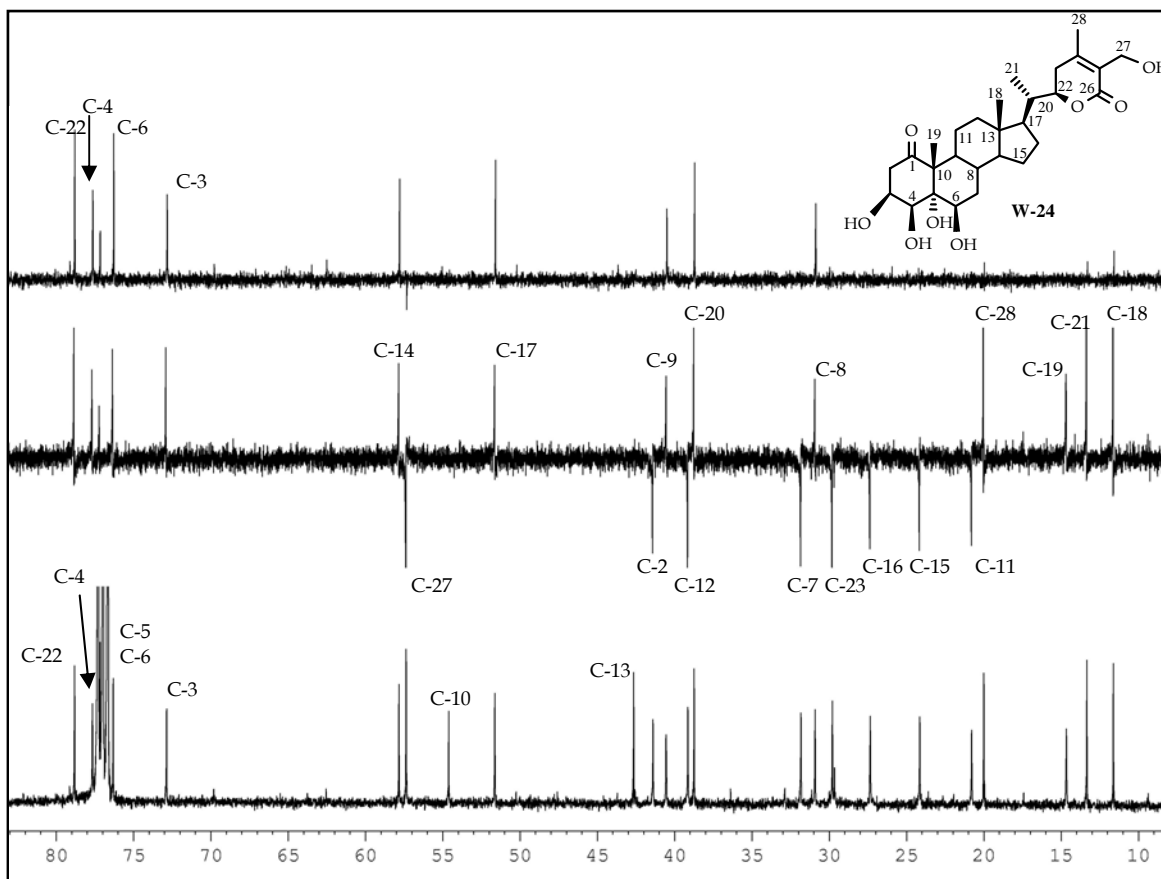


Figura 4.2.44. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) y experimentos DEPT de **W-24**.

Los datos anteriores fueron confirmados en el espectro de RMN ^{13}C , donde se observaron señales para veintiocho carbonos, destacando las señales correspondientes a seis carbonos unidos a oxígeno a $72.8 \delta_{\text{C}}$ (d, C-3), $77.5 \delta_{\text{C}}$ (d, C-4), $76.4 \delta_{\text{C}}$ (s, C-5; d, C-6), $78.9 \delta_{\text{C}}$ (d, C-22) y $57.3 \delta_{\text{C}}$ (t, C-27); un carbonilo a $210.4 \delta_{\text{C}}$ (s, C-1) y señales características de la lactona α,β -insaturada a $167.3 \delta_{\text{C}}$ (s, C-26), $153.7 \delta_{\text{C}}$ (s, C-24) y $125.5 \delta_{\text{C}}$ (s, C-25).

Estos datos nos indican que el producto **W-24** es una withanolida pentacíclica que presenta una cetona, una lactona α,β -insaturada, un alcohol primario, tres alcoholes secundarios y un alcohol terciario.

El análisis del experimento HMBC nos permitió situar cada uno de los grupos funcionales sobre el esqueleto de withanolida. Así, a partir de las correlaciones a larga distancia de H-3 ($4.38 \delta_{\text{H}}$) con C-1 ($210.4 \delta_{\text{C}}$) y C-5 ($76.4 \delta_{\text{C}}$), de H-4 ($4.46 \delta_{\text{H}}$) con C-2 ($41.5 \delta_{\text{C}}$), C-6 ($76.4 \delta_{\text{C}}$) y C-10 ($54.7 \delta_{\text{C}}$), de H-6 ($4.15 \delta_{\text{H}}$) con C-8 ($30.9 \delta_{\text{C}}$) y C-10 ($54.7 \delta_{\text{C}}$) y del Me-19 ($1.28 \delta_{\text{H}}$) con C-1 ($210.4 \delta_{\text{C}}$), C-5 ($76.4 \delta_{\text{C}}$) y C-9 ($40.5 \delta_{\text{C}}$), establecimos los sustituyentes de los anillos A y B como 3,4,5,6-tetrahidroxi-1-ona. Por otra parte, las correlaciones a larga distancia de los protones geminales al alcohol primario sobre C-27

(4.36, 4.42 δ_H) con C-24 (153.7 δ_C) y C-26 (167.3 δ_C) y del Me-28 (2.07 δ_H) con C-23 (29.8 δ_C) y C-25 (125.5 δ_C), nos permitieron establecer la regiosustitución en la lactona hexacíclica α,β -insaturada (anillo E).

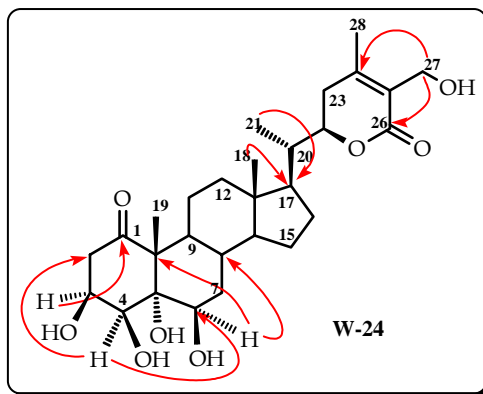


Figura 4.2.45. Correlaciones observadas en el experimento HMBC de W-24

La estereoquímica relativa fue establecida mediante un experimento ROESY, modelización molecular (PC Model)⁸⁹ y comparación con los datos existentes en la bibliografía⁹⁰. Así, las correlaciones más significativas observadas en un experimento ROESY fueron: Me-19/H-2 β , H-2 α /H-3, H-3 α /H-4 y de este último con H-6 α , fijando con ello la disposición de los alcoholes como 3 β , 4 β y 6 α . La estereoquímica del alcohol terciario sobre C-5 se estableció como α por el desplazamiento del Me-19 a δ_C 14.7, desplazamiento característico de alcohol en C-5 α , ya que cuando es OH-5 β causa un desplazamiento de aproximadamente 7 ppm a campos más altos del Me-19, debido a las interacciones *gauche* entre ambos sustituyentes⁹¹.

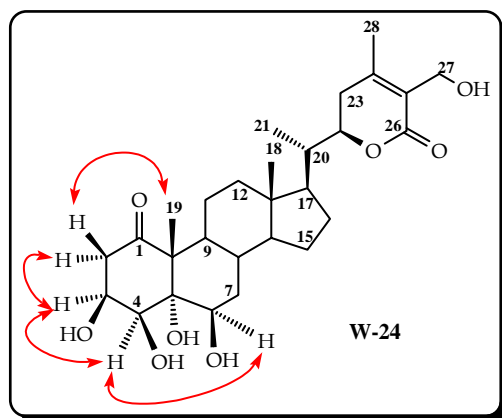


Figura 4.2.46. Correlaciones observadas en el experimento ROESY de W-24

⁸⁹ PC Model from Serena Software, P. O. Box. 3076, Bloomington, IN 47402-3076.

⁹⁰ Hsieh, P.; Huang, Z.; Chen, J.; Chang, F.; Wu, C.; Yang, Y.; Chiang, M. Y.; Yen, M.; Chen, S.; Yen, H.; Luebken, T.; Hung, W.; Wu, Y. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 747.

⁹¹ Lan, Y.; Chang, F.; Pan, M.; Wu, C.; Wu, S.; Chen, S.; Wang, S.; Wu, M.; Wu, Y. *Food Chem.* **2009**, *116*, 462.

Estos datos nos permitieron establecer la estructura de nuestro producto **W-24** como **3 β ,4 β ,5 α ,6 β ,27-pentahidroxi-1-oxo-withan-24-enolida**. Cabe destacar que revisada la bibliografía química sólo existe un ejemplo de withanolida con 4 hidroxilos en los anillos A-B, pero en este caso se encuentran en las posiciones C-4, C-5, C-6 y C-19, por lo que **W-24** es el único ejemplo de withanolida con este tipo de sustitución en los carbonos C-3, C-4, C-5 y C-6.

Como mostramos en la figura resumen de las withanolidas aisladas de *W. aristata* en esta Memoria de investigación, los compuestos **W-26** y **W-27**, descritos anteriormente en la bibliografía química, presentan la estereoquímica contraria en los carbonos C-5 y C-6 a la del compuesto que denominamos **W-24**. Podemos proponer como mecanismo de la biosíntesis de estos compuestos el que se presenta en la figura 4.2.48: apertura del epóxido del posible precursor **W-21**, formación del carbocatión más estable en C-5 y posterior ataque de una molécula de agua por el lado menos impedido (cara α) generaría los metabolitos con C-5 α , C-6 β . Por otra parte, los compuestos con sustituciones C-5 β , C-6 α podrían formarse por el ataque de un nucleófilo sobre C-6, por el lado menos impedido del grupo epóxido del precursor.

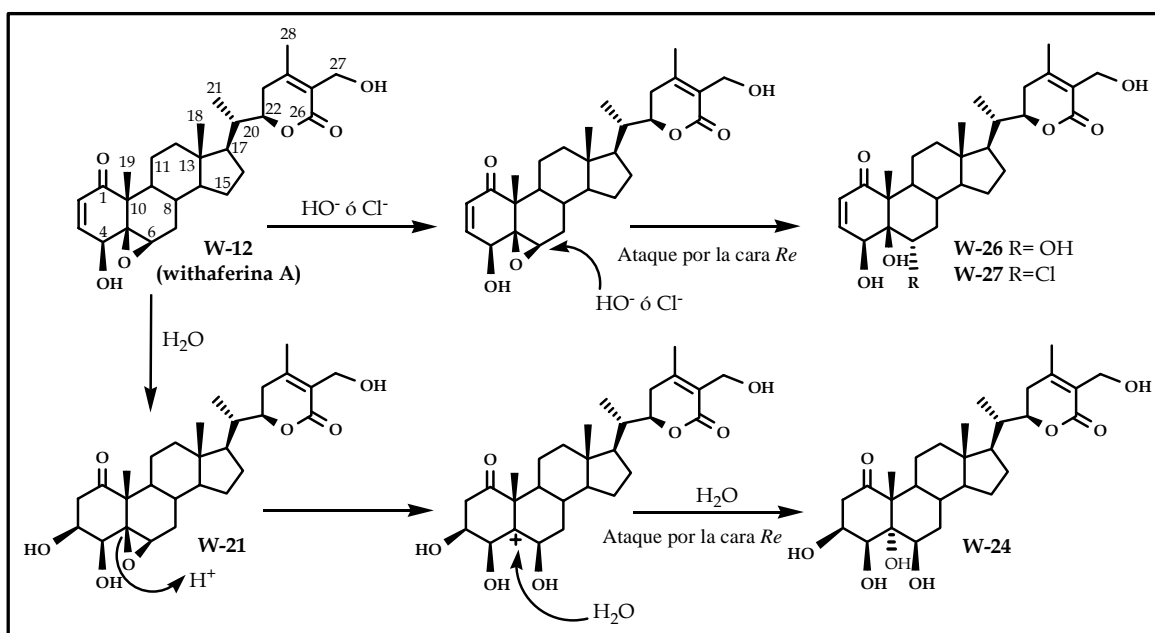


Figura 4.2.47. Mecanismo propuesto para la formación de las withanolidas hidroxiladas en C-5 y C-6, aisladas de *W. aristata*

Tabla 4. Datos^a de RMN ¹H de W-13 a W-16 y de W-23 a W-24

Protón	W-13	W-14	W-15	W-16	W-23	W-24
2	6.21 d (10.0)	6.22 d (9.7)	6.21 d (10.0)	6.22 d (10.0)	2.53 dd (5.0, 15.4) 3.21 dd (6.4, 15.4)	2.53 m* 2.70 d (18.5)
3	6.95 dd (5.9, 10.0)	6.95 dd (5.2, 9.7)	6.95 dd (5.9, 10.0)	6.94 dd (5.9,10.0)	4.34 da (3.7)	4.38 m
4	3.76 d (5.9)	3.79 d (5.2)	3.77 d (5.9)	3.77 d (5.9)	3.46 d (3.7)	4.46 m*
6	3.24 sa	3.26 sa	3.26 sa	3.26 sa	3.31 sa	4.15 d (7.9)
7 α	1.29 m	1.28 m	1.40 m	1.41 m	1.36 m	1.22 m*
7 β	2.15 m	2.16 m	2.21 m	2.21 m	2.20 m	2.08 m
8	1.53 m	1.54 m	1.64 m*	1.72 m*	1.44 m	1.58 m
9	1.02 m	1.05 m	1.11 m	1.09 m	1.33 m	1.52 m
11	1.48 m	1.52 m	1.51 m	1.59 m	1.34 m	1.54 m
	1.83 m	1.87 m	1.93 m	1.91 m	1.53 m	
12	1.13 m	1.14 m	1.50 m*	1.34 m	1.19 m*	1.11 m
	2.00 m*	1.98 m	2.29 m	1.72 m*	1.94 m	2.02 m
14	0.95 m	0.96 m	1.50 m*	1.30 m	1.01 m	1.01 m
15	1.18 m	1.20 m	1.64 m*	1.92 m	1.19 m*	1.22 m*
	1.65 m	1.67 m		2.12 m	1.69 m	1.70 m
16	1.38 m	1.40 m	4.73 sa	5.52 sa	1.40 m	1.41 m
	1.70 m	1.68 m			1.70 m	1.72 m
17	1.10 m	1.10 m			1.13 m	1.15 m
18	0.70 s	0.73 s	0.89 s	0.80 s	0.70 s	0.72 s
19	1.41 s	1.44 s	1.42 s	1.44 s	1.35 s	1.28 s
20	2.00 m*	2.04 m		2.54 m	2.03 m	2.05 m
21	1.00 d (6.6)	1.02 d (6.2)	1.81 s	1.11 d (7.1)	1.03 d (6.4)	1.02 d (6.5)
22	4.41 dt (3.3,13.2)	4.48 da (13.4)	5.37 dd (3.5, 12.9)	4.44 m	4.44 dt (3.0,13.3)	4.46 m*
23 α	2.01 m	2.03 m	2.23 m	2.16 m	2.05 m	2.00 m
23 β	2.53 m	2.57 m	2.72 m	2.56 m	2.55 m	2.53 m*
27	4.88,4.92 d _{AB} (11.9)	4.27, 4.32 d _{AB} (10.0)	4.38, 4.43 d _{AB} (12.6)	4.37,4.41 d _{AB} (12.8)	4.89,4.92 d _{AB} (12.0)	4.36,4.42 d _{AB} (12.4)
28	2.06 s	2.10 s	2.02 s	1.97 s	2.11 s	2.07 s
2'	2.08 s	1.46 s			2.09 s	
3'		1.48 s				
4'		10.62 s				

^aCDCl₃, 400 MHz. *J* entre paréntesis en Hz.

* Señales solapadas.

Tabla 5. Datos^a de RMN ¹³C (δ , CDCl₃) de W-13 a W-16 y de W-23 a W-24

Carbono	W-13	W-14	W-15	W-16	W-23	W-24
C-1	202.1 s	202.4 s	201.9 s	201.8 s	209.8 s	210.4 s
C-2	132.1 d	132.3 d	132.0 d	132.3 d	42.5 t	41.5 t
C-3	141.7 d	141.9 d	141.8 d	141.5 d	68.3 d	72.9 d
C-4	69.6 d	69.9 d	69.6 d	69.8 d	76.3 d	77.7 d
C-5	63.6 s	63.9 s	63.7 s	63.8 s	64.2 s	76.4 s*
C-6	62.3 d	62.7 d	62.2 d	62.2 d	60.1 d	76.4 d*
C-7	30.9 t	31.2 t	30.8 t	31.0 t	30.9 t	31.8 t
C-8	29.5 d	29.4 d	28.4 d	28.1 d	29.0 d	30.9 d
C-9	43.9 d	44.1 d	43.8 d	44.4 d	42.3 d	40.5 d
C-10	47.4 s	47.7 s	47.5 s	47.7 s	50.2 s	54.7 s
C-11	21.9 t	22.2 t	22.0 t	21.5 t	21.8 t	20.8 t
C-12	39.1 t	39.4 t	36.6 t	34.1 t	39.2 t	39.1 t
C-13	42.3 s	42.6 s	44.2 s	46.6 s	42.7 s	42.6 s
C-14	55.8 d	56.1 d	52.4 d	56.8 d*	56.0 d	57.9 d
C-15	24.0 t	24.3 t	36.0 t	30.8 t	24.2 t	24.2 t
C-16	27.0 t	27.3 t	71.5 d	124.5 d	27.3 t	27.3 t
C-17	51.7 d	52.0 d	150.9 s	154.9 s	52.0 d	51.6 d
C-18	11.4 c	11.6 c	16.1 c	16.1 c	11.6 c	11.6 c
C-19	17.2 c	17.5 c	17.1 c	17.0 c	16.1 c	14.7 c
C-20	38.5 d	38.8 d	129.5 s	35.7 d	38.8 d	38.7 d
C-21	13.1 c	13.4 c	12.0 c	16.6 c	13.3 c	13.4 c
C-22	78.0 d	78.8 d	77.6 d	78.8 d	78.2 d	78.9 d
C-23	29.8 t	30.0 t	34.5 t	32.6 t	30.1 t	29.8 t
C-24	156.8 s	156.7 s	153.5 s	152.4 s	157.0 s	153.7 s
C-25	121.6 s	123.0 s	125.1 s	125.4 s	121.9 s	125.5 s
C-26	165.2 s	167.9 s	166.7 s	166.7 s	165.3 s	167.0 s
C-27	57.8 t	54.5 t	57.2 t	56.8 t*	58.0 t	57.3 t
C-28	20.4 c	20.5 c	19.6 c	19.7 c	20.6 c	20.1 c
C-1'	170.7 s	104.9 s			170.9 s	
C-2'	20.7 c	22.4 c			20.9 c	
C-3'		22.7 c				
C-4'		161.5 d				

^a Datos basados en experimentos DEPT, HSQC y HMBC.

* Señales solapadas.

Withanolida W-28

El compuesto que hemos denominado **W-28** presentó una fórmula molecular de $C_{28}H_{38}O_6$, determinada mediante espectrometría de masas de alta resolución, fórmula que está de acuerdo con once grados de insaturación en el compuesto. Un cuidadoso estudio de los espectros de RMN de 1H y ^{13}C (Tabla 6) y de los experimentos bidimensionales 1H - 1H (COSY) y 1H - ^{13}C (HSQC) nos permitieron la asignación de las señales correspondientes a los protones existentes en la molécula.

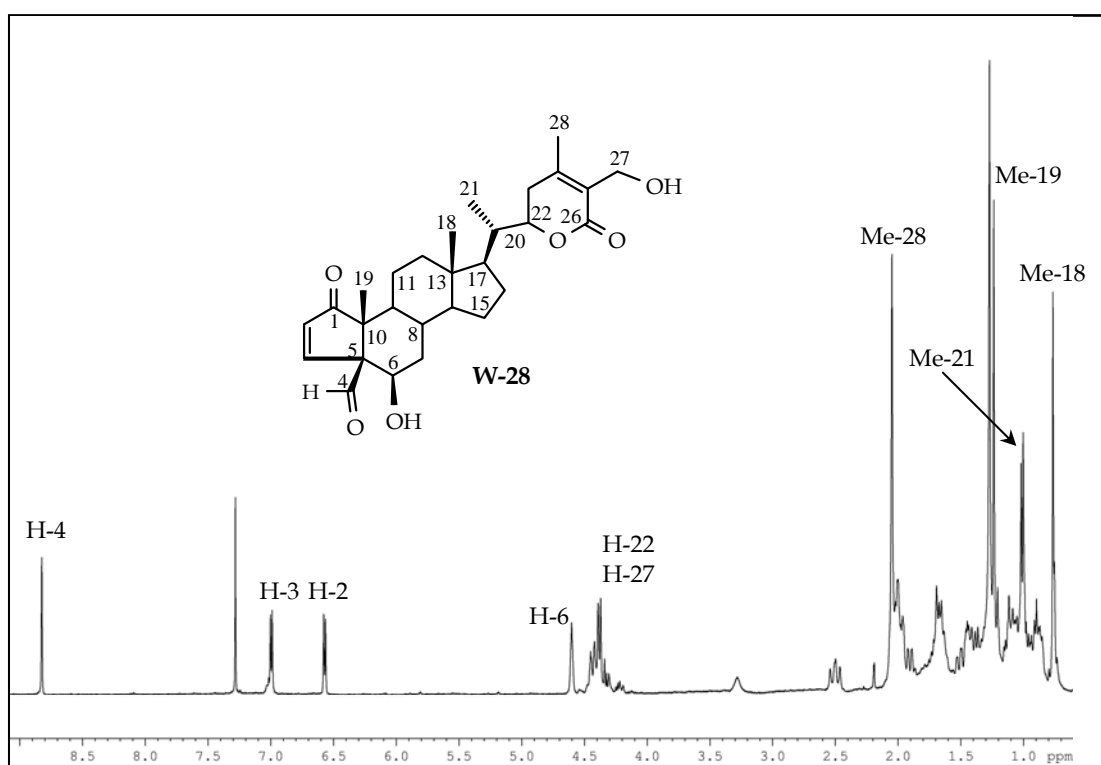


Figura 4.2.48. Espectro de RMN 1H ($CDCl_3$, 400 MHz) de **W-28**.

Así, en su espectro de RMN de 1H se observaron señales correspondientes a cuatro protones metínicos, dos de ellos olefínicos a $6.55 \delta_H$ (d, $J = 5.8$ Hz, H-2) y $6.97 \delta_H$ (d, $J = 5.8$ Hz, H-3) y los dos restantes sobre carbono unido a oxígeno a $4.58 \delta_H$ (sa, H-6) y $4.41 \delta_H$ (dt, $J = 3.6, 13.3$ Hz, H-22). Así mismo, se observaron señales correspondientes a un alcohol primario a $4.34, 4.40 \delta_H$ (d_{AB} , $J = 12.5$ Hz, H-27), un aldehído a $8.79 \delta_H$ (s, H-4), tres metilos singuletes, uno sobre doble enlace a $2.01 \delta_H$ (Me-28) y dos sobre carbonos alifáticos a $0.77 \delta_H$ (Me-18) y $1.22 \delta_H$ (Me-19) y un metilo como doblete a $1.01 \delta_H$ ($J = 6.7$ Hz, Me-21).

Estos datos fueron confirmados mediante RMN ^{13}C y experimentos DEPT 90 y 135, donde se observaron señales para veintiocho carbonos, destacando el desplazamiento a campos mas bajos de las señales asignadas a los carbonos C-1 (208.9 δ_{C}), C-2 (136.8 δ_{C}), C-3 (152.5 δ_{C}), C-4 (199.7 δ_{C}), C-5 (70.9 δ_{C}), C-6 (67.0 δ_{C}), C-7 (35.2 δ_{C}), C-9 (47.0 δ_{C}), y C-10 (55.5 δ_{C}), de los anillos A-B, así como desplazamiento a campos mas altos del Me-19 (12.1 δ_{C}), al compararlos con los datos del espectro de RMN ^{13}C del compuesto **W-12**⁶⁰.

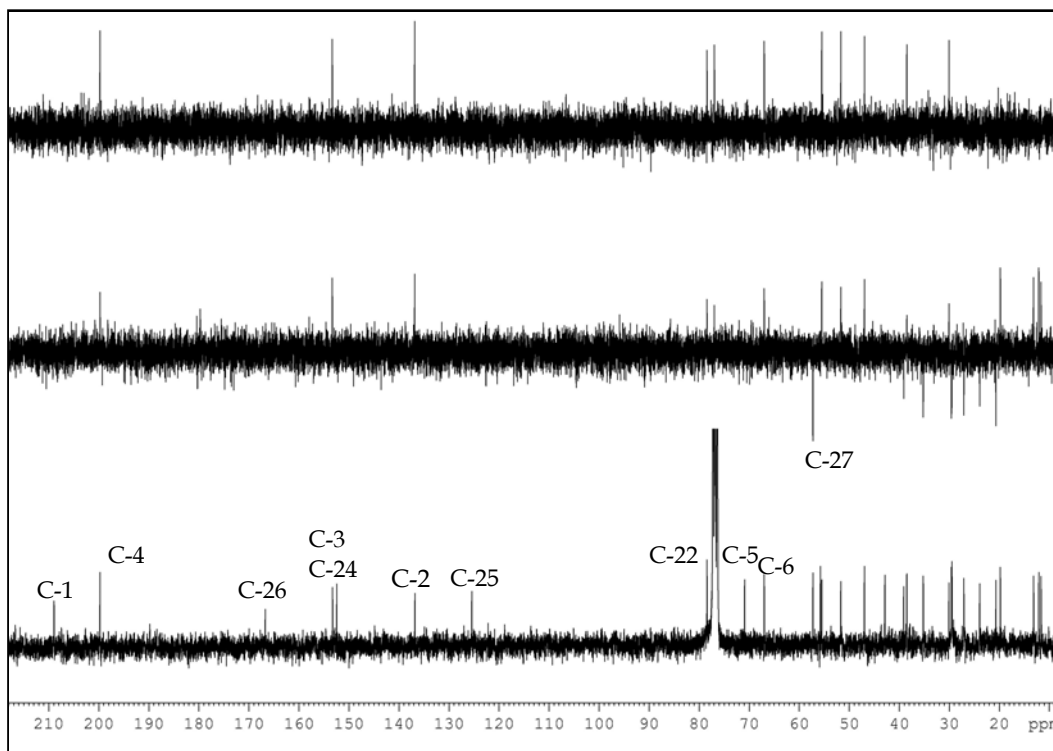


Figura 4.2.49. Espectro de RMN ^{13}C y experimentos DEPT (CDCl_3 , 100 MHz) de **W-28**.

El conjunto de estos datos nos indicaron que el producto **W-28** es una withanolida pentacíclica que presenta una 2-en-1-ona, una lactona α,β -insaturada, un alcohol secundario, un alcohol primario y un aldehído. El estudio de los experimentos bidimensionales homonucleares (COSY y ROESY) y heteronucleares (HSQC y HMBC) nos permitieron establecer la posición y estereoquímica relativa de los diferentes grupos sobre la molécula.

En el experimento ^1H - ^1H COSY se observó acoplamiento entre los protones H-2 y H-3; correlación de H-6 con H-7 y OH-6, del Me-21 con H-20 y de H-22 con H-20 y H-23.

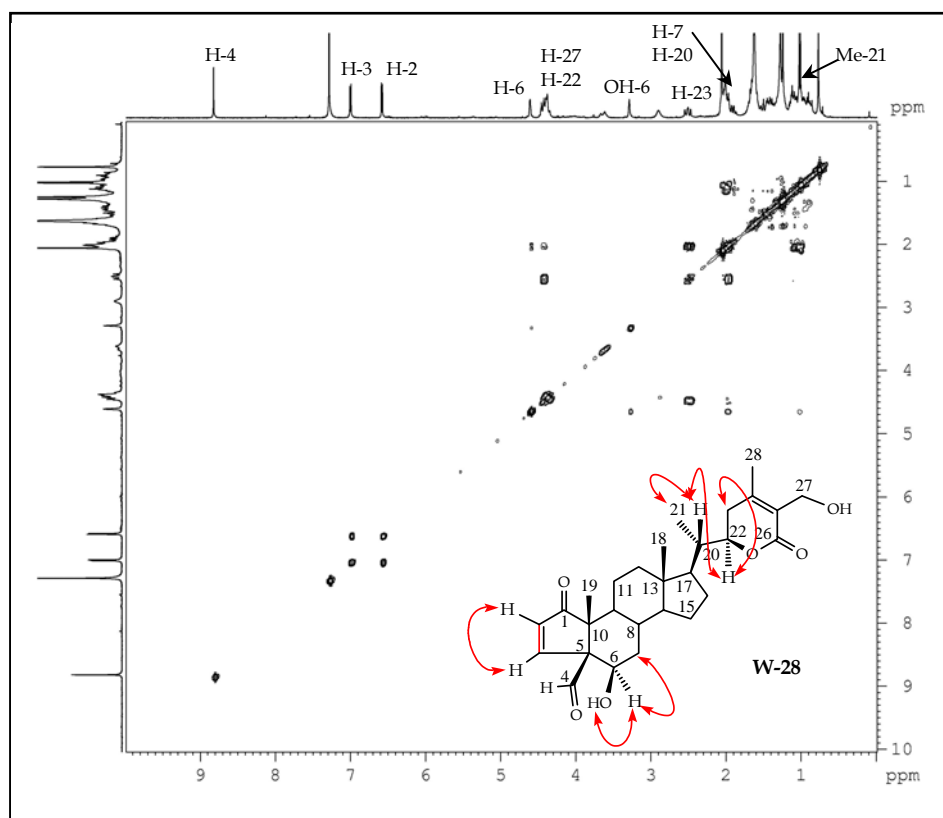


Figura 4.2.50. Experimento COSY de W-28.

La localización de los distintos grupos funcionales en la molécula se determinó a partir de las correlaciones a larga distancia observadas en un experimento HMBC. Las correlaciones de H-2/C-5, C-10; H-3/C-1, C-4, C-5 y H-4/C-5, C-6, C-7, nos permitió situar de forma inequívoca el aldehído sobre C-4 y por consiguiente, el anillo A se encuentra contraído a 5 miembros. Además, se observó correlación del Me-19 con C-1, C-5, C-9 y C-10. El anillo lactónico, característico de las withanolidas, fue confirmado por las correlaciones observadas, siendo las más significativas las de los protones geminales al alcohol primario H-27 y los carbonos C-24, y C-26, así como correlación del Me-28 con C-23 y C-25.

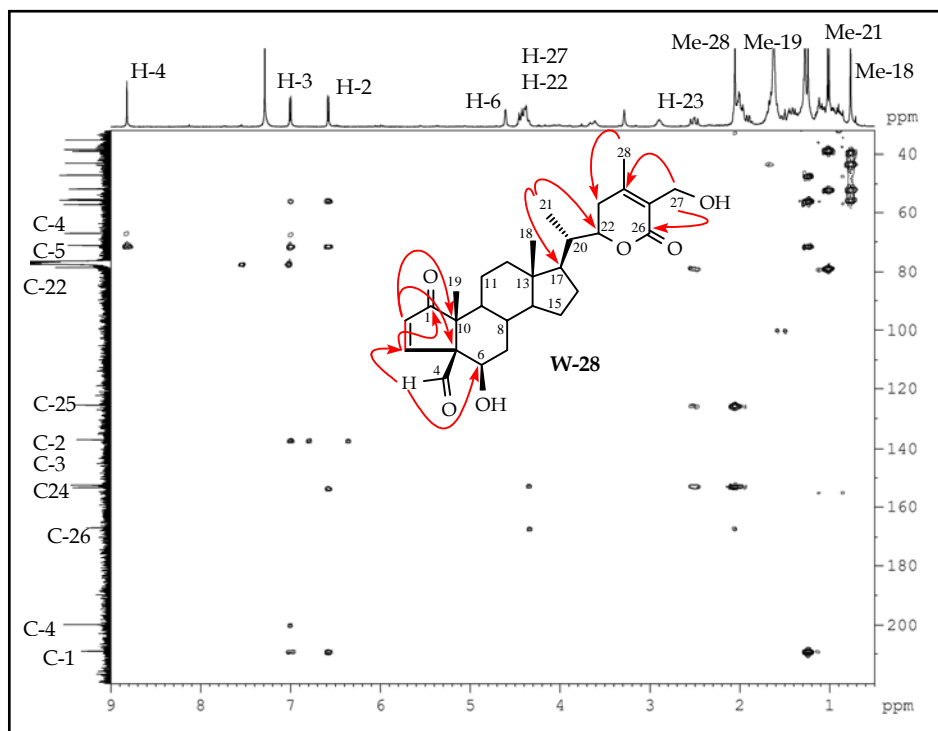


Figura 4.2.51. Experimento HMBC de W-28.

La estereoquímica relativa de nuestro producto **W-28** fue establecida por comparación con los datos obtenidos en la bibliografía para este tipo de compuestos⁹², y confirmada mediante un experimento ROESY, donde se observó efecto ROE entre los protones del Me-19 β y H-4, lo que nos permitió establecer la estereoquímica del aldehído sobre C-4 como β , el grupo hidroxilo se estableció como OH-6 β al observarse efecto ROE de éste con los protones del metilo Me-19 β . Así mismo, se observó correlación entre H-22 α y H-23, lo que nos permitió fijar los desplazamientos de los dos protones sobre el carbono C-23.

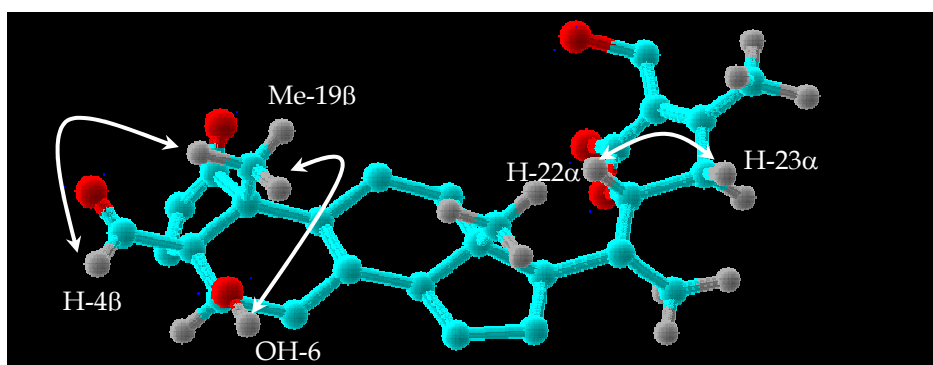


Figura 4.2.52. Efectos ROE observados en el experimento ROESY de W-28.

⁹² Lavie, D.; Kashrnan, Y.; Glotter, E.; Danieli N. J. *Chem. Soc.*, **1966**, 1757.

Ello permitió establecer la estructura de W-28 como **4 β -formil-6 β ,27-dihidroxi-5-nor-1-oxo-witha-2,24-dienolida**.

Withanolida W-29

El compuesto que denominamos **W-29** había sido descrito anteriormente, sin embargo es la primera vez que se aísla como producto natural, existiendo como única referencia de este compuesto la de su síntesis a partir de la withaferina A, llevada a cabo por Lavie y Nittala⁵⁸ en 1982. Estos autores aportan sólo datos espectroscópicos parciales de RMN ¹H para este producto. Por ello, en esta Memoria se aporta la asignación completa de sus datos de protón y carbono, que se llevó a cabo mediante el estudio de sus datos espectroscópicos de RMN 1D y 2D.

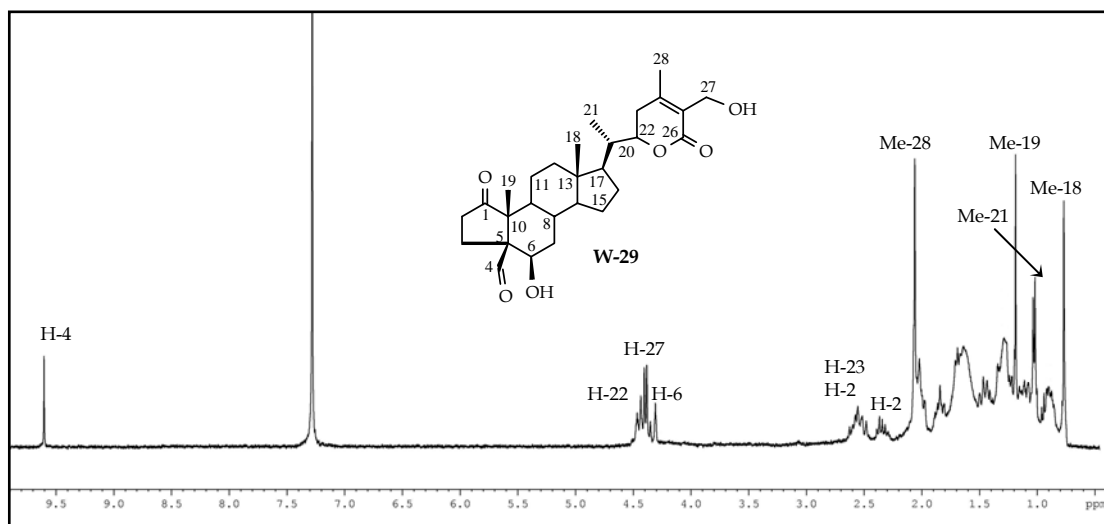


Figura 4.2.53. Espectro de RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) de **W-29**.

A pesar de que existen numerosos ejemplos de withanolidas con el anillo A contraído a cinco miembros, todos ellos son derivados sintéticos, por lo que **W-28** y **W-29** representan los primeros ejemplos de productos naturales con esta característica estructural.

Tabla 6. Datos de RMN ¹H y RMN ¹³C (δ , CDCl₃) de W-28 y W-29.

Posición	W-28	W-29	W-28	W-29
	δ_H	δ_H	δ_C^a	δ_C^a
1			208.9 s	216.2 s
2	6.55 d (5.8)	2.39 m 2.57 m	136.8 d	32.5 t
3	6.97 d (5.8)	1.83 m* 2.03 m	152.5 d	22.5 t
4	8.79 s	9.60 s	199.7 d	204.3 d
5			70.9 s	60.5 s
6	4.58 sa	4.31 t (2.8)	67.0 d	67.4 d
7	1.00 m 1.96 m	1.49 m 1.87 m	35.2 t	33.9 t
8	1.89 m	1.83 m*	30.1 d	28.9 d
9	1.12 m	1.09 m	47.0 d	41.9 d
10			55.5 s	52.4 s
11	1.43 m	1.27 m* 1.67 m	20.7 t	22.4 t
12	1.06 m	1.12 m 2.02 m	39.1 t	39.1 t
13			42.9 s	43.0 s
14	0.94 m	1.08 m	55.8 d	55.7 d
15	1.23 m 1.64 m	1.27 m* 1.71 m*	23.9 t	23.9 t
16	1.40 m 1.66 m	1.43 m 1.71 m*	27.1 t	27.1 t
17	1.09 m	1.16 m	51.7 d	51.7 d
18	0.77 s	0.77 s	11.7 c	11.7 c
19	1.22 s	1.19 s	12.1 c	13.1 c
20	2.00 m	2.04 m	38.5 d	38.5 d
21	1.01 d (6.7)	1.03 d (6.6)	13.1 c	13.2 c
22	4.41 dt (3.6, 13.3)	4.45 dt (3.5, 13.0)	78.4 d	78.5 d
23	1.97 m 2.51 m	2.00 m 2.54 m	29.5 t	29.5 t
24			153.3 s	152.5 s
25			125.5 s	125.5 s
26			166.7 s	166.8 s
27	4.34, 4.40 d _{AB} (12.5)	4.37, 4.42 d _{AB} (12.3)	57.2 t	57.3 t
28	2.01 s	2.06 s	19.8 c	19.8 c

^aDatos basados en experimentos DEPT, HSQC y HMBC.

*Señales solapadas.

Withanolida W-30

El compuesto que hemos denominado **W-30** presentó una fórmula molecular de $C_{28}H_{38}O_8$, determinada mediante espectrometría de masas de alta resolución, fórmula que indica la presencia en el compuesto de diez grados de insaturación. En su espectro de IR se observaron bandas de absorción a 3740 y 1700 cm^{-1} , que indican la presencia de grupos hidroxilo y carbonilo α,β -insaturado, respectivamente. En el espectro de UV se puede observar una banda de absorción a 216 nm , característica de carbonilo α,β -insaturado.

Un cuidadoso estudio de los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C (Tablas 7 y 8) y de los experimentos bidimensionales ^1H - ^1H (COSY) y ^1H - ^{13}C (HSQC) nos permitieron la asignación de las señales correspondientes a los protones existentes en la molécula.

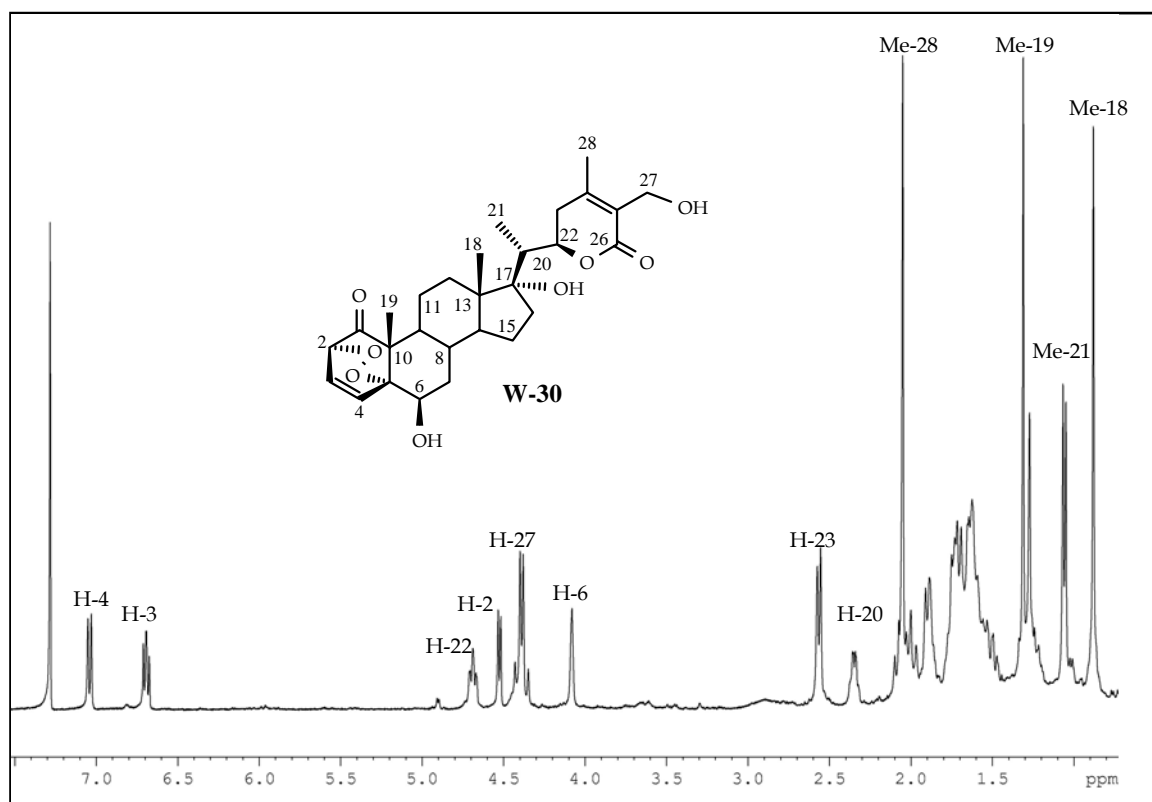


Figura 4.2.54. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de **W-30**.

Así, en su espectro de RMN de ^1H se observaron señales asignables a dos protones olefínicos a $6.69\ \delta$ (dd, $J = 6.2, 8.2\text{ Hz}$, H-3) y $7.04\ \delta$ (d, $J = 8.2\text{ Hz}$, H-4); dos protones metínicos sobre carbono unido a oxígeno a $4.53\ \delta$ (d, $J = 6.2\text{ Hz}$, H-2) y $4.08\ \delta$ (sa, H-6) y señales correspondientes a un alcohol primario a $4.37, 4.42\ \delta$ (d_{AB} , $J = 12.6\text{ Hz}$, H-27). Así mismo, se observaron señales correspondientes a cuatro metilos, dos de ellos sobre

carbonos alifáticos a 0.88 δ (Me-18) y 1.31 δ (Me-19), uno sobre doble enlace a 2.05 δ (Me-28) y un metilo como doblete a 1.06 δ ($J=7.0$ Hz, Me-21).

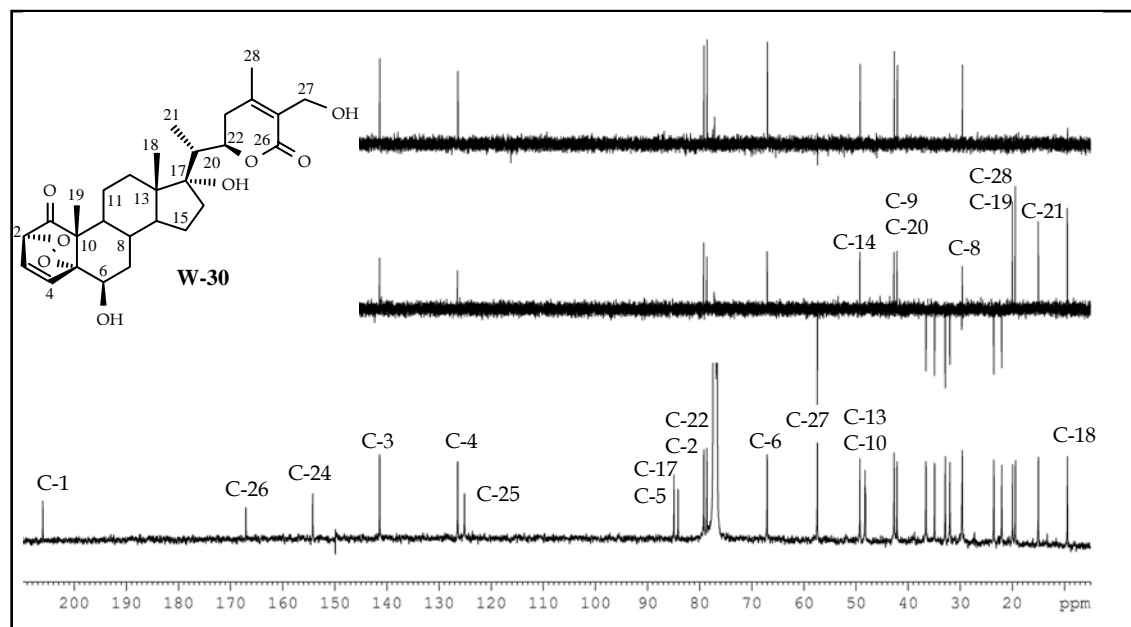


Figura 4.255. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) y experimentos DEPT de W-30.

Estos datos fueron confirmados mediante RMN ^{13}C y experimentos DEPT 90 y 135, donde se observaron señales para 28 carbonos, destacando en la región del espectro a campo bajo, señales de carbonos unidos a oxígeno a 78.6 δ (C-2), 84.2 δ (C-5), 67.1 δ (C-6), 84.9 δ (C-17), carbonos vinílicos a 126.5 δ (C-3) y 141.4 δ (C-4), grupo carbonilo a 206.0 δ_{C} (C-1), así como carbonos asignables a sistema lactónico, característico de las withanolidas, con señales a 57.4 δ (C-27); 79.2 δ (C-22), 125.1 δ_{C} (C-25), 154.3 δ_{C} (C-24) y 167.1 δ_{C} (C-26).

El experimento ^1H - ^1H COSY confirmó la presencia de un sistema ABX en el anillo A, donde se observó acoplamiento de H-4 (δ 7.04) con H-3 (δ 6.69) y de éste con H-2 (δ 4.53); así mismo, se observó correlación del metilo Me-21 con el protón H-20 y del protón H-22 con H-20 y H-23.

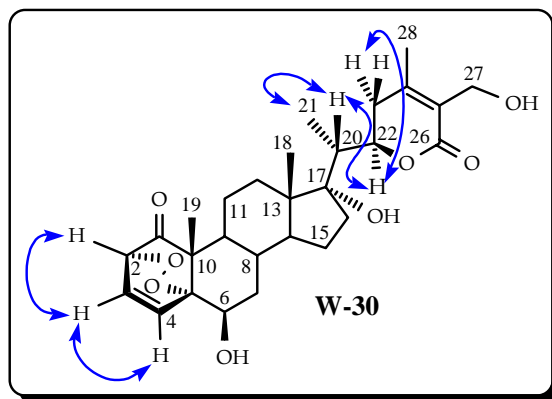


Figura 4.2.56. Correlaciones observadas en el experimento COSY de **W-30**.

Estos datos nos indican que **W-30** presenta una estructura de withanolida con un alcohol primario, un alcohol secundario y un alcohol terciario y un doble enlace, además del sistema lactónico característico de estas estructuras. La presencia de los dos carbonos unidos a oxígeno a δ 78.6 (d) y δ 84.2 (s), unido a la fórmula molecular $C_{28}H_{38}O_8$, obtenida mediante espectrometría electrospray de alta resolución, nos indican la presencia en la molécula de un sistema endoperóxido.

El estudio de los experimentos bidimensionales homonucleares (COSY y ROESY) y heteronucleares (HSQC y HMBC) nos permitieron establecer la posición y estereoquímica relativa de los diferentes grupos sobre la molécula.

La localización de los distintos grupos funcionales en la molécula se determinó a partir de las correlaciones a larga distancia observadas en un experimento HMBC. Así, las correlaciones de la señal a δ_H 4.53 (H-2) con los carbonos C-1, C-3 y C-4; correlación de la señal a δ_H 7.04 (H-4) con los carbonos C-2, C-5, C-6 y C-10 y del metilo a δ_H 1.31 (Me-19) con los carbonos C-1, C-5, C-9 y C-10, nos permitieron fijar la cetona en C-1, el doble enlace en C3-C4, el anillo endoperóxido entre los carbonos C2-C5 y el alcohol secundario sobre C-6. La estructura del anillo D y la cadena lateral se estableció en base a las correlaciones de los hidrógenos del metilo Me-18 con los carbonos C-12, C-13, C-14, C-17 y del Me-21 con los carbonos C-17, C-20 y C-22. El anillo lactónico, característico de las withanolidas, fue confirmado por las correlaciones observadas entre los protones del Me-28 con C-23, C-24, C-25 y C-26.

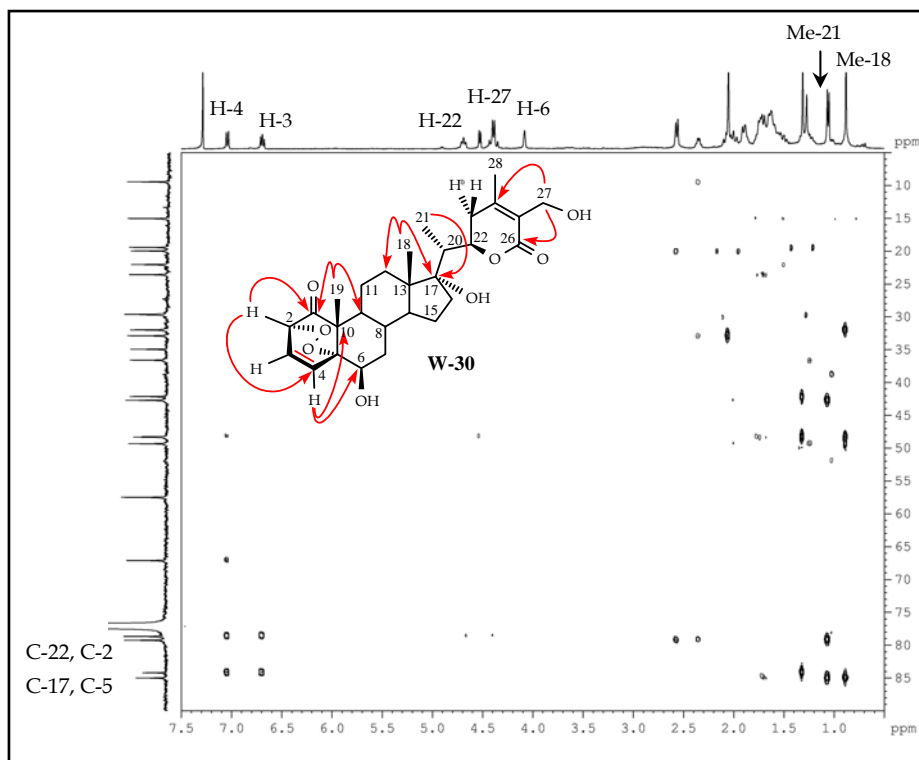


Figura 4.2.57. Experimento HMBC de W-30.

La estereoquímica relativa del producto **W-30** fue establecida por comparación con los datos obtenidos en la bibliografía para este tipo de compuestos⁵⁴, mediante modelización en PC Model⁸⁹ y un experimento ROESY. Así, se observaron efectos ROE de los protones H-3 y H-4 con Me-19, efectos que sólo se observan si el puente dioxano se encuentra en disposición α . Los efectos ROE observados entre H-6 y los dos protones H-7, así como la multiplicidad de la señal a δ_H 4.10, asignada a H-6, como un singulete ancho, nos permitió fijar la disposición del grupo hidroxilo sobre C-6 como β -axial.

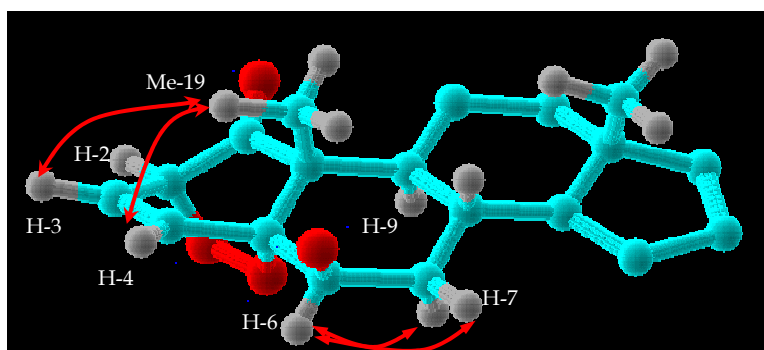
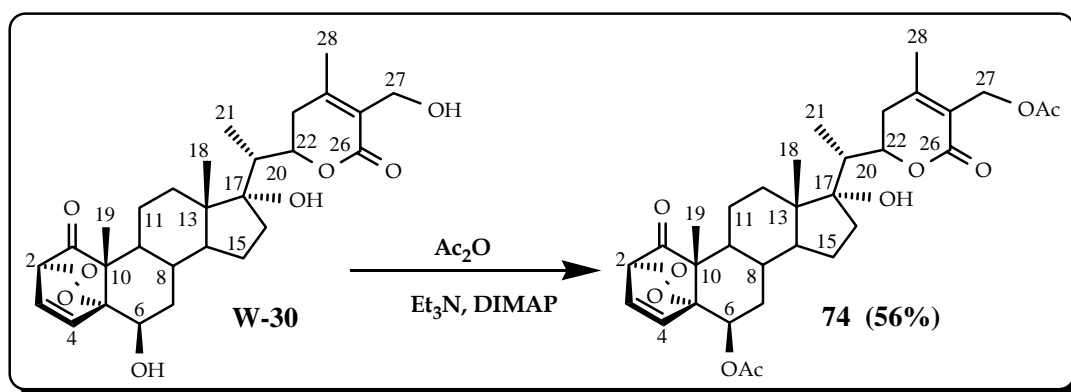


Figura 4.2.58. Efectos ROE más significantes en el experimento ROESY de W-30.

El conjunto de estos datos nos permiten proponer la estructura de **6 β ,17 α ,27-trihidroxi-2 α ,5 α -dioxan-1-oxo-witha-3,24-dienolida**.

La acetilación del compuesto **W-30** como se indica en el apartado 5.3. de esta memoria, rindió un único producto, el derivado diacetilado en las posiciones C-6 y C-27 (**74**). La obtención de este derivado confirma, así mismo, la localización del anillo endoperóxido en el compuesto **W-30**.



El estudio de los datos espectroscópicos y espectrométricos nos permitió establecer la estructura del derivado **74**. Así, éste presentó como principal característica en su espectro de RMN ^1H , el desplazamiento de las señales asignadas a δ_{H} 5.38 (H6) y δ_{H} 4.89, 4.93 (H-27) a campos más bajos con respecto al producto de partida **W-30**, así como la aparición de señales características para dos metilos de grupos acetatos a δ_{H} 2.09 y 2.16.

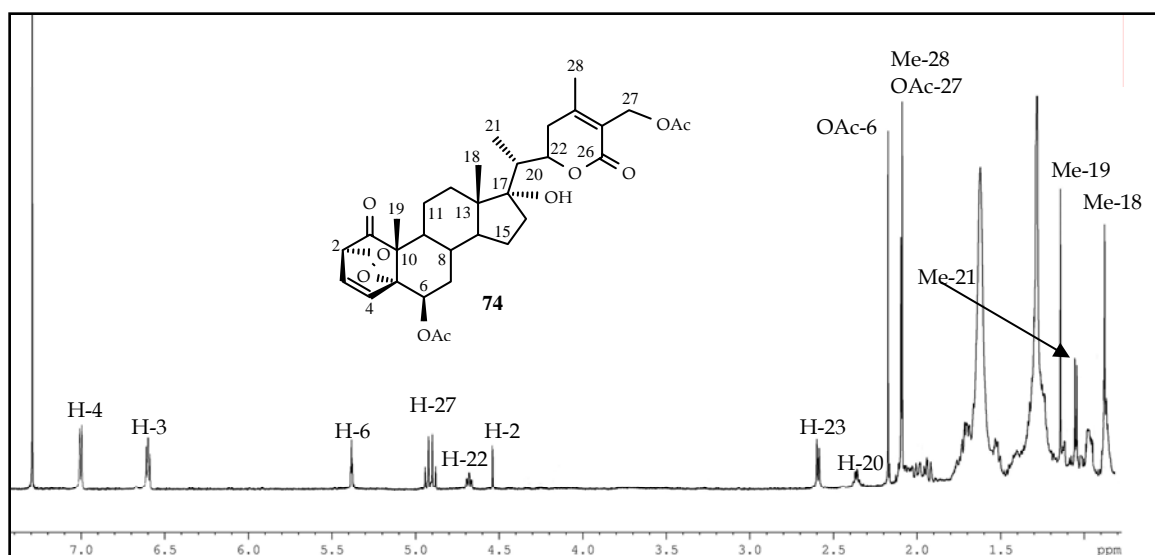


Figura 4.2.59. Espectro de RMN ^1H (CDCl₃, 400 MHz) del derivado **74**.

Estos datos fueron confirmados por estudios 2D de RMN, destacando las correlaciones observadas en un experimento HMBC de H-6 (5.38 δ_{H}) y H-27 (4.89, 4.93 δ_{H}) con los carbonos carboxílicos de los grupos acetatos a 169.6 δ_{C} y 171.0 δ_{C} , respectivamente.

Estos datos nos permiten establecer la estructura del derivado **74** como **6 β ,27-diacetoxi-17 α -hidroxi-2 α ,5 α -dioxan-1-oxo-witha-3,24-dienolida** y a su vez confirmar la estructura del producto natural **W-30**.

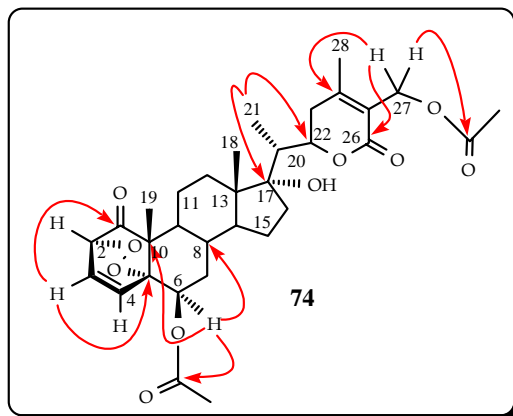


Figura 4.2.60. Correlaciones observadas en el experimento HMBC del derivado **74**.

Withanolida W-31

Al compuesto que hemos denominado **W-31** le hemos asignado la fórmula molecular $C_{28}H_{36}O_7$, fijada basándonos en sus datos de espectrometría de masas de alta resolución, indicando 18 m/z menos que **W-30**. En el estudio de su espectro de IR se observó la presencia de bandas de absorción correspondientes a grupo hidroxilo (3410 cm^{-1}) y carbonilo α,β -insaturado (1681 cm^{-1}), este último confirmado además por la presencia de una banda de absorción característica a 214 nm en su espectro de UV.

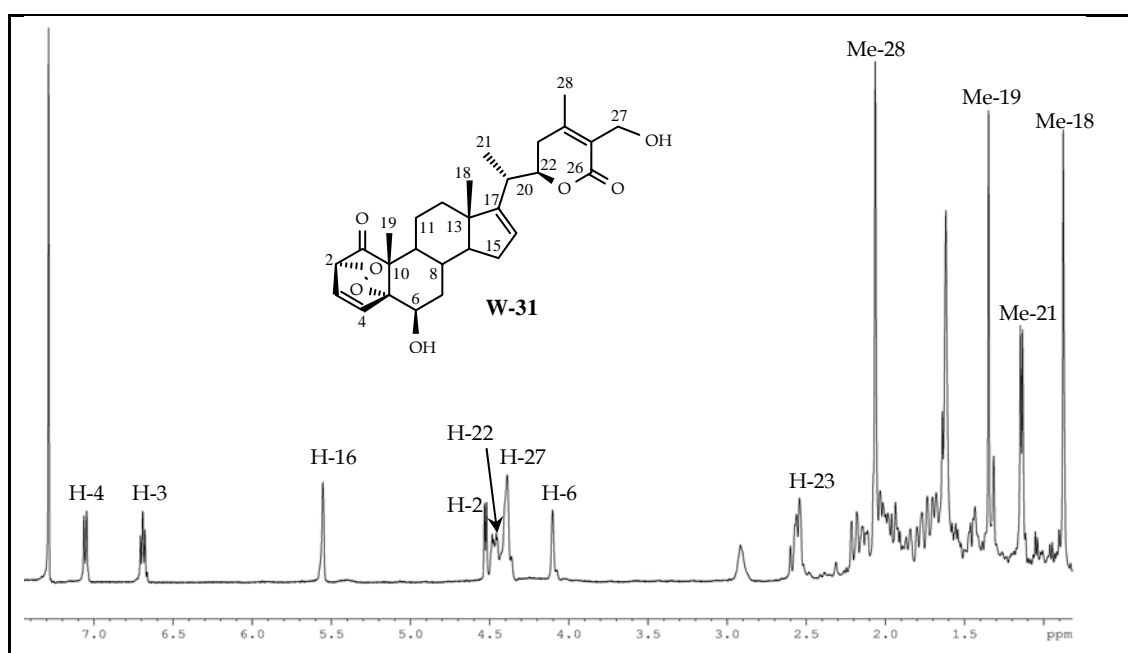


Figura 4.2.61. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de **W-31**.

Un estudio comparativo de los datos espectroscópicos de **W-30** y **W-31** mostró que ambos productos presentan como principal diferencia en sus espectros de RMN de ^1H y ^{13}C (Tablas 7 y 8) la ausencia de las señales correspondientes al alcohol terciario a $84.9 \delta_{\text{C}}$ (s, C-17) y de un metileno (δ_{H} 1.63, 1.71; δ_{C} 34.9) presentes en **W-30**, así como la presencia de un doble enlace adicional con señales a $5.55 \delta_{\text{H}}$ (H-16), $124.4 \delta_{\text{C}}$ (C-16) y $155.3 \delta_{\text{C}}$ (C-17) en **W-31**.

El estudio de los experimentos bidimensionales homonucleares (COSY y ROESY) y heteronucleares (HSQC y HMBC) nos permitieron confirmar la posición y estereoquímica relativa de los diferentes grupos sobre la molécula.

Así, el experimento ^1H - ^1H COSY confirmó la presencia de un sistema ABX en el anillo A, con acoplamientos de H-4 ($7.05 \delta_{\text{H}}$) con H-3 ($6.69 \delta_{\text{H}}$) y de este último con H-2 ($4.53 \delta_{\text{H}}$). Así mismo, se observó correlación del protón H-16 ($5.55 \delta_{\text{H}}$) con H-15 ($2.10 \delta_{\text{H}}$) indicando la presencia del doble enlace C16-C17.

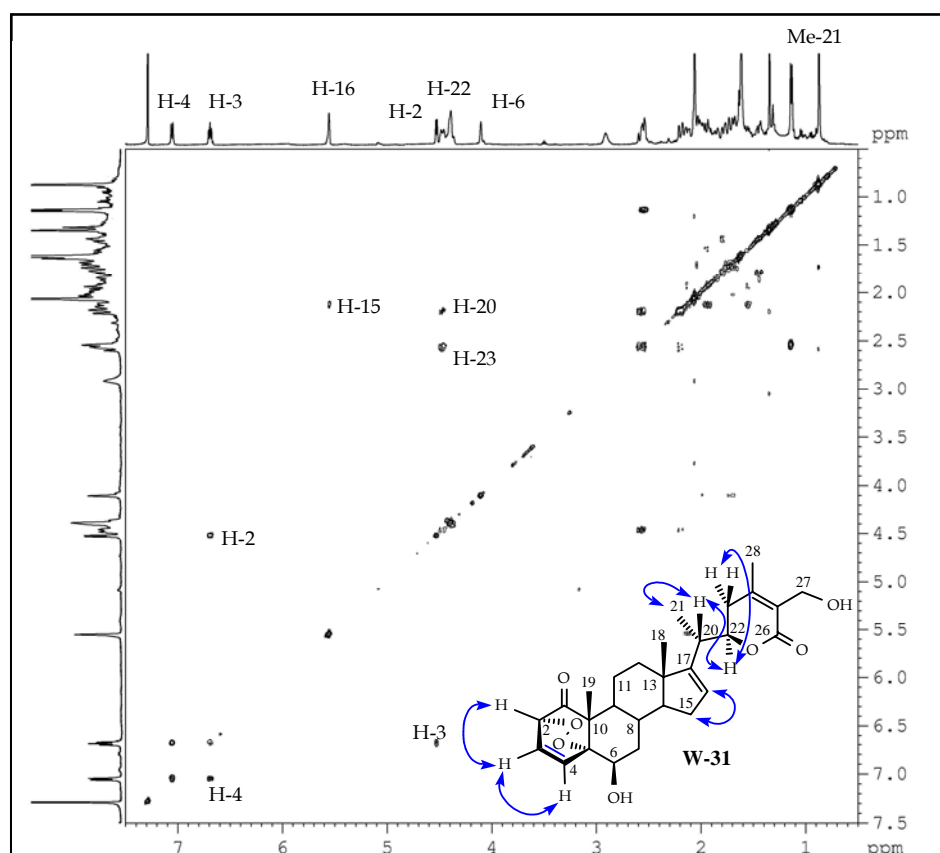


Figura 4.2.62. Experimento COSY de **W-31**.

La localización de los distintos grupos funcionales en **W-31** se determinó por comparación de los datos espectroscópicos con los del producto **W-30** y a partir de las correlaciones a larga distancia observadas en un experimento HMBC, destacando las correlaciones del metilo Me-18 con los carbonos C-12, C-13, C-14, C-17 y del Me-21 con los carbonos C-17, C-20 y C-22, lo que nos permitió confirmar el doble enlace en los carbonos C16-C17.

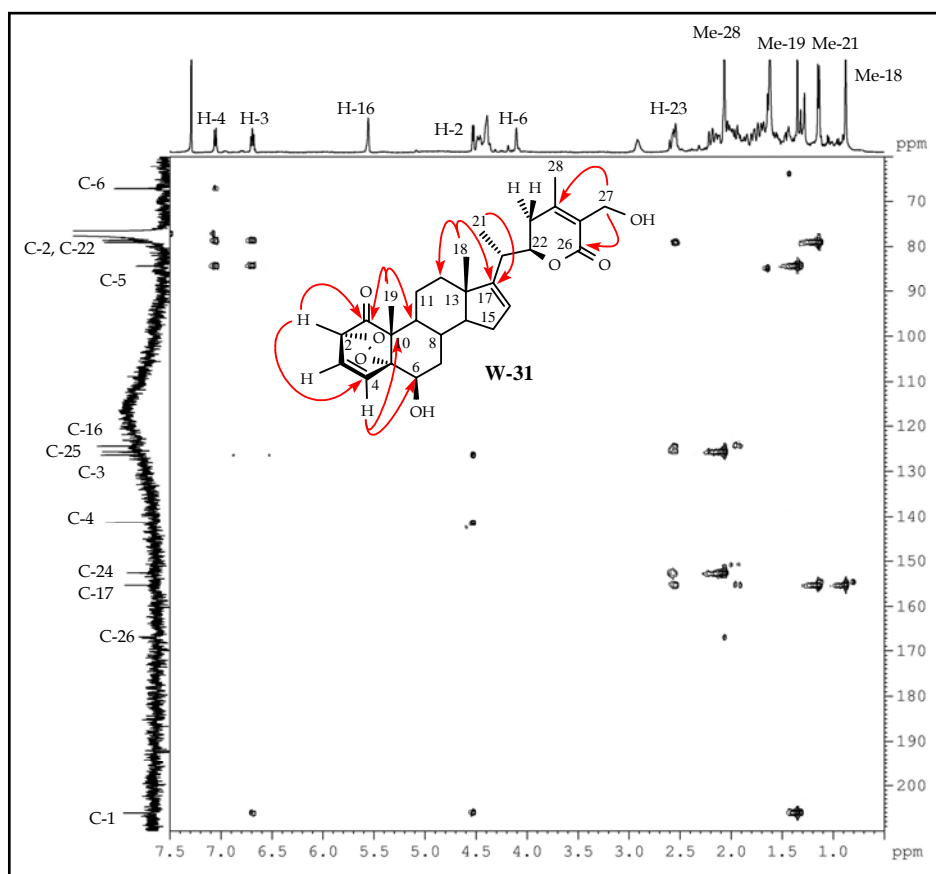


Figura 4.2.63. Experimento HMBC de **W-31**.

La estereoquímica relativa del producto **W-31** se estableció mediante modelización molecular en PC Model⁹⁰ y un experimento ROESY, donde se observaron los mismos efectos ROE que en el producto **W-30**, situando el puente dioxano en C2 α -C5 α y el grupo hidroxilo sobre C-6 como β -axial.

Estos datos nos permiten establecer la estructura del producto **W-31** como **6 β ,27-dihidroxi-2 α ,5 α -dioxan-1-oxo-witha-3,16,24-trienolida**.

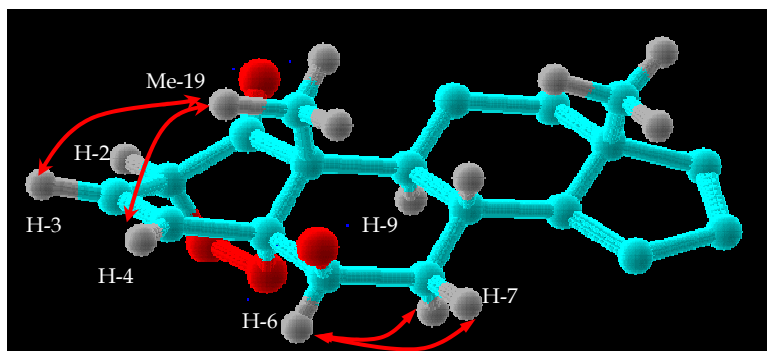


Figura 4.2.64. Efectos ROE más significantes en el experimento ROESY de **W-31**.

Withanolida **W-32**

El producto **W-32** presentó una fórmula molecular de $C_{28}H_{38}O_7$, determinada mediante espectrometría de masas de alta resolución. En su espectro de IR se observaron bandas de absorción a 3444 y 1700 cm^{-1} , que indican la presencia de grupos hidroxilo y carbonilo α,β -insaturado, respectivamente. El espectro de UV presentó una banda de absorción a 217 nm, característica de carbonilo α,β -insaturado.

Un estudio comparativo de los datos espectroscópicos de **W-31** y **W-32** mostró que ambos productos presentan como principal diferencia en sus espectros de RMN de 1H y ^{13}C (Tablas 7 y 8) la ausencia de las señales asignadas al doble enlace C16-C17 presente en **W-31** [$5.55 \delta_H$ (1H, sa, H-16), $124.4 \delta_C$ (d, C-16), $155.3 \delta_C$ (s, C-17)] y la presencia de señales correspondientes a un metino y metileno en **W-32** [$1.40, 1.69 \delta_H$ (2H, m, H-16) y $27.2 \delta_C$ (t, C-16); $1.16 \delta_H$ (1H, m, H-17) y $51.9 \delta_C$ (d, C-17)].

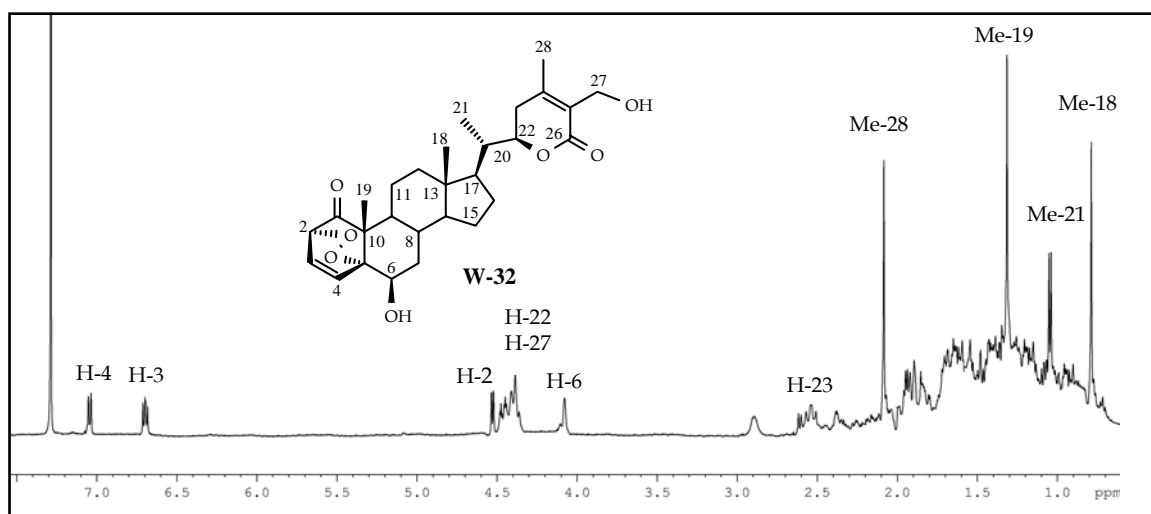


Figura 4.2.65. Espectro de RMN 1H ($CDCl_3$, 400 MHz) de **W-32**.

La estructura propuesta fue confirmada mediante el estudio de los experimentos bidimensionales homo (COSY y ROESY) y heteronucleares (HSQC y HMBC) los cuales mostraron correlaciones muy similares a las mostradas para el producto **W-31**.

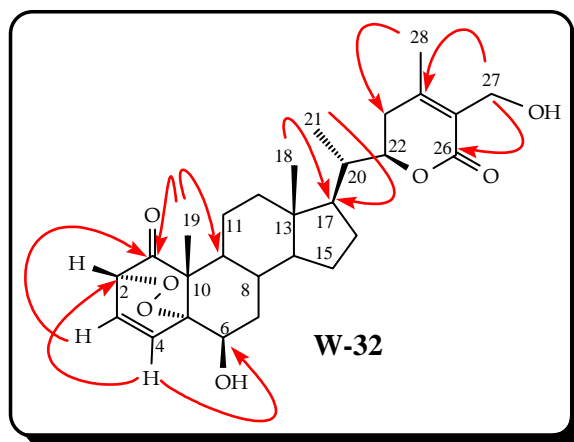


Figura 4.2.66. Correlaciones del experimento HMBC de **W-32**.

La estereoquímica relativa del producto **W-32** fue establecida al igual que para el producto **W-30**, por comparación con los datos obtenidos en la bibliografía para este tipo de compuestos y confirmada mediante modelización molecular en PC Model⁹⁰ y un experimento ROESY, donde se observó efecto ROE entre H-4 y el Me-19, fijando con ello la disposición del puente dioxano como α . El efecto ROE de H-6 con los dos protones H-7 y la constante de acoplamiento pequeña de éste, nos permitió fijar H-6 como α ecuatorial.

El conjunto de estos datos nos permiten proponer la estructura de **6 β ,27-dihidroxi-2 α ,5 α -dioxan-1-oxo-witha-3,24-dienolida**.

Withanolida **W-33**

El compuesto que hemos denominado **W-33** presentó la misma fórmula molecular $C_{28}H_{38}O_8$, que el compuesto anterior **W-30**, determinada mediante espectrometría de masas de alta resolución. Esta coincidencia, junto con las similitudes mostradas en sus datos de RMN nos indicó que ambos productos son isómeros. Así, las principales diferencias entre sus espectros de RMN 1H fueron el desplazamiento a campos más altos de H-4 ($6.58 \delta_H$) y H-9 ($1.03 \delta_H$) y el desplazamiento del Me-19 ($1.61 \delta_H$) a campos más bajos en **W-33** con respecto al producto **W-30** [$7.04 \delta_H$ (H-4), $1.90 \delta_H$ (H-9) y $1.31 \delta_H$ (Me-19)]. Estos datos fueron confirmados mediante RMN ^{13}C y experimentos DEPT 90 y 135, donde se observaron pequeñas variaciones en los carbonos de los anillos A y B,

destacando el desplazamiento a campos más altos del Me-19 (16.0 δ_H) y a campos más bajos de C-9 (50.0 δ_H), con respecto al compuesto **W-30** (Tablas 7 y 8).

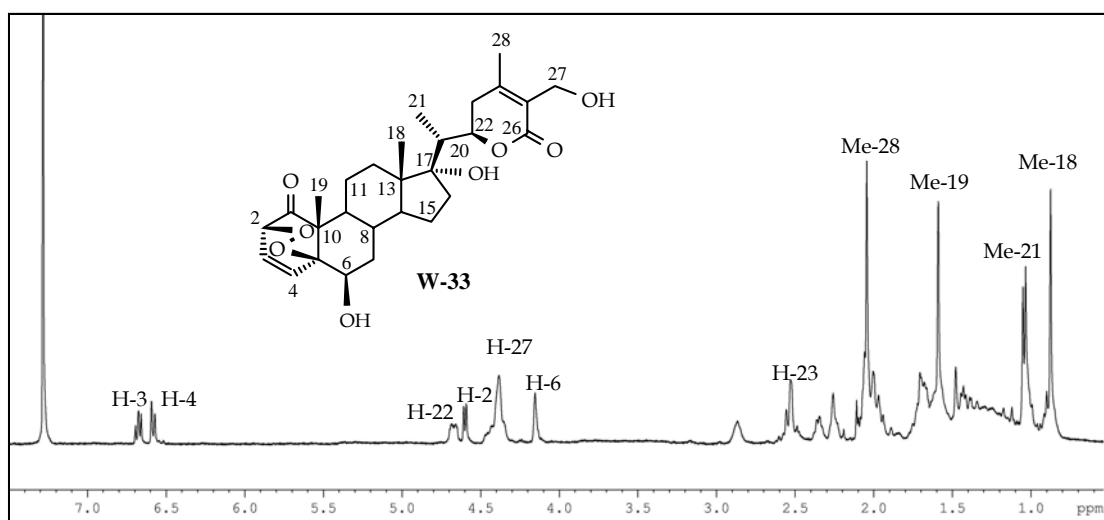


Figura 4.2.67. Espectro de RMN 1H ($CDCl_3$, 400 MHz) de **W-33**.

La localización de los distintos grupos funcionales en la molécula se determinó a partir de las correlaciones observadas en un experimento HMBC. Así, destacamos como correlaciones más significativas las de H-2/C-1, C-3, C-4; H-4/C-2, C-5, C-6, C-10; H-6/C-5, C-8, C-10 y del Me-19/C-1, C-5, C-9, C-10, lo que nos permitió fijar los distintos grupos sobre los anillos A y B.

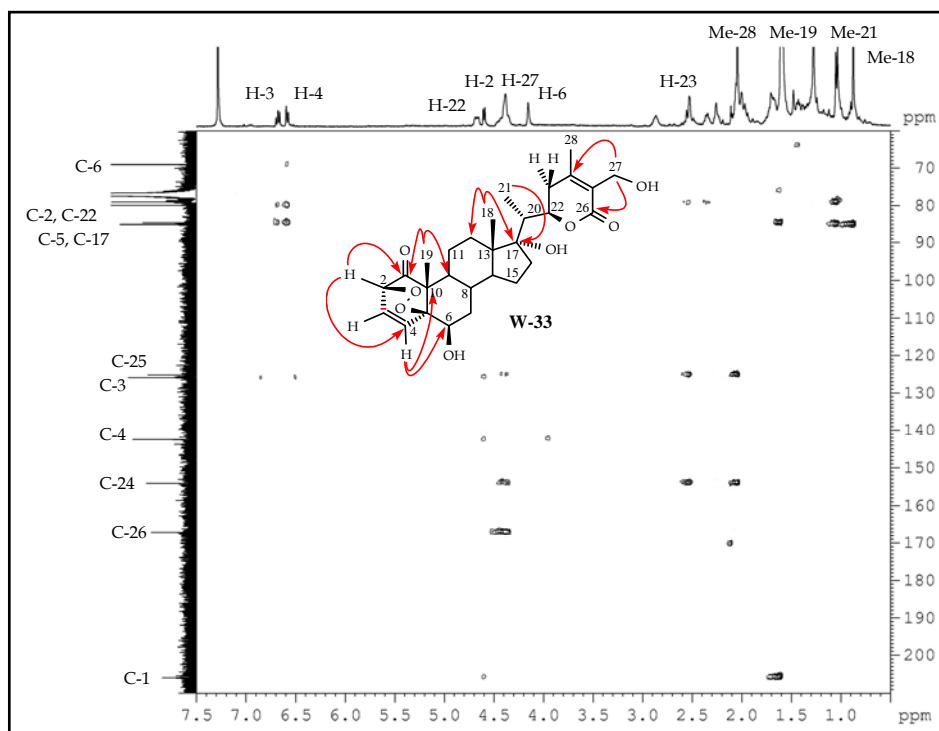


Figura 4.2.68. Experimento HMBC de **W-33**.

La estereoquímica relativa del producto **W-33** fue establecida, al igual que en los casos anteriores, por comparación con los datos obtenidos en la bibliografía para este tipo de compuestos⁵⁴, modelización en PC Model⁹⁰ y un experimento ROESY. Así, se observó efecto ROE de H-4 con H-7 α y H-9 α , lo que nos permitió situar el puente dioxano en disposición β . La multiplicidad del protón H-6 y los efectos ROE observados de H-6 con H-4 y 2H-7, nos indica que el protón sobre C-6 está en disposición α ecuatorial.

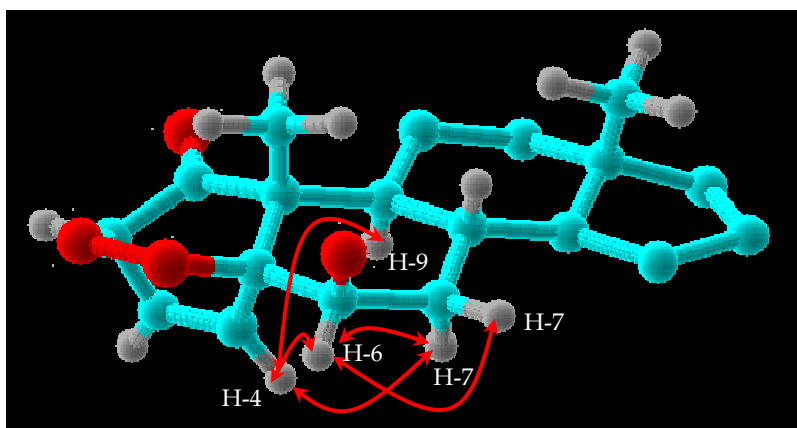
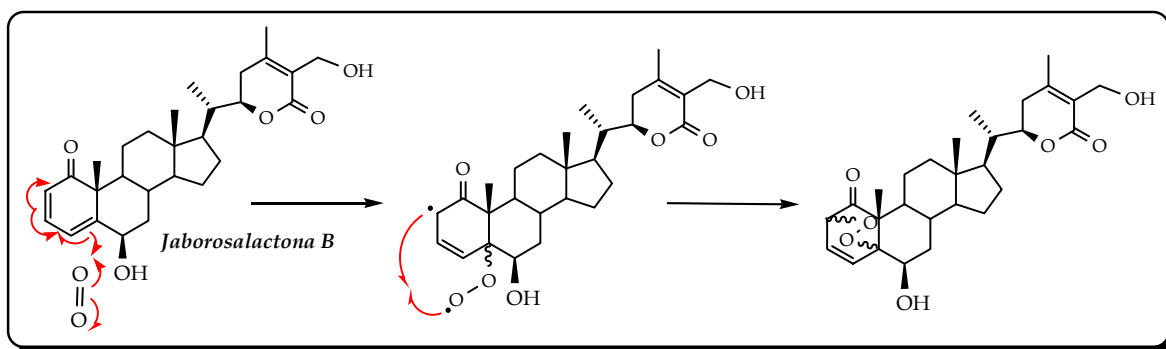


Figura 4.2.69. Efectos ROE mas significantes en el experimento ROESY

Ello permitió establecer la estructura de **W-33** como **6 β ,17 α ,27-trihidroxi-2 β ,5 β -dioxan-1-oxo-witha-3,24-dienolida**.

Los productos **W-30** a **W-33** constituyen los primeros ejemplos de withanolidas con un anillo endoperóxido en su esqueleto. Podemos proponer que estos compuestos se forman por oxidaciones radicalarias con oxígeno molecular del compuesto conocido jaborosalactona B⁹³ propuesto como intermedio, generando el radical alílico en α a la cetona sobre C-1 y produciéndose, posteriormente, el acoplamiento radicalario, tal como se muestra en el esquema:



⁹³ Tschesche, R.; Schwang, H.; Legler, G. *Tetrahedron*, **1966**, 22(3), 1121.

Withanolida W-34

Al compuesto que hemos denominado **W-34** le hemos asignado la fórmula molecular $C_{28}H_{40}O_7$, fijada basándonos en sus datos de espectrometría de masas de alta resolución. En el estudio de su espectro de IR se observó la presencia de bandas de absorción correspondientes a ácido carboxílico ($3518-2547\text{ cm}^{-1}$), grupo hidroxilo (3442 cm^{-1}) y carbonilo α,β -insaturado (1694 cm^{-1}), este último confirmado además por la presencia de una banda de absorción característica a 222 nm en su espectro de UV.

Así, en su espectro de RMN de ^1H se observaron dos protones olefínicos a $5.52\text{ } \delta_{\text{H}}$ (t, $J= 9.4\text{ Hz}$, H-3) y $6.58\text{ } \delta_{\text{H}}$ (d, $J= 9.4\text{ Hz}$, H-4); dos protones metínicos sobre carbono unido a oxígeno a $5.13\text{ } \delta_{\text{H}}$ (sa, H-6), $4.70\text{ } \delta_{\text{H}}$ (dt, $J= 3.4, 11.4\text{ Hz}$, H-22) y señales correspondientes a un alcohol primario a $4.37, 4.43\text{ } \delta_{\text{H}}$ (d_{AB} , $J= 11.8\text{ Hz}$, H-27). Así mismo, se observaron señales correspondientes a tres metilos como singuletes, uno de ellos alifático a $0.87\text{ } \delta_{\text{H}}$ (Me-18) y dos sobre doble enlace a $1.83\text{ } \delta_{\text{H}}$ (Me-19) y $2.06\text{ } \delta_{\text{H}}$ (Me-28) y un metilo como doblete a $1.07\text{ } \delta_{\text{H}}$ ($J= 6.5\text{ Hz}$, Me-21).

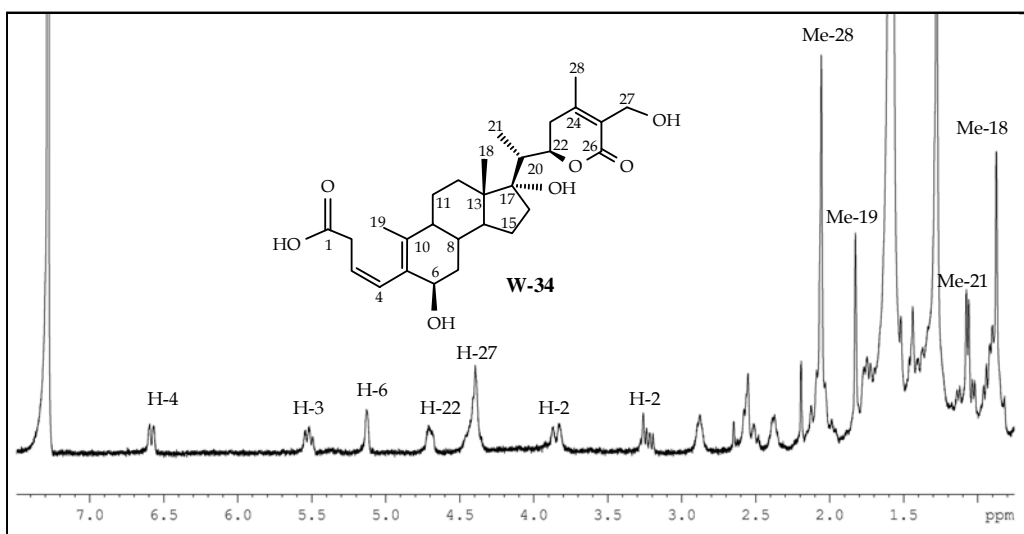


Figura 4.2.70. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de **W-34**.

Estos datos fueron confirmados mediante RMN ^{13}C , donde se observaron señales para 28 carbonos, presentando como principales diferencias con los compuestos que hemos descrito anteriormente, los desplazamientos de los carbonos correspondientes a los anillos A y B. Así, podemos destacar los desplazamientos de los carbonos a $15.7\text{ } \delta_{\text{C}}$ (C-19) $35.6\text{ } \delta_{\text{C}}$ (C-2), $47.3\text{ } \delta_{\text{C}}$ (C-9), $73.0\text{ } \delta_{\text{C}}$ (C-6), $117.5\text{ } \delta_{\text{C}}$ (C-3) y $129.4\text{ } \delta_{\text{C}}$ (C-4); $124.9\text{ } \delta_{\text{C}}$ (C-5), $141.6\text{ } \delta_{\text{C}}$ (C-10), y $172.8\text{ } \delta_{\text{C}}$ (C-1).

El conjunto de estos datos nos indicaron que el producto **W-34** es un esteroide con esqueleto de withanolida que posee un alcohol terciario (C-17), un alcohol secundario (C-6), un alcohol primario (C-27) y un doble enlace ($\Delta^{3,4}$), frecuentes en este tipo de esqueletos, presentando además señales características de un ácido carboxílico, un doble enlace tetrasustituido y un metilo sobre doble enlace adicional.

El estudio de los experimentos bidimensionales homonucleares (COSY y ROESY) y heteronucleares (HSQC y HMBC) nos permitieron establecer definitivamente la posición y estereoquímica relativa de los diferentes grupos sobre la molécula. Así, el experimento ^1H - ^1H COSY confirmó la presencia de un sistema AMX_2 , con acoplamiento de H-4 (6.58 δ_{H}) con H-3 (5.52 δ_{H}) y de este último con H-2 (3.23, 3.85 δ_{H}).

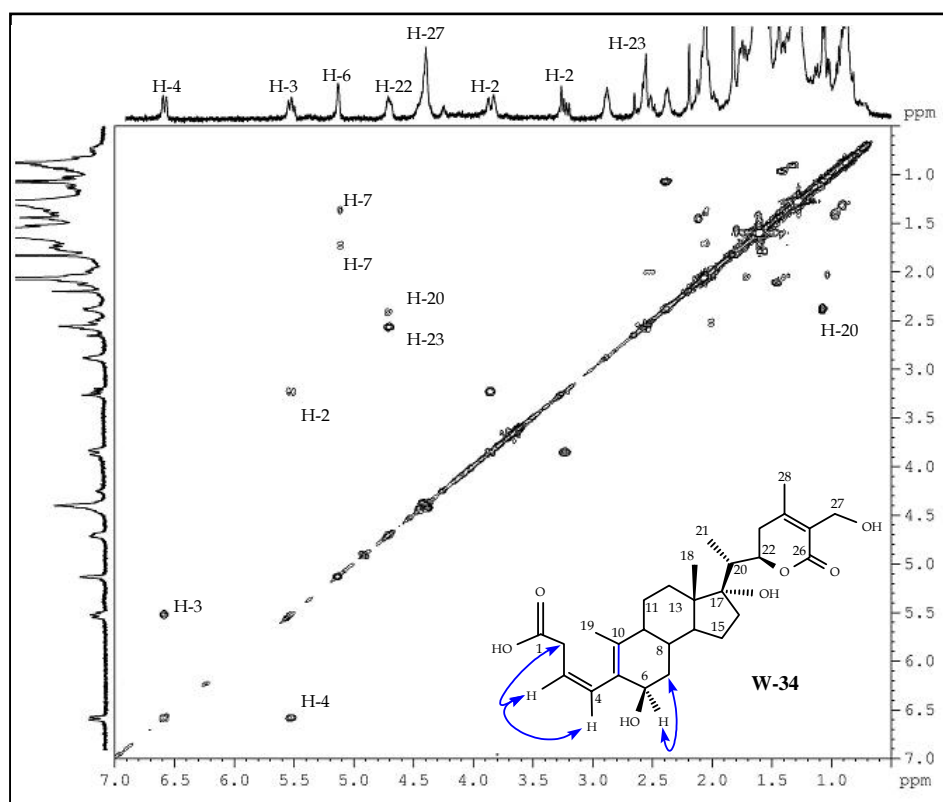


Figura 4.2.71. Experimento COSY de **W-34**.

La regiosustitución de los distintos grupos funcionales en la molécula se determinó a partir de las correlaciones a larga distancia observadas en un experimento HMBC. Así, se observaron como correlaciones más significativas las siguientes: H-2 (3.23, 3.85 δ_{H}) con C-1 (172.8 δ_{C}), C-3 (117.5 δ_{C}) y C-4 (129.4 δ_{C}); H-3 (5.52 δ_{H}) con C-1, C-2 (35.6 δ_{C}) y C-5 (124.9 δ_{C}); H-4 (6.58 δ_{H}) con C-2, C-6 (73.0 δ_{C}) y C-10 (141.6 δ_{C}); H-6 (5.13 δ_{H}) con C-5, C-8 (29.4 δ_{C}) y C-10 y del Me-19 (1.83 δ_{H}) con C-5, C-9 (47.3 δ_{C}) y C-10, nos

permitieron fijar el ácido carboxílico en C-1, el doble enlace C5-C10, el metilo sobre doble enlace adicional (Me-19) y el C-2 metilénico, indicando que **W-34** corresponde con una estructura 1,10-seco-withanolida.

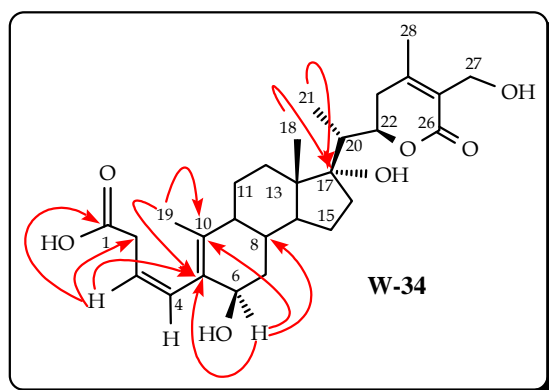


Figura 4.2.72. Correlaciones observadas en el experimento HMBC de **W-34**

La estereoquímica relativa de nuestro producto **W-34** fue establecida por comparación con los datos obtenidos en la bibliografía para este tipo de compuestos⁵⁴ y confirmada mediante modelización molecular en PCModel⁹⁰ y un experimento ROESY, donde se observó efecto ROE entre los protones H-6 δ_H (5.13, m) con H-9 α δ_H (1.76, m) y con los dos protones H-7 α , H-7 β , efecto que sólo se observa si tenemos el alcohol secundario sobre C-6 en disposición β -axial.

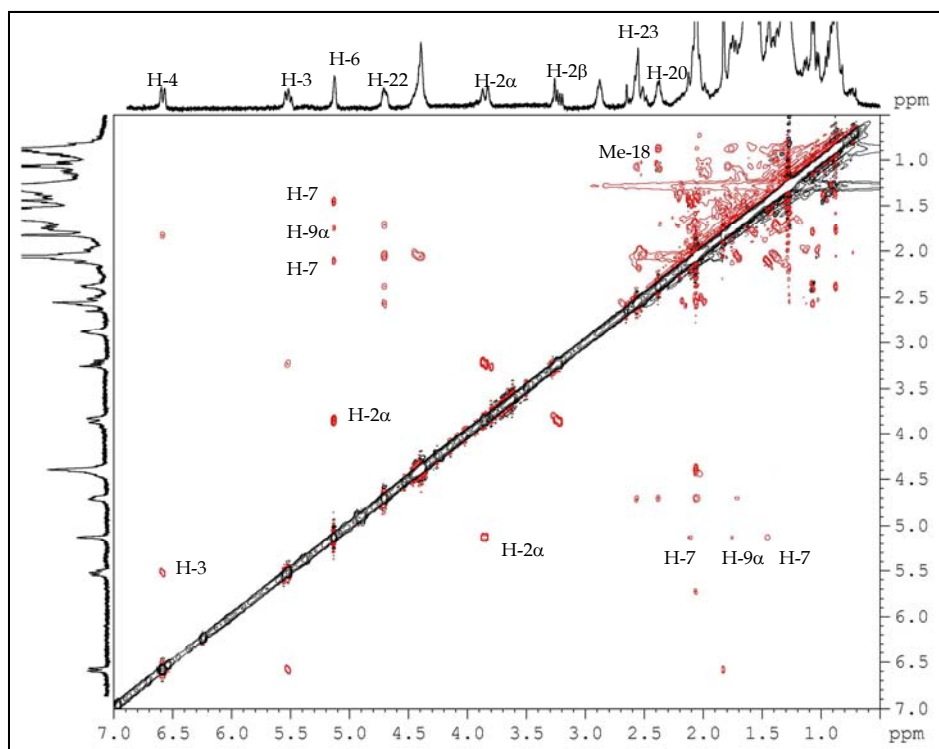


Figura 4.2.73. Experimento ROESY de **W-34**.

Ello permitió establecer la estructura de **W-34** como 2-carboxi-6 β ,17 α ,27-trihidroxi-1,10-seco-witha-3,5(10), 24-trienolida.

Withanolida W-35

El producto **W-35** presentó una fórmula molecular de C₂₈H₃₈O₆, determinada mediante espectrometría de masas de alta resolución, fórmula que está de acuerdo con diez grados de insaturación en el compuesto y que corresponde a 18 *m/z* menos que el producto **W-34**. En su espectro de IR se observaron bandas de absorción a 3740, 3520-2555 y 1700 cm⁻¹, que indican la presencia de grupos hidroxilo, ácido carboxílico y carbonilo α,β -insaturado, respectivamente. En el espectro de UV se puede observar una banda de absorción a 215 nm, característica de carbonilo α,β -insaturado.

Un estudio comparativo de los datos espectroscópicos de **W-34** y **W-35** mostró que ambos productos están relacionados, siendo la principal diferencia en sus espectros de RMN de ¹H y ¹³C (Tablas 7 y 8) la presencia de las señales correspondientes a un doble enlace C16-C17 en **W-35** a 5.58 δ_H (1H, sa, H-16), 124.8 δ_C (d, C-16) y 154.9 δ_C (s, C-17).

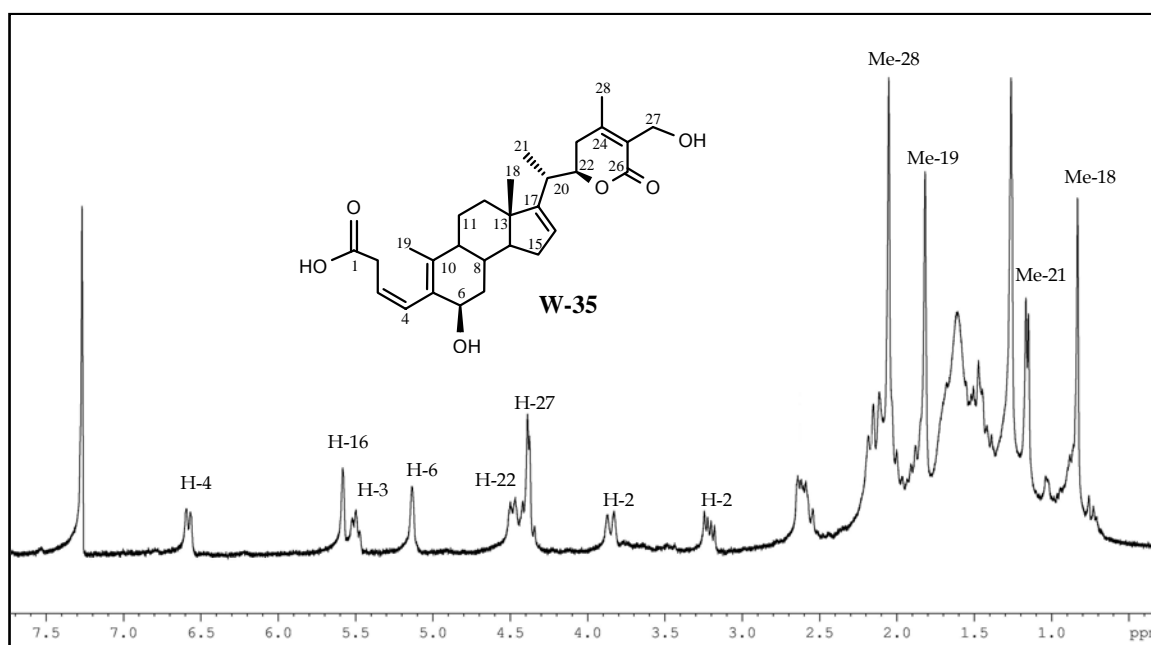


Figura 4.2.74. Espectro de RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) de **W-35**.

La estructura propuesta fue confirmada mediante el estudio de los experimentos bidimensionales homo (COSY y ROESY) y heteronucleares (HSQC y HMBC) los cuales mostraron correlaciones muy similares a las mostradas para el compuesto anterior.

La localización de los distintos grupos funcionales en la molécula se determinó a partir de las correlaciones de un experimento HMBC. Así, se observó como correlaciones mas significantes las de los metilos Me-18 y Me-21 con el carbono olefínico C-17 ($154.9 \delta_C$).

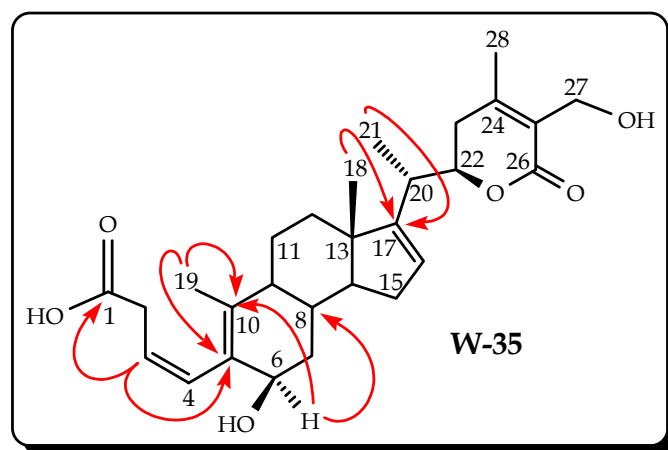


Figura 4.2.75. Correlaciones observadas en el experimento HMBC de W-35.

La estereoquímica relativa del producto W-35 fue establecida, al igual que para el producto anterior W-34, por comparación con los datos obtenidos en la bibliografía para este tipo de compuestos⁶¹ y confirmada mediante modelización en PCModel⁹⁰ y un experimento ROESY, donde se observó también efecto ROE entre los protones H-6 con H-9 α y con los dos protones H-7, fijando con ello la disposición del protón sobre C-6 como α -ecuatorial.

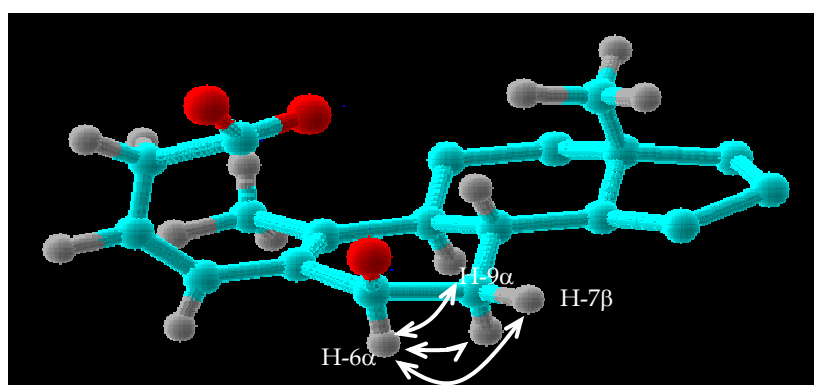
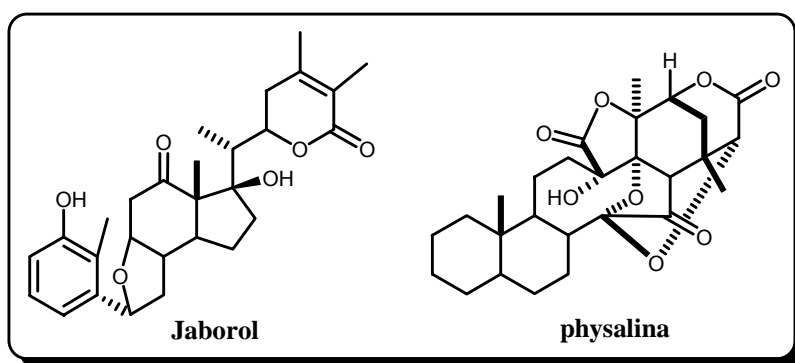


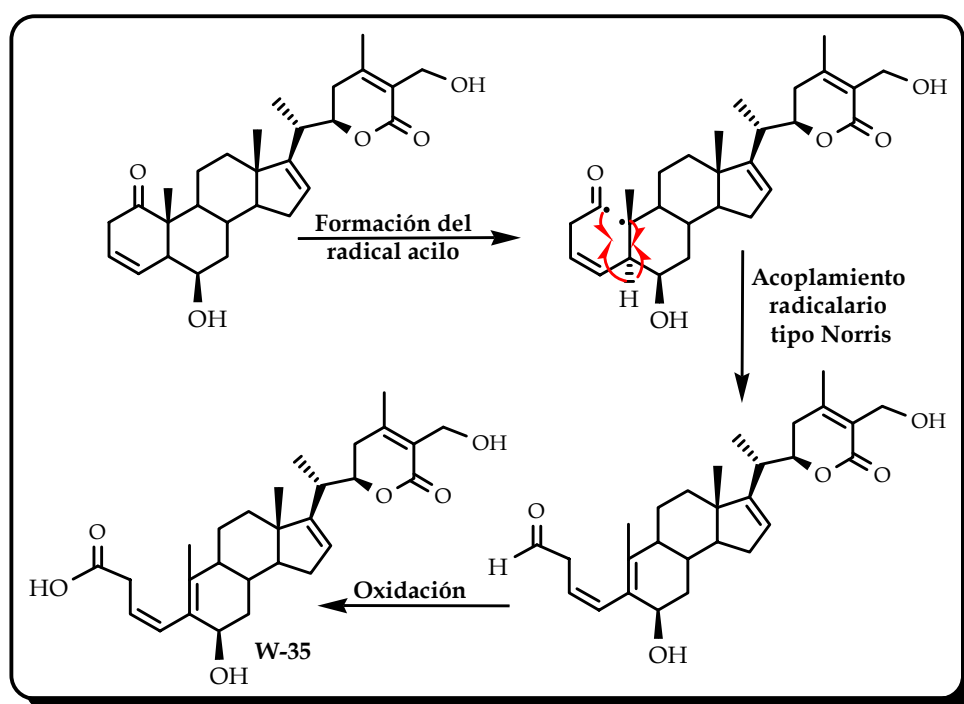
Figura 4.2.76. Correlaciones del experimento ROESY de W-35.

El conjunto de estos datos nos permiten proponer la estructura de **2-carboxi-6 β ,17 α ,27-trihidroxi-1,10-seco-witha-3,5(10),24-trienolida** para el producto W-35.

Cabe destacar que los productos **W-34** y **W-35** constituyen los primeros ejemplos de C1-C10 secowithanolidas en la bibliografía química, sin embargo, si existen ejemplos de C9-C10 y C13-C14 secowithanolidas, como son el jaborol⁹⁴ y la physalina⁹⁵.



Podemos proponer que estos compuestos se forman a partir de la ruptura radicalaria entre los carbonos C1-C10 de un precursor hipotético, generando los radicales acilo en C-1 y terciario en C-10⁹⁶, seguido de un acoplamiento tipo Norris y una posterior oxidación, dando lugar a los productos **W-34** y **W-35**, tal como se muestra en el esquema:



⁹⁴ Fajardo, V.; Freyer, A. J.; Minard, R. D.; Shama, M. *Tetrahedron*, **1987**, 43(17), 3875.

⁹⁵ Antoun, M. D.; Abramson, D.; Tyson, R. L.; Chang, C. J.; McLaughlin, J. L.; Peck, G.; Cassady, J. M. *J. Nat. Prod.*, **1981**, 44(5), 579.

⁹⁶ González, A.; Galindo, A.; Mansilla, H.; Trigos, A. *Tetrahedron*, **1988**, 44(21), 6745.

Tabla 7. Datos^a de RMN ¹H de W-30 a W-35:

Protón	W-30	W-31	W-32	W-33	W-34	W-35
2	4.53 d (6.2)	4.53 d (6.2)	4.53 d (6.5)	4.60 d (6.4)	3.23 dd (9.4, 16.4) 3.85 d (16.4)	3.21 dd (9.9, 16.9) 3.85 d (16.9)
3	6.69 dd (6.2, 8.2)	6.69 dd (6.2, 8.1)	6.70 dd (6.5, 8.4)	6.67 dd (6.4, 8.1)	5.52 t (9.4)	5.50 t (9.9)
4	7.04 d (8.2)	7.05 d (8.1)	7.04 d (8.4)	6.58 d (8.1)	6.58 d (9.4)	6.58 d (9.9)
6	4.08 sa	4.10 s	4.08 s	4.15 sa	5.13 sa	5.14 sa
7 α	1.70 m	1.95 m	1.62 m	1.45 m	1.45 m	1.49 m
7 β	2.01 m	2.14 m	2.14 m	2.01 m	2.12 m	2.14 m
8	1.88 m	2.01 m	1.83 m	1.98 m	1.37 m	1.38 m
9	1.90 m*	1.99 m	1.92 m	1.03 m	1.76 m	1.73 m
11	1.61 m 1.90 m*	1.65 m 1.70 m	1.60 m 1.81 m	1.69 m* 2.26 m	1.31 m 1.74 m	1.21 m 1.69 m
12	1.50 m 1.73 m	1.69 m 1.73 m	1.23 m 2.03 m	1.38 m 1.69 m*	1.28 m 1.69 m	1.48 m 1.86 m
14	1.75 m	1.55 m	1.19 m	1.59 m	1.75 m	1.53 m
15	1.25 m 1.74 m	1.43 m 2.11 m	1.20 m 1.67 m	1.28 m 1.72 m	1.39 m 1.65 m	1.56 m 2.10 m
16	1.63 m 1.71 m	5.55 sa	1.40 m 1.69 m	1.46 m 2.00 m	1.70 m 2.04 m	5.58 sa
17			1.16 m			
18	0.88 s	0.88 s	0.79 s	0.88 s	0.87 s	0.83 s
19	1.31 s	1.35 s	1.31 s	1.61 s	1.83 s	1.82 s
20	2.35 m	2.54 m	2.04 m	2.35 m	2.37 m	2.61 m
21	1.06 d (7.0)	1.14 d (7.0)	1.05 d (6.7)	1.04 d (6.9)	1.07 d (6.5)	1.16 d (6.5)
22	4.69 t (8.2)	4.47 dt (3.9, 12.9)	4.46 dt (3.3, 13.3)	4.67 dt (2.9, 11.8)	4.70 dt (3.4, 11.4)	4.49 dt (3.1, 12.7)
23 α	2.56 d	2.19 m	2.02 m	2.55 d	2.11 m	2.17 m
23 β	(8.0)	2.56 m	2.54 m	(8.1)	2.56 m	2.60 m
27	4.37, 4.42 d _{AB} (12.6)	4.38, 4.42 d _{AB} (13.7)	4.38, 4.40 d _{AB} (12.2)	4.37, 4.41 d _{AB} (11.8)	4.37, 4.43 d _{AB} (11.8)	4.36, 4.41 d _{AB} (12.2)
28	2.05 s	2.06 s	2.08 s	2.04 s	2.06 s	2.06 s

^a CDCl₃, 600 MHz. *J* entre paréntesis en Hz.

* Señales solapadas.

Tabla 8. Datos^a de RMN ¹³C de W-30 a W-35:

Carbono	W-30	W-31	W-32	W-33	W-34	W-35
C-1	206.0 s	206.2 s	206.0 s	205.9 s	172.8 s	172.8 s
C-2	78.6 d	78.6 d	78.6 d	80.0 d	35.6 t	35.6 t
C-3	126.5 d	126.4 d	126.4 d	125.9 d	117.5 d	117.2 d
C-4	141.4 d	141.5 d	141.3 d	142.5 d	129.4 d	129.4 d
C-5	84.2 s	84.3 s	84.1 s	84.6 s	124.9 s	124.9 s
C-6	67.1 d	67.2 d	67.1 d	69.1 d	73.0 d	73.2 d
C-7	36.6 t	31.2 t	31.1 t	36.4 t	33.2 t	33.2 t
C-8	29.6 d	28.0 d	29.4 d	30.4 d	29.4 d	29.6 d
C-9	42.1 d	43.1 d	42.4 d	50.0 d	47.3 d	47.6 d
C-10	48.2 s	48.5 s	48.2 s	48.8 s	141.6 s	141.6 s
C-11	22.0 t	22.2 t	22.2 t	23.1 t	22.7 t	24.3 t
C-12	32.0 t	34.8 t	39.4 t	31.9 t	32.7 t	34.9 t
C-13	48.3 s	47.2 s	42.9 s	48.3 s	48.7 s	47.5 s
C-14	49.3 d	56.0 d	54.8 d	49.4 d	48.8 d	56.0 d
C-15	23.6 t	34.3 t	24.3 t	23.6 t	25.4 t	32.4 t
C-16	34.9 t	124.4 d	27.2 t	34.0 t	36.8 t	124.8 d
C-17	84.9 s	155.3 s	51.9 d	85.0 s	85.0 s	154.9 s
C-18	15.0 c	16.5 c	12.0 c	15.1 c	15.2 c	16.2 c
C-19	19.4 c	19.5 c	19.5 c	16.0 c	15.7 c	15.7 c
C-20	42.7 d	35.8 d	38.8 d	42.6 d	42.6 d	35.8 d
C-21	9.4 c	16.9 c	13.4 c	9.4 c	9.5 c	17.0 c
C-22	79.2 d	79.1 d	78.8 d	79.1 d	79.1 d	78.8 d
C-23	32.9 t	32.9 t	29.8 t	32.9 t	32.9 t	33.0 t
C-24	154.3 s	152.6 s	152.9 s	154.1 s	153.7 s	152.9 s
C-25	125.1 s	125.7 s	125.6 s	125.2 s	125.2 s	125.4 s
C-26	167.1 s	166.4 s	166.7 s	167.1 s	167.0 s	166.8 s
C-27	57.4 t	57.5 t	57.4 t	57.5 t	57.5 t	57.4 t
C-28	19.9 c	19.9 c	19.9 c	20.0 c	20.0 c	19.9 c

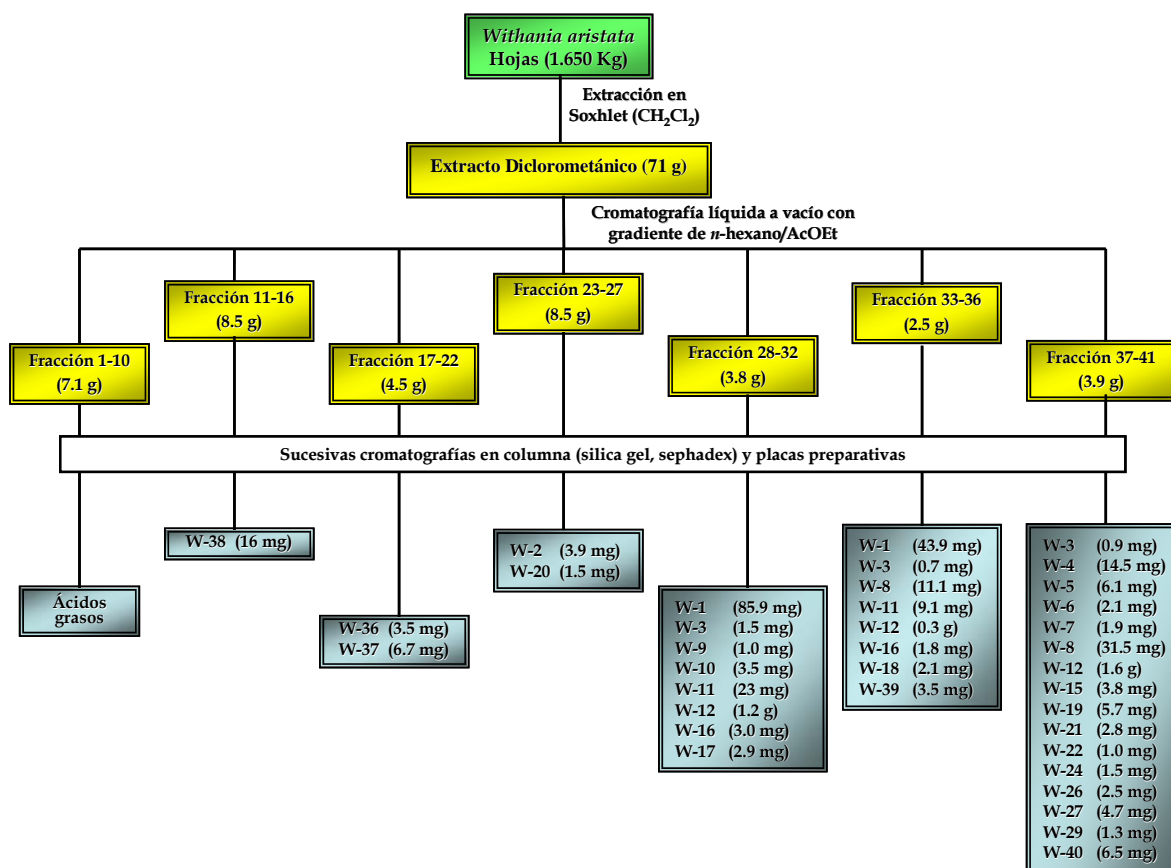
^a Datos basados en experimentos DEPT, HSQC y HMBC.

4.1.3. Parte experimental

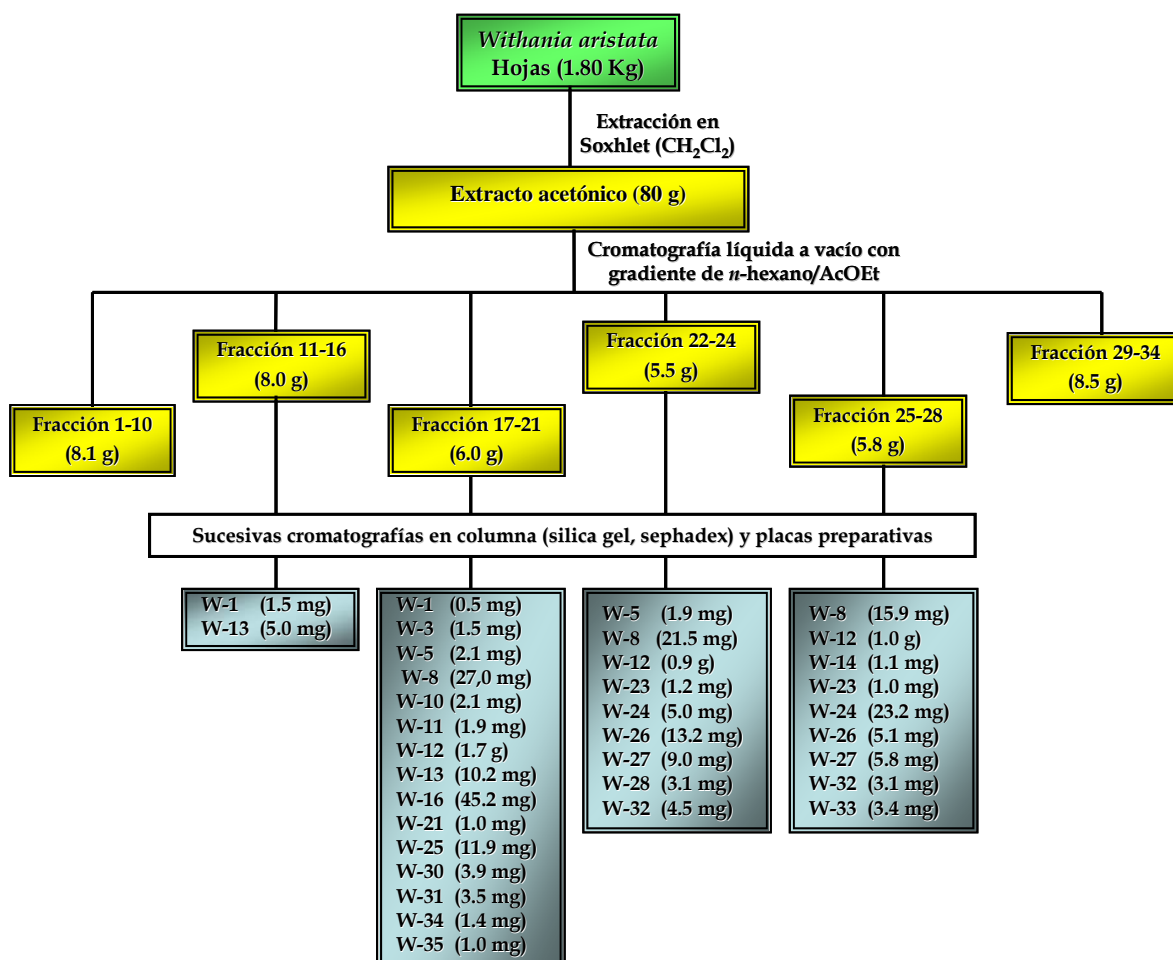
4.1.3.1 Separación cromatográfica de las withanolidas de las hojas de *Withania aristata*

La purificación mediante cromatografía del extracto de diclorometano y del extracto en acetona de las hojas de *Withania aristata*, dio lugar al aislamiento de cuarenta fitoesteroles, treinta y cinco de ellos con esqueleto de withanolida.

Estos metabolitos se obtuvieron de las fracciones de la primera columna a vacío en gel de sílice que se realizó a cada extracto, tal como se detalla en los siguientes esquemas, resultando veinte de estos metabolitos nuevos en la bibliografía química.



Esquema: Resumen cromatográfico y de purificación de las withanolidas del extracto de diclorometano

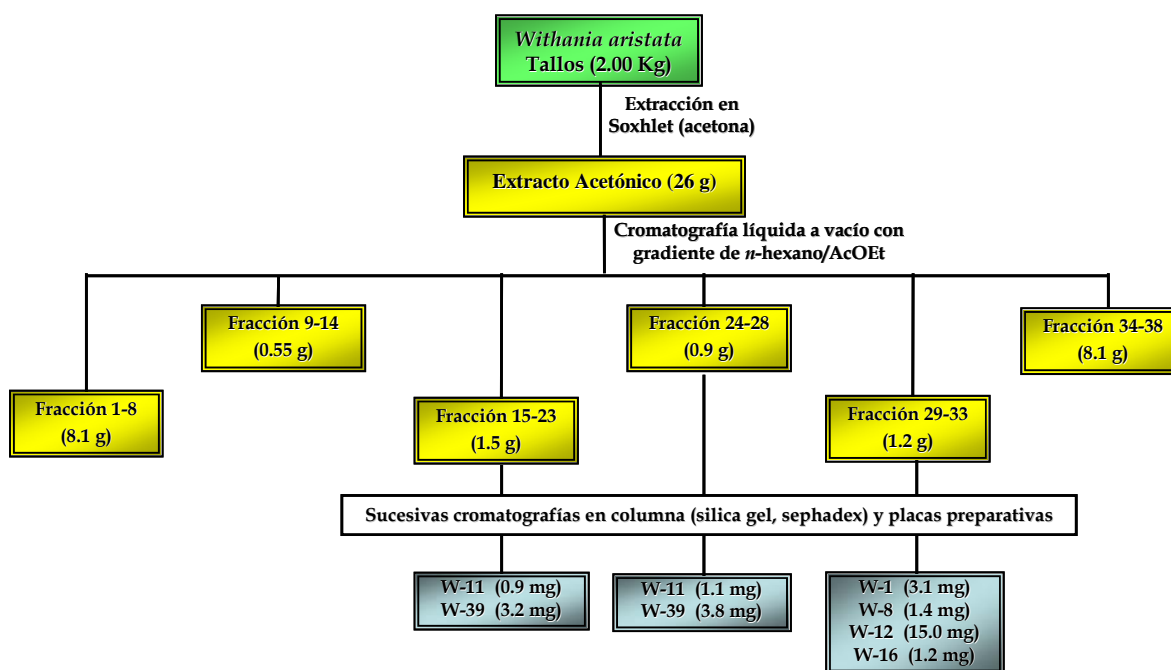


Esquema: Resumen cromatográfico y de purificación de las withanolidas del extracto de acetona

4.1.3.2 Separación cromatográfica de las withanolidas de los tallos de *Withania aristata*

La purificación mediante cromatografía del extracto de acetona de los tallos de *Withania aristata*, dió lugar al aislamiento de seis withanolidas y un fitoesterol.

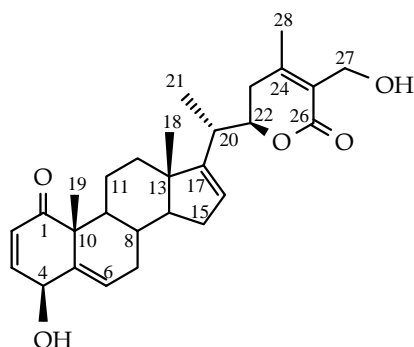
Estos metabolitos se obtuvieron de las fracciones de la primera columna a vacío en gel de sílice que se realizó a dicho extracto, tal como se detalla en el siguiente esquema.



Esquema: Resumen cromatográfico y de purificación de las withanolidas del extracto de acetona de los tallos de *W. aristata*.

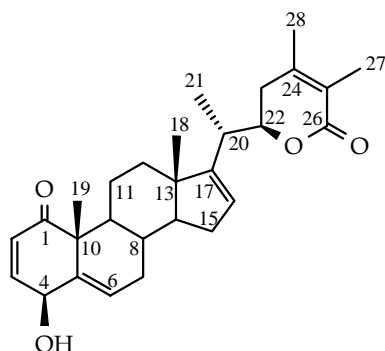
4.1.3.3 Datos espectroscópicos y espectrométricos

A continuación se dan los datos espectroscópicos y espectrométricos de los metabolitos aislados de hojas y tallos de *W. aristata* que no habían sido descritos anteriormente en la bibliografía, así como de aquellos, que aunque han sido descritos, no se han asignado todos sus datos de RMN de ^1H y ^{13}C .

Withanolida W-1**4β,27-Dihidroxi-1-oxo-witha-2,5,16,24-tetraenolida**

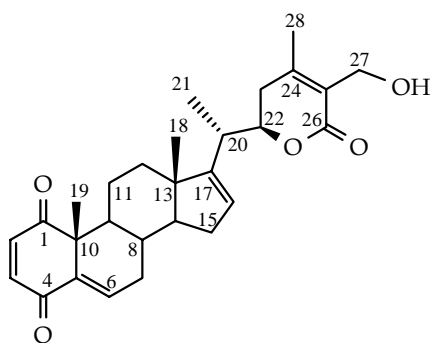
Se obtuvo como un sólido amorfo (100.2 mg).

[α]_D²⁰	+ 70.4 (c 5.0, CHCl ₃).
UV (EtOH) λ_{max} (log ε)	216 (4.0) nm.
IR ν_{max}	3429, 2970, 2928, 2853, 1689, 1455, 1393, 1013, 755 cm ⁻¹ .
RMN ¹H (δ, CDCl₃)	0.81 (3H, s, Me18); 1.10 (3H, d, J= 6.9 Hz, Me21); 1.43 (2H, m, H7, H14); 1.44 (3H, s, Me19); 1.50 (1H, m, H12); 1.55 (1H, m, H15); 1.57 (1H, m, H11); 1.64 (1H, m, H9); 1.71 (1H, m, H12); 1.89 (1H, m, H8); 2.02 (3H, s, Me28); 2.08 (1H, m, H7); 2.13 (2H, m, H15); 2.15 (1H, m, H23); 2.21 (1H, m, H11); 2.52 (2H, m, H20, H23); 4.31, 4.36 (2H, d _{AB} , J= 12.8 Hz, H27); 4.43 (1H, m, H22); 4.61 (1H, d, J= 4.4 Hz, H4); 5.51 (1H, sa, H16); 5.90 (1H, s, H6); 5.91 (1H, d, J= 10.1 Hz, H2); 6.76 (1H, dd, J= 4.4, 10.1 Hz, H3).
RMN ¹³C (δ, CDCl₃)	16.2 (c, C18); 16.5 (c, C21); 19.7 (c, C28); 22.5 (c, C19); 22.6 (t, C11); 30.5 (t, C15); 31.0 (d, C8); 31.1 (t, C7); 32.6 (t, C23); 34.3 (t, C12); 35.6 (d, C20); 43.2 (d, C9); 46.6 (s, C13); 49.3 (s, C10); 56.9 (d, C14); 57.0 (t, C27); 69.0 (d, C4); 78.8 (d, C22); 124.3 (d, C16); 125.3 (s, C25); 128.7 (d, C2); 130.7 (d, C6); 138.6 (s, C5); 143.0 (d, C3); 152.9 (s, C24); 155.2 (s, C17); 166.7 (s, C26); 203.5 (s, C1).
EM (IR) m/z (%)	452 [M ⁺] (4), 434 (53), 419 (22), 401 (7), 380 (7), 312 (14), 283 (17), 265 (13), 171 (23), 141 (100), 123 (69), 95 (57), 69 (85).
EMAR m/z	Calculado para C ₂₈ H ₃₆ O ₅ [M ⁺], 452.2563; observado, 452.2578.

Withanolida W-2**4β-Hidroxi-1-oxo-witha-2,5,16,24-tetraenolida**

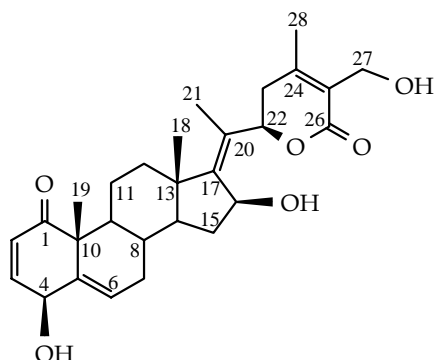
Se obtuvo como un sólido amorfo (23.7 mg).

[α]_D²⁰	+ 40.4 (c 1.2, CHCl ₃).
UV (EtOH) λ_{max} (log ε)	217 (4.0) nm.
IR ν_{max}	3430, 2927, 2856, 1690, 1455, 1381, 1242, 1212, 1131, 1014, 757 cm ⁻¹ .
RMN ¹H (δ, CDCl₃)	0.85 (3H, s, Me18); 1.11 (3H, d, J= 7.0 Hz, Me21); 1.43 (1H, m, H14); 1.44 (1H, m, H11); 1.48 (3H, s, Me19); 1.52 (1H, m, H12); 1.56 (1H, m, H15); 1.65 (1H, m, H9); 1.68 (1H, m, H7); 1.73 (1H, m, H12); 1.88 (3H, s, Me27); 1.91 (1H, m, H8); 1.93 (3H, s, Me28); 2.01 (1H, m, H7); 2.09 (1H, m, H23); 2.10 (1H, m, H15); 2.23 (1H, m, H11); 2.47 (1H, m, H23); 2.53 (1H, m, H20); 4.39 (1H, m, H22); 4.64 (1H, d, J= 4.5 Hz, H4); 5.53 (1H, sa, H16); 5.92 (1H, sa, H6); 5.95 (1H, d, J= 10.0 Hz, H2); 6.77 (1H, dd, J= 4.5, 10.0 Hz, H3).
RMN ¹³C (δ, CDCl₃)	12.3 (c, C27); 16.2 (c, C18); 16.4 (c, C21); 20.2 (c, C28); 22.5 (c, C19); 22.6 (t, C11); 30.5 (t, C15); 30.8 (d, C8); 31.1 (t, C7); 32.3 (t, C23); 34.3 (t, C12); 35.7 (d, C20); 42.5 (d, C9); 46.6 (s, C13); 49.3 (s, C10); 57.0 (d, C14); 69.3 (d, C4); 78.4 (d, C22); 121.8 (s, C25); 124.0 (d, C16); 128.9 (d, C2); 130.9 (d, C6); 138.7 (s, C5); 142.5 (d, C3); 148.7 (s, C24); 155.5 (s, C17); 166.7 (s, C26); 203.2 (s, C1).
EM (IR) m/z (%)	436 [M ⁺] (3), 418 (9), 403 (8), 345 (1), 293 (9), 265 (7), 171 (11), 125 (100), 97 (20).
EMAR m/z	Calculado para C ₂₈ H ₃₆ O ₄ [M ⁺], 436.2614; observado, 436.2643.

Withanolida W-3**27-Hidroxi-1,4-dioxo-witha-2,5,16,24-tetraenolida**

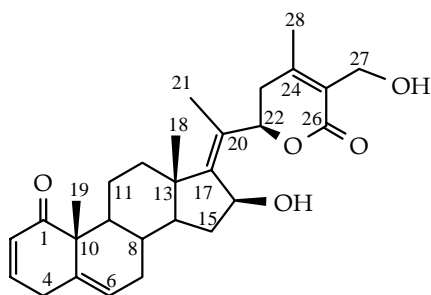
Se obtuvo como un sólido amorfo (8.3 mg).

[α]_D²⁰	+ 26.6 (c 0.8, CHCl ₃).
UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ)	218 (4.3) nm.
IR ν_{\max}	3446, 2927, 1694, 1625, 1458, 1393, 1271, 1129, 1022, 755 cm ⁻¹ .
RMN ¹H (δ, CDCl₃)	0.85 (3H, s, Me18); 1.13 (3H, d, J = 7.1 Hz, Me21); 1.42 (3H, s, Me19); 1.51 (1H, m, H14); 1.56 (1H, m, H11); 1.57 (1H, m, H15); 1.72 (1H, m, H8); 1.78 (1H, m, H15); 1.86 (1H, m, H7); 1.87 (1H, m, H9); 1.96 (1H, m, H12); 2.04 (3H, s, Me28); 2.15 (1H, m, H12); 2.19 (1H, m, H23); 2.32 (1H, m, H7); 2.34 (1H, m, H11); 2.56 (2H, m, H20, H23); 4.37, 4.42 (2H, d _{AB} , J = 12.8 Hz, H27); 4.45 (1H, m, H22); 5.55 (1H, sa, H16); 6.67 (1H, d, J = 10.3 Hz, H2); 6.73 (1H, d, J = 10.3 Hz, H3); 6.86 (1H, dd, J = 2.2, 5.9 Hz, H6).
RMN ¹³C (δ, CDCl₃)	16.2 (c, C18); 16.5 (c, C21); 19.7 (c, C28); 22.0 (t, C11); 23.4 (c, C19); 30.0 (d, C8); 30.5 (t, C7); 31.0 (t, C12); 32.6 (t, C23); 34.2 (t, C15); 35.7 (d, C20); 42.9 (d, C9); 46.8 (s, C13); 51.3 (s, C10); 56.7 (d, C14); 57.3 (t, C27); 78.8 (d, C22); 124.3 (d, C16); 125.5 (s, C25); 137.5 (d, C6); 138.8 (d, C3); 139.5 (s, C5); 140.0 (d, C2); 152.3 (s, C24); 155.2 (s, C17); 166.5 (s, C26); 187.7 (s, C4); 201.9 (s, C1).
EM (IR) m/z (%)	450 [M ⁺] (15), 435 (14), 417 (12), 380 (3), 310 (18), 281 (29), 187 (14), 141 (100), 123 (91), 95 (35), 69 (32).
EMAR m/z	Calculado para C ₂₈ H ₃₄ O ₅ [M ⁺], 450.2406; observado, 450.2406.

Withanolida W-4**4β,16β, 27-Trihidroxi-1-oxo-witha-2,5,17,24-tetraenolida**

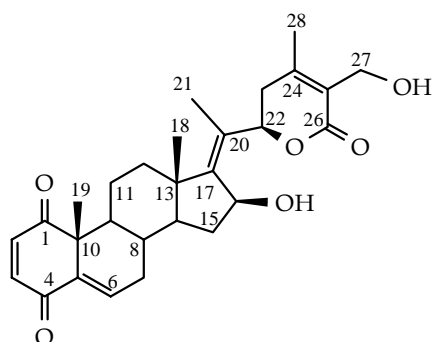
Se obtuvo como un sólido amorfo (8.0 mg).

[α]_D²⁰	+ 14.3 (c 0.8, CHCl ₃).
UV (EtOH) λ_{max} (log ε)	212 (4.4) nm.
IR ν_{max}	3420, 2932, 1688, 1454, 1385, 1292, 1181, 1136, 1016, 755 cm ⁻¹ .
RMN ¹H (δ, CDCl₃)	0.93 (3H, s, Me18); 1.46 (3H, s, Me19); 1.64 (2H, m, H15); 1.65 (1H, m, H9); 1.66 (2H, m, H8, H14); 1.67 (1H, m, H11); 1.71 (1H, m, H12); 1.72 (1H, m, H7); 1.84 (3H, s, Me21); 2.03 (3H, s, Me28); 2.13 (1H, m, H7); 2.26 (1H, m, H23); 2.30 (1H, m, H11); 2.34 (1H, m, H12); 2.36 (1H, m, H15); 2.73 (1H, m, H23); 4.38, 4.43 (2H, d _{AB} , J= 12.4 Hz, H27); 4.64 (1H, d, J= 4.5 Hz, H4); 4.72 (1H, sa, H16); 5.41 (1H, dd, J= 3.5, 12.8 Hz, H22); 5.95 (1H, s, H6); 5.96 (1H, d, J= 10.1 Hz, H2); 6.78 (1H, dd, J= 4.5, 10.1 Hz, H3).
RMN ¹³C (δ, CDCl₃)	12.0 (c, C21); 16.3 (c, C18); 19.6 (c, C28); 22.5 (c, C19); 22.9 (t, C11); 30.7 (t, C7); 31.2 (d, C8); 34.6 (t, C23); 36.0 (t, C15); 36.8 (t, C12); 42.5 (d, C9); 44.4 (s, C13); 49.1 (s, C10); 52.5 (d, C14); 57.2 (t, C27); 69.1 (d, C4); 71.5 (d, C16); 77.8 (d, C22); 125.0 (s, C25); 128.8 (d, C2); 129.2 (s, C20); 130.4 (d, C6); 138.8 (s, C5); 142.7 (d, C3); 151.3 (s, C17); 153.7 (s, C24); 166.8 (s, C26); 203.1 (s, C1).
EM (IR) m/z (%)	468 [M ⁺] (1), 432 (25), 399 (42), 300 (12), 263 (28), 249 (34), 183 (33), 171 (71), 129 (75), 105 (79), 91 (100), 67 (45).
EMAR m/z	Calculado para C ₂₈ H ₃₆ O ₆ [M ⁺], 468.2502; observado, 468.2512.

Withanolida W-5**16,27-Dihidroxi-1-oxo-witha-2,5,17,24-tetraenolida**

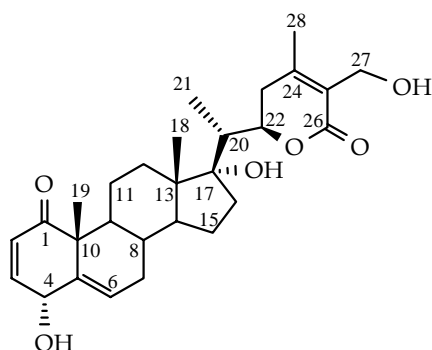
Se obtuvo como un sólido amorfo (2.0 mg).

[α]_D²⁰	+ 11.7 (c 0.23, CHCl ₃)
UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ)	219 (3.5) nm.
IR ν_{\max}	3443, 2923, 2854, 1698, 1457, 1381, 1287, 1135, 1015, 755, 630 cm ⁻¹ .
RMN ¹H (δ, CDCl₃)	0.96 (3H, s, Me18); 1.27 (3H, s, Me19); 1.64 (1H, m, H14); 1.65 (1H, m, H7); 1.70 (2H, m, H8, H-12); 1.72 (2H, m, H11, H-9); 1.85 (1H, m, H15); 1.88 (3H, s, Me21); 2.00 (1H, m, H7); 2.06 (3H, s, Me28); 2.26 (1H, m, H23); 2.34 (1H, m, H12); 2.37 (1H, m, H11); 2.64 (1H, m, H15); 2.73 (1H, m, H23); 2.86 (1H, dd, J = 5.0, 21.0, H4 α); 3.32 (1H, dd, J = 2.4, 21.0, H4 β); 4.39, 4.44 (2H, d _{AB} , J = 12.6 Hz, H27); 4.72 (1H, sa, H16); 5.41 (1H, dd, J = 3.6, 12.9, H22); 5.58 (1H, d, J = 8.0, H6); 5.88 (1H, dt, J = 2.6, 10.0, H2); 6.78 (1H, ddd, J = 2.4, 5.0, 10.0, H3).
RMN ¹³C (δ, CDCl₃)	12.0 (c, C21); 16.3 (c, C18); 18.7 (c, C19); 19.6 (c, C28); 23.4 (t, C11); 30.4 (t, C7); 31.7 (d, C8); 33.2 (t, C4); 34.6 (t, C23); 36.0 (t, C15); 37.0 (t, C12); 42.7 (d, C9); 44.4 (s, C13); 50.3 (s, C10); 52.6 (d, C14); 57.3 (t, C27); 71.6 (d, C16); 77.8 (d, C22); 124.2 (d, C6); 124.9 (s, C25); 127.7 (d, C2); 129.2 (s, C20); 135.8 (s, C5); 145.1 (d, C3); 151.4 (s, C17); 153.8 (s, C24); 166.6 (s, C26); 203.6 (s, C1).
EIMS m/z (%)	475 [M+Na] ⁺ (100).
ESI/MS-AR m/z	Calculado para C ₂₈ H ₃₆ O ₅ Na [M+Na] ⁺ , 475.2460; observado, 475.2462.

Withanolida W-6**16,27-Dihidroxi-1,4-dioxo-witha-2,5,17,24-tetraenolida**

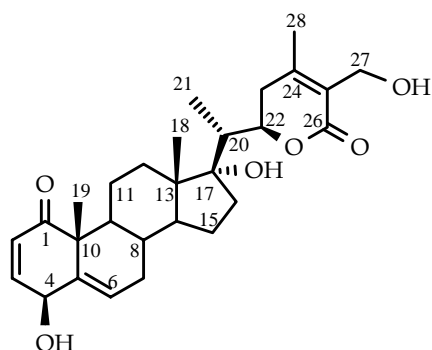
Se obtuvo como un sólido amorfo (1.5 mg).

[α]_D²⁰	+ 15.1 (c 0.07, CHCl ₃).
UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ)	218 (4.0) nm.
IR ν_{\max}	3447, 2926, 2859, 1700, 1452, 1385, 1282, 1137, 1017, 756 cm ⁻¹ .
RMN ¹H (δ, CDCl₃)	0.97 (3H, s, Me18); 1.42 (3H, s, Me19); 1.62 (1H, m, H8); 1.67 (1H, m, H11); 1.69 (2H, m, H12, H-14); 1.75 (1H, m, H15); 1.85 (1H, m, H7); 1.87 (1H, m, H9); 1.88 (3H, s, Me21); 2.06 (3H, s, Me28); 2.26 (1H, m, H23); 2.31 (1H, m, H11); 2.32 (2H, m, H7, H12); 2.36 (1H, m, H15); 2.75 (1H, m, H23); 4.37, 4.42 (2H, d _{AB} , J = 12.2 Hz, H27); 4.76 (1H, sa, H16); 5.40 (1H, dd, J = 3.5, 13.0, H22); 6.67 (1H, d, J = 10.3, H2); 6.73 (1H, d, J = 10.3, H3); 6.87 (1H, dd, J = 2.0, 5.7, H6);.
RMN ¹³C (δ, CDCl₃)	12.1 (c, C21); 16.6 (c, C18); 19.7 (c, C28); 23.5 (t, C11); 23.6 (c, C19); 30.1 (d, C8); 30.7 (t, C7); 34.8 (t, C23); 36.0 (t, C15); 37.1 (t, C12); 42.7 (d, C9); 44.9 (s, C13); 51.5 (s, C10); 52.6 (d, C14); 57.4 (t, C27); 71.7 (d, C16); 77.8 (d, C22); 125.1 (s, C25); 129.5 (s, C20); 137.4 (d, C6); 139.0 (d, C3); 139.6 (s, C5); 140.2 (d, C2); 151.4 (s, C17); 153.8 (s, C24); 166.7 (s, C26); 187.8 (s, C4); 202.1 (s, C1).
ESIMS m/z (%)	489 [M+Na] ⁺ (13).
ESI/MS-AR m/z	Calculado para C ₂₈ H ₃₄ O ₆ Na [M+Na] ⁺ , 489.2277; observado, 489.2266.

Withanolida W-7**4 α ,17 α ,27-Trihidroxi-1-oxo-witha-2,5,24-trienolida**

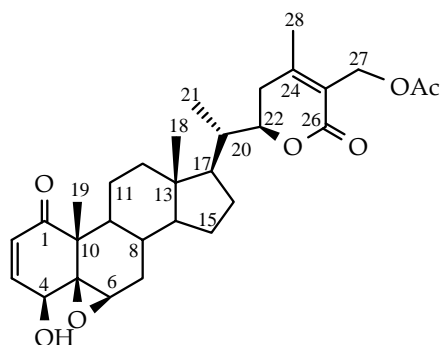
Se obtuvo como un sólido amorfo (6.1 mg).

[α]_D²⁰	- 7.3 (c 0.6, CHCl ₃).
UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ)	217 (4.0) nm.
IR ν_{\max}	3428, 2930, 2859, 1690, 1463, 1396, 1133, 1216, 1027, 759 cm ⁻¹ .
RMN ¹H (δ, CDCl₃)	0.87 (3H, s, Me18); 1.07 (3H, d, J= 7.0 Hz, Me21); 1.27 (1H, m, H15); 1.29 (3H, s, Me19); 1.47 (1H, m, H23); 1.57 (1H, m, H11); 1.62 (1H, m, H12); 1.65 (1H, m, H7); 1.66 (1H, m, H9); 1.68 (1H, m, H8); 1.69 (2H, m, H14); 1.70 (1H, m, H16); 1.72 (1H, m, H12); 1.76 (1H, m, H15); 2.00 (1H, m, H16); 2.05 (3H, s, Me28); 2.13 (1H, m, H7); 2.31 (1H, m, H11); 2.37 (1H, m, H20); 2.57 (1H, m, H23); 4.37, 4.42 (2H, d _{AB} , J= 12.5 Hz, H27); 4.70 (1H, dt, J= 2.6, 8.8 Hz, H22); 5.05 (1H, s, H4); 5.90 (1H, dd, J= 2.4, 10.2 Hz, H2); 6.05 (1H, d, J= 6.1 Hz, H6); 6.79 (1H, dd, J= 2.1, 10.2 Hz, H3).
RMN ¹³C (δ, CDCl₃)	9.1 (c, C21); 14.7 (c, C18); 19.5 (c, C19); 19.8 (c, C28); 22.7 (t, C11); 23.4 (t, C15); 30.1 (t, C7); 31.9 (t, C12); 32.6 (t, C23); 32.7 (d, C8); 36.2 (t, C16); 42.4 (d, C20); 42.8 (d, C9); 47.7 (s, C13); 50.2 (d, C14); 50.5 (s, C10); 57.2 (t, C27); 67.0 (d, C4); 79.0 (d, C22); 84.8 (s, C17); 121.2 (d, C6); 124.9 (s, C25); 127.6 (d, C2); 140.2 (s, C5); 147.5 (d, C3); 154.1 (s, C24); 166.9 (s, C26); 203.7 (s, C1).
ESIMS m/z (%)	493 [M+Na] ⁺ (100).
ESI/MS-AR m/z	Calculado para C ₂₈ H ₃₈ O ₆ Na [M+Na] ⁺ , 493.2566; observado, 493.2557.

Withanolida W-8**4β,17α,27-Trihidroxi-1-oxo-witha-2,5,24-trienolida**

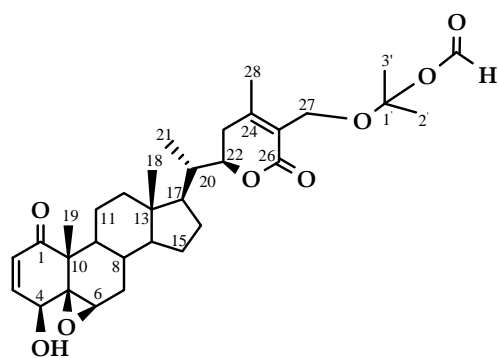
Se obtuvo como un sólido amorfo (34.1 mg).

[α]_D²⁰	+ 46.1 (c 0.25, CHCl ₃).
UV (EtOH) λ_{max} (log ε)	212 (4.3) nm.
IR ν_{max}	3500, 3350, 1670, 1660, 1391, 1129, 1212, 1023, 755 cm ⁻¹ .
RMN ¹H (δ, CDCl₃)	0.84 (3H, s, Me18); 1.05 (3H, d, J =7.0 Hz, Me21); 1.25 (1H, m, H15); 1.33 (1H, m, H11); 1.45 (3H, s, Me19); 1.56 (1H, m, H8); 1.59 (1H, m, H9); 1.60 (1H, m, H11); 1.61 (1H, m, H12); 1.68 (1H, m, H7); 1.69 (2H, m, H14, H-16); 1.70 (1H, m, H12); 1.75 (1H, m, H15); 1.99 (1H, m, H16); 2.03 (3H, s, Me28); 2.13 (1H, m, H7); 2.34 (1H, m, H20); 2.51 (2H, d, J= 7.8 Hz, H23); 4.35, 4.40 (2H, d _{AB} , J= 12.6 Hz, H27); 4.64 (1H, d, J= 4.6 Hz, H4); 4.68 (1H, dt, J= 2.8, 8.1 Hz, H22); 5.93 (1H, sa, H6); 5.95 (1H, d, J= 10.0 Hz, H2); 6.77 (1H, dd, J= 4.6, 10.0 Hz, H3).
RMN ¹³C (δ, CDCl₃)	9.2 (c, C21); 14.7 (c, C18); 19.7 (c, C28); 22.6 (c, C19; t, C11); 23.6 (t, C15); 30.8 (t, C7); 31.9 (t, C12); 32.6 (t, C23); 32.7 (d, C8); 36.1 (t, C16); 42.2 (d, C9); 42.4 (d, C20); 47.6 (s, C13); 49.0 (s, C10); 50.2 (d, C14); 57.2 (t, C27); 69.3 (d, C4); 79.0 (d, C22); 84.9 (s, C17); 125.0 (s, C25); 128.8 (d, C2); 130.8 (d, C6); 138.7 (s, C5); 142.6 (d, C3); 154.0 (s, C24); 167.0 (s, C26); 203.1 (s, C1).
ESIMS m/z (%)	493 [M+Na] ⁺ (100).
ESI/MS-AR m/z	Calculado para C ₂₈ H ₃₈ O ₆ Na [M+Na] ⁺ , 493.2566; observado, 493.2567.

Withanolida W-13**27-O-Acetil-withaferina A**

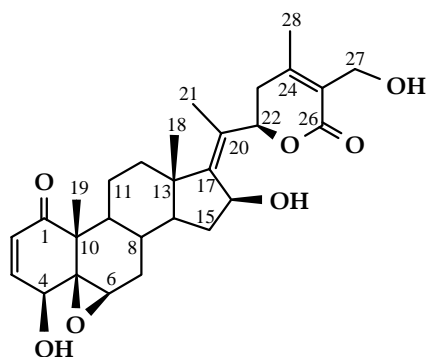
Se obtuvo como un sólido amorfo (3.5 mg).

[α]_D²⁰	+ 63.4 (c 0.50, CHCl ₃).
UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ)	215 (4.4) nm.
IR ν_{\max}	3748, 2928, 1701, 1540, 1458, 1397, 1256, 1066, 838 cm ⁻¹ .
RMN ¹H (δ, CDCl₃)	0.70 (3H, s, Me18); 0.95 (1H, m, H14); 1.00 (3H, d, J= 6.6 Hz, Me21); 1.02 (1H, m, H9); 1.10 (1H, m, H17); 1.13 (1H, m, H12); 1.18 (1H, m, H15); 1.29 (1H, m, H7 α); 1.38 (1H, m, H16); 1.41 (3H, s, Me19); 1.48 (1H, m, H11); 1.53 (1H, m, H8); 1.65 (1H, m, H15); 1.70 (1H, m, H16); 1.83 (1H, m, H11); 2.00 (2H, m, H12, H20); 2.01 (1H, m, H23 α); 2.06 (3H, s, Me28); 2.08 (3H, s, OAc); 2.15 (1H, m, H7 β); 2.53 (1H, m, H23 β); 3.24 (1H, sa, H6); 3.76 (1H, d, J= 5.9 Hz, H4); 4.41 (1H, dt, J= 3.3, 13.2 Hz, H22); 4.88, 4.92 (2H, d _{AB} , J= 11.9 Hz, H27); 6.21 (1H, d, J= 10.0 Hz, H2); 6.95 (1H, dd, J= 5.9, 10.0 Hz, H3).
RMN ¹³C (δ, CDCl₃)	11.4 (c, C18); 13.1 (c, C21); 17.2 (c, C19); 20.4 (c, C28); 21.9 (t, C11); 24.0 (t, C15); 27.0 (t, C16); 29.5 (d, C8); 29.8 (t, C23); 30.9 (t, C7); 38.5 (d, C20); 39.1 (t, C12); 42.3 (s, C13); 43.9 (d, C9); 47.4 (s, C10); 51.7 (d, C17); 55.8 (d, C14); 57.8 (t, C27); 62.3 (d, C6); 63.6 (s, C5); 69.6 (d, C4); 78.0 (d, C22); 121.6 (s, C25); 132.1 (d, C2); 141.7 (d, C3); 156.8 (s, C24); 165.2 (s, C26); 202.1 (s, C1); OAc (20.7 c, 170.7 s).
EM (IR) m/z (%)	512 [M ⁺] (7), 452 (9), 416 (7), 389 (21), 329 (24), 311 (25), 283 (7), 239 (23), 183 (25), 161 (19), 124 (100), 95 (80), 67 (43).
EMAR m/z	Calculado para C ₃₀ H ₄₀ O ₇ [M ⁺], 512.2774; observado, 512.2775.

Withanolida W-14**Formato de 27-O-(1-metiletil)withaferina A**

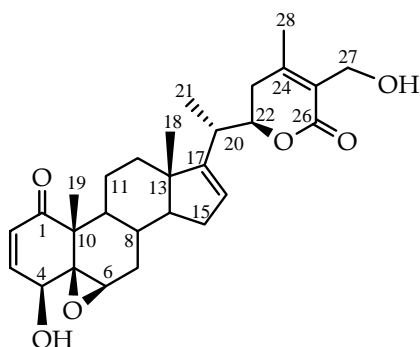
Se obtuvo como un sólido amorfo (2.1 mg).

$[\alpha]_D^{20}$	+ 24.3 (c 0.20, CHCl ₃).
UV (EtOH) λ_{max} (log ϵ)	220 (4.0) nm.
IR ν_{max}	3438, 2931, 2870, 1700, 1460, 1396, 1320, 1186, 1019, 850, 755 cm ⁻¹ .
RMN ¹ H (δ , CDCl ₃)	0.73 (3H, s, Me18); 0.96 (1H, m, H14); 1.02 (3H, d, J= 6.2 Hz, Me21); 1.05 (1H, m, H9); 1.10 (1H, m, H17); 1.14 (1H, m, H12); 1.20 (1H, m, H15); 1.28 (1H, m, H7 α); 1.40 (1H, m, H16); 1.44 (3H, s, Me19); 1.46 (3H, s, Me2'); 1.48 (3H, s, Me3'); 1.52 (1H, m, H11); 1.54 (1H, m, H8); 1.67 (1H, m, H15); 1.68 (1H, m, H16); 1.87 (1H, m, H11); 1.98 (1H, m, H12); 2.03 (1H, m, H23 α); 2.04 (1H, m, H20); 2.10 (3H, s, H28); 2.16 (1H, m, H7 β); 2.57 (1H, m, H23 β); 3.26 (1H, sa, H6); 3.79 (1H, d, J= 5.2 Hz, H4); 4.27, 4.32 (2H, d _{AB} , J= 10.0 Hz, H27); 4.48 (1H, da, J= 13.4 Hz, H22); 6.22 (1H, d, J= 9.7 Hz, H2); 6.95 (1H, dd, J= 5.2, 9.7 Hz, H3); 10.62 (1H, s, H-4').
RMN ¹³ C (δ , CDCl ₃)	11.6 (c, C18); 13.4 (c, C21); 17.5 (c, C19); 20.5 (c, C28); 22.2 (t, C11); 22.4 (c, C2'); 22.7 (c, C3'); 24.3 (t, C15); 27.3 (t, C16); 29.4 (d, C8); 30.0 (t, C23); 31.2 (t, C7); 38.8 (d, C20); 39.4 (t, C12); 42.6 (s, C13); 44.1 (d, C9); 47.7 (s, C10); 52.0 (d, C17); 54.5 (t, C27); 56.1 (d, C14); 62.7 (d, C6); 63.9 (s, C5); 69.9 (d, C4); 78.8 (d, C22); 104.9 (s, C1'); 123.0 (s, C25); 132.3 (d, C2); 141.9 (d, C3); 156.7 (s, C24); 161.5 (d, C4'); 167.9 (s, C26); 202.4 (s, C1).
ESIMS m/z (%)	579 [M+Na] ⁺ (100).
ESI/MS-AR m/z	Calculado para C ₃₂ H ₄₄ O ₈ Na [M+Na] ⁺ , 579.2934; observado, 579.2939.

Withanolida W-15**16β-Hidroxi-17,20-didehidrowithaferina A**

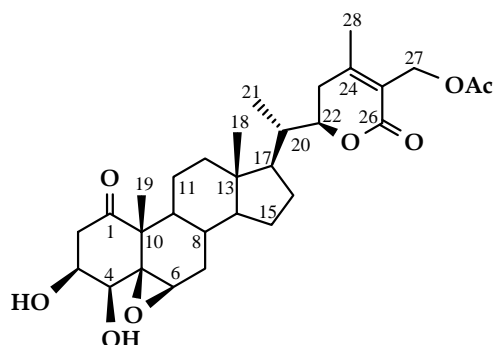
Se obtuvo como un sólido amorfo (5.7 mg).

[α]_D²⁰	+ 25.4 (c 0.6, CHCl ₃).
UV (EtOH) λ_{max} (log ε)	215 (4.1) nm.
IR ν_{max}	3415, 2929, 2861, 1685, 1457, 1384, 1180, 1083, 1026, 755 cm ⁻¹ .
RMN ¹H (δ, CDCl ₃)	0.89 (3H, s, Me18); 1.11 (1H, m, H9); 1.40 (1H, m, H7α); 1.42 (3H, s, Me19); 1.50 (2H, m, H12, H14); 1.51 (1H, m, H11); 1.64 (2H, m, H8, H15); 1.81 (3H, s, Me21); 1.93 (1H, m, H11); 2.02 (3H, s, Me28); 2.21 (1H, m, H7β); 2.23 (1H, m, H23α); 2.29 (1H, m, H12); 2.72 (1H, m, H23β); 3.26 (1H, sa, H6); 3.77 (1H, d, J= 5.9 Hz, H4); 4.38, 4.43 (2H, d _{AB} , J= 12.6 Hz, H27); 4.73 (1H, sa, H16); 5.37 (1H, dd, J= 3.5, 12.9 Hz, H22); 6.21 (1H, d, J= 10.0 Hz, H2); 6.95 (1H, dd, J= 5.9, 10.0 Hz, H3).
RMN ¹³C (δ, CDCl ₃)	12.0 (c, C21); 16.1 (c, C18); 17.1 (c, C19); 19.6 (c, C28); 22.0 (t, C11); 28.4 (d, C8); 30.8 (t, C7); 34.5 (t, C23); 36.0 (t, C15); 36.6 (t, C12); 43.8 (d, C9); 44.2 (s, C13); 47.5 (s, C10); 52.4 (d, C14); 57.2 (t, C27); 62.2 (d, C6); 63.7 (s, C5); 69.6 (d, C4); 71.5 (d, C16); 77.6 (d, C22); 125.1 (s, C25); 129.5 (s, C20); 132.0 (d, C2); 141.8 (d, C3); 150.9 (s, C17); 153.5 (s, C24); 166.7 (s, C26); 201.9 (s, C1).
EM (IR) <i>m/z</i> (%)	484 [M ⁺] (6), 466 (33), 448 (54), 433 (28), 391 (39), 343 (33), 281 (33), 192 (31), 151 (47), 124 (100), 95 (99), 67 (64).
EMAR <i>m/z</i>	Calculado para C ₂₈ H ₃₆ O ₇ [M ⁺], 484.2461; observado, 484.2462.

Withanolida W-16**16,17-Didehidro-withaferina A**

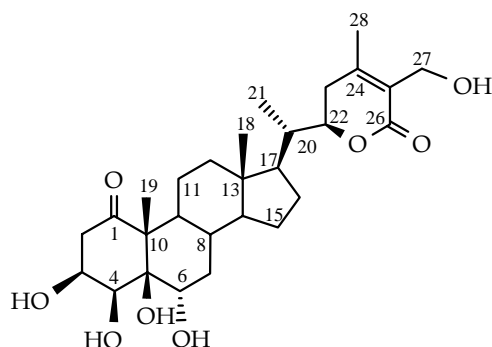
Se obtuvo como un sólido amorfo (4.2 mg).

[α]_D²⁰	+ 55.3 (c 0.2, CHCl ₃).
UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ)	218 (4.3) nm.
IR ν_{\max}	3425, 2926, 2855, 1686, 1459, 1391, 1129, 1212, 1023, 755 cm ⁻¹ .
RMN ¹H (δ, CDCl₃)	0.80 (3H, s, Me18); 1.09 (1H, m, H9); 1.11 (3H, d, J = 7.1, Me21); 1.30 (1H, m, H14); 1.34 (1H, m, H12); 1.41 (1H, m, H7 α); 1.44 (3H, s, Me19); 1.59 (1H, m, H11); 1.72 (1H, m, H8, H12); 1.91 (1H, m, H11); 1.92 (1H, m, H15); 1.97 (3H, s, Me28); 2.12 (1H, m, H15); 2.16 (1H, m, H23 α); 2.21 (1H, m, H7 β); 2.54 (1H, m, H20); 2.56 (1H, m, H23 β); 3.26 (1H, sa, H6); 3.77 (1H, d, J = 5.9 Hz, H4); 4.37, 4.41 (2H, d _{AB} , J = 12.8, Hz, H27); 4.44 (1H, m, H22); 5.52 (1H, sa, H16); 6.22 (1H, d, J = 10.0 Hz, H2); 6.94 (1H, dd, J = 5.9, 10.0 Hz, H3).
RMN ¹³C (δ, CDCl₃)	16.1 (c, C18); 16.6 (c, C21); 17.0 (c, C19); 19.7 (c, C28); 21.5 (t, C11); 28.1 (d, C8); 30.8 (t, C15); 31.0 (t, C7); 32.6 (t, C23); 34.1 (t, C12); 35.7 (d, C20); 44.4 (d, C9); 46.6 (s, C13); 47.7 (s, C10); 56.8 (d, C14; t, C27); 62.2 (d, C6); 63.8 (s, C5); 69.8 (d, C4); 78.8 (d, C22); 124.5 (d, C16); 125.4 (s, C25); 132.3 (d, C2); 141.5 (d, C3); 152.4 (s, C24); 154.9 (s, C17); 166.7 (s, C26); 201.8 (s, C1).
EM (IR) m/z (%)	468 [M ⁺] (4), 450 (7), 435 (16), 419 (7), 402 (5), 328 (14), 299 (29), 281 (24), 149 (30), 141 (100), 123 (10), 91 (43), 67 (36).
EMAR m/z	Calculado para C ₂₈ H ₃₆ O ₆ [M ⁺], 468.2512; observado, 468.2519.

Withanolida W-23**27-O-acetil-viscosalactona B**

Se obtuvo como un sólido amorfo (4.3 mg).

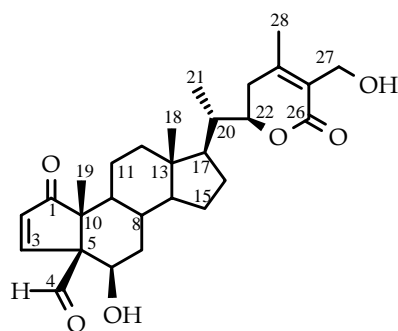
$[\alpha]_D^{20}$	+ 13.9 (c 0.39, CHCl ₃).
UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ)	214 (4.3) nm.
IR ν_{\max}	3401, 2931, 2859, 1678, 1460, 1380, 1272, 1129, 1076, 1022, 754 cm ⁻¹ .
RMN ¹ H (δ , CDCl ₃)	0.70 (3H, s, Me18); 1.01 (1H, m, H14); 1.03 (3H, d, <i>J</i> = 6.4 Hz, Me21); 1.13 (1H, m, H17); 1.19 (2H, m, H12, H15); 1.33 (1H, m, H9); 1.34 (1H, m, H11); 1.35 (3H, s, Me19); 1.36 (1H, m, H7 α); 1.40 (1H, m, H16); 1.44 (1H, m, H8); 1.53 (1H, m, H11); 1.69 (1H, m, H15); 1.70 (1H, m, H16); 1.94 (1H, m, H12); 2.03 (1H, m, H20); 2.05 (1H, m, H23 α); 2.09 (3H, s, OAc); 2.11 (3H, s, Me28); 2.20 (1H, m, H7 β); 2.53 (1H, dd, <i>J</i> = 5.0, 15.4 Hz, H2 α); 2.55 (1H, m, H23 β); 3.21 (1H, dd, <i>J</i> = 6.4, 15.4 Hz, H2 β); 3.31 (1H, sa, H6); 3.46 (1H, d, <i>J</i> = 3.7 Hz, H4); 4.34 (1H, da, <i>J</i> = 3.7 Hz, H3); 4.44 (1H, dt, <i>J</i> = 3.0, 13.3 Hz, H22); 4.89, 4.92 (2H, d _{AB} , <i>J</i> = 12.0 Hz, H27).
RMN ¹³ C (δ , CDCl ₃)	11.6 (c, C18); 13.3 (c, C21); 16.1 (c, C19); 20.6 (c, C28); 21.8 (t, C11); 24.2 (t, C15); 27.3 (t, C16); 29.0 (d, C8); 30.1 (t, C23); 30.9 (t, C7); 38.8 (d, C20); 39.2 (t, C12); 42.3 (d, C9); 42.5 (t, C2); 42.7 (s, C13); 50.2 (s, C10); 52.0 (d, C17); 56.0 (d, C14); 58.0 (t, C27); 60.1 (d, C6); 64.2 (s, C5); 68.5 (d, C3); 76.3 (d, C4); 78.2 (d, C22); 121.9 (s, C25); 157.0 (s, C24); 165.3 (s, C26); 209.8 (s, C1); OAc (20.9 c, 170.9 s).
ESIMS <i>m/z</i> (%)	553 [M+Na] ⁺ (100).
ESI/MS-AR <i>m/z</i>	Calculado para C ₃₀ H ₄₂ O ₈ Na [M+Na] ⁺ , 553.2777; observado, 553.2772.

Withanolida W-24

**3β,4β,5β,6α,27-Pentahidroxi-1-oxo-
witha-24-enolida**

Se obtuvo como un sólido amorfo (8.2 mg).

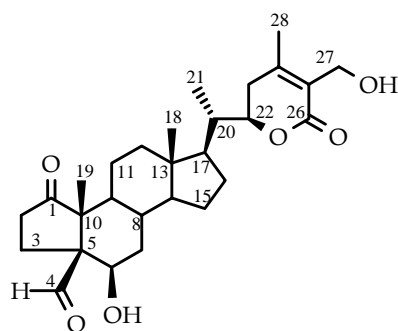
[α]_D²⁰	+ 28.1 (c 0.80, CHCl ₃).
UV (EtOH) λ_{max} (log ε)	215 (4.1) nm.
IR ν_{max}	3748, 3499, 2929, 1658, 1459, 1397, 1256, 1065, 838, 756 cm ⁻¹ .
RMN ¹H (δ, CDCl₃)	0.72 (3H, s, Me18); 1.01 (1H, m, H14); 1.02 (3H, d, J= 6.5 Hz, Me21); 1.11 (1H, m, H12); 1.15 (1H, m, H17); 1.22 (2H, m, H7α, H15); 1.28 (3H, s, Me19); 1.41 (1H, m, H16); 1.52 (1H, m, H9); 1.54 (2H, m, H11); 1.58 (1H, m, H8); 1.70 (1H, m, H15); 1.72 (1H, m, H16); 2.00 (1H, m, H23α); 2.02 (1H, m, H12); 2.05 (1H, m, H20); 2.07 (3H, s, Me28); 2.08 (1H, m, H7β); 2.53 (2H, m, H2α, H23β); 2.70 (1H, d, J= 18.5 Hz, H2β); 4.15 (1H, d, J= 7.9 Hz, H6); 4.36, 4.42 (2H, d _{AB} , J= 12.4 Hz, H27); 4.38 (1H, m, H3); 4.46 (2H, m, H4, H22).
RMN ¹³C (δ, CDCl₃)	11.6 (c, C18); 13.4 (c, C21); 14.7 (c, C19); 20.1 (c, C28); 20.8 (t, C11); 24.2 (t, C15); 27.3 (t, C16); 29.8 (t, C23); 30.9 (d, C8); 31.8 (t, C7); 38.7 (d, C20); 39.1 (t, C12); 40.5 (d, C9); 41.5 (t, C2); 42.6 (s, C13); 51.6 (d, C17); 54.7 (s, C10); 57.3 (t, C27); 57.9 (d, C14); 72.9 (d, C3); 76.4 (s, C5; d, C6); 77.7 (d, C4); 78.9 (d, C22); 125.5 (s, C25); 153.7 (s, C24); 167.3 (s, C26); 210.4 (s, C1).
ESIMS m/z (%)	529 [M+Na] ⁺ (100).
ESI/MS-AR m/z	Calculado para C ₂₈ H ₄₂ O ₈ Na [M+Na] ⁺ , 529.2777; observado, 529.2775.

Withanolida W-28

**4β-Formil-6β,27-dihidroxi-5-nor-1-oxo-
witha-2,24-dienolida**

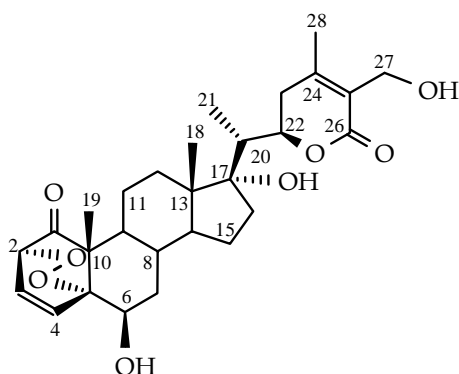
Se obtuvo como un sólido amorfo (5.0 mg).

[α]_D²⁰	+ 160.8 (c 0.68, CHCl ₃).
UV (EtOH) λ_{max} (log ε)	220 (3.9) nm, 231 (2.8) nm.
IR ν_{max}	3438, 2940, 2870, 1700, 1460, 1396, 1320, 1187, 1019, 852, 754 cm ⁻¹ .
RMN ¹H (δ, CDCl₃)	0.77 (3H, s, Me18); 0.94 (1H, m, H14); 1.00 (1H, m, H7α); 1.01 (3H, d, J= 6.7 Hz, Me21); 1.06 (2H, m, H12); 1.09 (1H, m, H17); 1.12 (1H, m, H9); 1.22 (3H, s, Me19); 1.23 (1H, m, H15); 1.40 (1H, m, H16); 1.43 (2H, m, H11); 1.64 (1H, m, H15); 1.66 (1H, m, H16); 1.89 (1H, m, H8); 1.96 (1H, m, H7β); 1.97 (1H, m, H23α); 2.00 (1H, m, H20); 2.01 (3H, s, Me28); 2.51 (1H, m, H23β); 2.88 (1H, s, OH-27); 3.27 (1H, s, OH-6); 4.34, 4.40 (2H, d _{AB} , J= 12.5 Hz, H27); 4.41 (1H, dt, J= 3.6, 13.3 Hz, H22); 4.58 (1H, sa, H6); 6.55 (1H, d, J= 5.8 Hz, H2); 6.97 (1H, d, J= 5.8 Hz, H3); 8.79 (1H, s, H4).
RMN ¹³C (δ, CDCl₃)	11.7 (c, C18); 12.1 (c, C19); 13.1 (c, C21); 19.8 (c, C28); 20.7 (t, C11); 23.9 (t, C15); 27.1 (t, C16); 29.5 (t, C23); 30.1 (d, C8); 35.2 (t, C7); 38.5 (d, C20); 39.1 (t, C12); 42.9 (s, C13); 47.0 (d, C9); 51.7 (d, C17); 55.5 (s, C10); 55.8 (d, C14); 57.2 (t, C27); 67.0 (d, C6); 70.9 (s, C5); 78.4 (d, C22); 125.5 (s, C25); 136.8 (d, C2); 152.5 (d, C3); 153.3 (s, C24); 166.7 (s, C26); 199.7 (d, C4); 208.9 (s, C1).
ESIMS m/z (%)	469 [M-1] ⁺ (100).
ESI/MS-AR m/z	Calculado para C ₂₈ H ₃₇ O ₆ [M-1] ⁺ , 469.2590; observado, 469.2580.

Withanolida W-29**4β-Formil-6β,27-dihidroxi-5-nor-1-oxo-witha-24-enolida**

Se obtuvo como un sólido amorfo (2.0 mg).

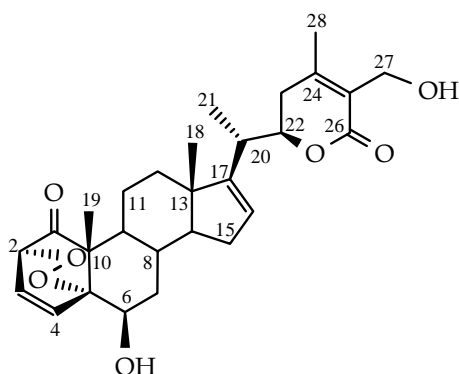
[α]_D²⁰	+ 33.8 (c 0.21, CHCl ₃).
UV (EtOH) λ_{max} (log ε)	221 (3.8).
IR ν_{max}	3400, 2937, 2859, 1700, 1405, 1315, 1185, 1016, 849, 750 cm ⁻¹ .
RMN ¹H (δ, CDCl₃)	0.77 (3H, s, Me18); 1.03 (3H, d, J= 6.6 Hz, Me21); 1.08 (1H, m, H14); 1.09 (1H, m, H9); 1.12 (1H, m, H12); 1.16 (1H, m, H17); 1.19 (3H, s, Me19); 1.27 (2H, m, H11, H15); 1.43 (1H, m, H16); 1.49 (1H, m, H7); 1.67 (1H, m, H11); 1.71 (2H, m, H15, H16); 1.83 (2H, m, H3, H8); 1.87 (1H, m, H7); 2.00 (1H, m, H23α); 2.02 (1H, m, H12); 2.03 (1H, m, H3); 2.04 (1H, m, H20); 2.06 (3H, s, Me28); 2.39 (1H, m, H2); 2.54 (1H, m, H23β); 2.57 (1H, m, H2); 4.31 (1H, t, J= 2.8 Hz, H6); 4.37, 4.42 (2H, d _{AB} , J= 12.3 Hz, H27); 4.45 (1H, dt, J= 3.5, 13.0 Hz, H22); 9.60 (1H, s, H4).
RMN ¹³C (δ, CDCl₃)	11.7 (c, C18); 13.1 (c, C19); 13.2 (c, C21); 19.8 (c, C28); 22.4 (t, C11); 22.5 (t, C3); 23.9 (t, C15); 27.1 (t, C16); 28.9 (d, C8); 29.5 (t, C23); 32.5 (t, C2); 33.9 (t, C7); 38.5 (d, C20); 39.1 (t, C12); 41.9 (d, C9); 43.0 (s, C13); 51.7 (d, C17); 52.4 (s, C10); 55.7 (d, C14); 57.3 (t, C27); 60.5 (s, C5); 67.4 (d, C6); 78.5 (d, C22); 125.5 (s, C25); 152.5 (s, C24); 166.8 (s, C26); 204.3 (d, C4); 216.2 (s, C1).
ESIMS m/z (%)	495 [M+Na] ⁺ (100).
ESI/MS-AR m/z	Calculado para C ₂₈ H ₄₀ O ₆ Na [M+Na] ⁺ , 495.2723; observado, 495.2730.

Withanolida W-30

6β,17α,27-Trihidroxi-2α,5α-dioxan-1-oxo-witha-3,24-dienolida

Se obtuvo como un sólido amorfo (5.8 mg).

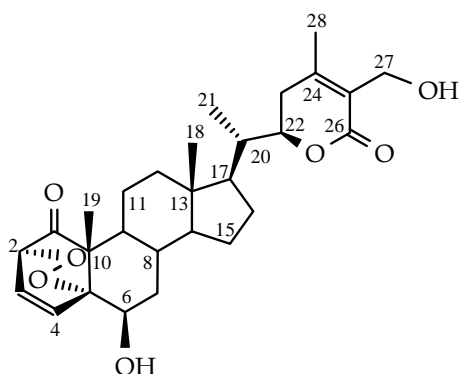
[α]_D²⁰	+ 20.4 (c 0.28, CHCl ₃).
UV (EtOH) λ_{max} (log ε)	216 (4.4) nm.
IR ν_{max}	3740, 2929, 2362, 1700, 1538, 1454, 1399, 1258, 1060, 830 cm ⁻¹ .
RMN ¹H (δ, CDCl₃)	0.88 (3H, s, Me18); 1.06 (3H, d, J= 7.0 Hz, Me21); 1.25 (1H, m, H15); 1.31 (3H, s, Me19); 1.50 (1H, m, H12); 1.61 (1H, m, H11); 1.63 (1H, m, H16); 1.70 (1H, m, H7α); 1.71 (1H, m, H16); 1.73 (1H, m, H12); 1.74 (1H, m, H15); 1.75 (1H, m, H14); 1.88 (1H, m, H8); 1.90 (2H, m, H9, H11); 2.01 (1H, m, H7β); 2.05 (3H, s, Me28); 2.35 (1H, m, H20); 2.56 (2H, d, J= 8.0 Hz, H23); 4.08 (1H, sa, H6); 4.37, 4.42 (2H, d _{AB} , J= 12.6 Hz, H27); 4.53 (1H, d, J= 6.2 Hz, H2); 4.69 (1H, t, J= 8.2 Hz, H22); 6.69 (1H, dd, J= 6.2, 8.2 Hz, H3); 7.04 (1H, d, J= 8.2 Hz, H4).
RMN ¹³C (δ, CDCl₃)	9.4 (c, C21); 15.0 (c, C18); 19.4 (c, C19); 19.9 (c, C28); 22.0 (t, C11); 23.6 (t, C15); 29.6 (d, C8); 32.0 (t, C12); 32.9 (t, C23); 34.9 (t, C16); 36.6 (t, C7); 42.1 (d, C9); 42.7 (d, C20); 48.2 (s, C10); 48.3 (s, C13); 49.3 (d, C14); 57.4 (t, C27); 67.1 (d, C6); 78.6 (d, C2); 79.2 (d, C22); 84.2 (s, C5); 84.9 (s, C17); 125.1 (s, C25); 126.5 (d, C3); 141.4 (d, C4); 154.3 (s, C24); 167.1 (s, C26); 206.0 (s, C1).
ESIMS m/z (%)	525 [M+Na] ⁺ (100).
ESI/MS-AR m/z	Calculado para C ₂₈ H ₃₈ O ₈ Na [M+Na] ⁺ , 525.2464; observado, 525.2454.

Withanolida W-31

**6β,27-Dihidroxi-2α,5α-dioxan-1-oxo-
witha-3,16,24-trienolida**

Se obtuvo como un sólido amorfo (3.1 mg).

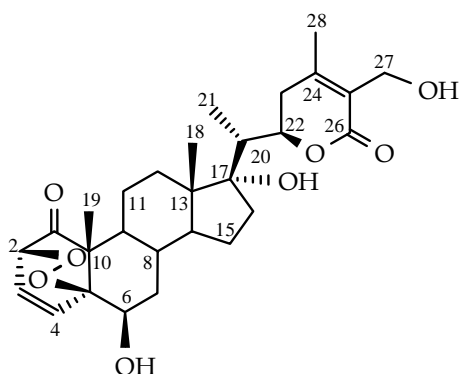
[α]_D²⁰	- 4.0 (c 0.50, CHCl ₃).
UV (EtOH) λ_{max} (log ε)	214 (4.1) nm.
IR ν_{max}	3410, 2930, 2861, 1681, 1461, 1380, 1272, 1131, 1078, 1022, 755 cm ⁻¹ .
RMN ¹H (δ, CDCl₃)	0.88 (3H, s, Me18); 1.14 (3H, d, J= 7.0 Hz, Me21); 1.35 (3H, s, Me19); 1.43 (1H, m, H15); 1.55 (1H, m, H14); 1.65 (1H, m, H11); 1.69 (1H, m, H12); 1.70 (1H, m, H11); 1.73 (1H, m, H12); 1.95 (1H, m, H7α); 1.99 (1H, m, H9); 2.01 (1H, m, H8); 2.06 (3H, s, Me28); 2.11 (1H, m, H15); 2.14 (1H, m, H7β); 2.19 (1H, m, H23α); 2.54 (1H, m, H20); 2.56 (1H, m, H23β); 2.92 (1H, sa, OH); 4.10 (1H, s, H6); 4.38, 4.42 (2H, d _{AB} , J= 13.7 Hz, H27); 4.47 (1H, dt, J= 3.9, 12.9 Hz, H22); 4.53 (1H, d, J= 6.2 Hz, H2); 5.55 (1H, sa, H16); 6.69 (1H, dd, J= 6.2, 8.1 Hz, H3); 7.05 (1H, d, J= 8.1 Hz, H4).
RMN ¹³C (δ, CDCl₃)	16.5 (c, C18); 16.9 (c, C21); 19.5 (c, C19); 19.9 (c, C28); 22.2 (t, C11); 28.0 (d, C8); 31.2 (t, C7); 32.9 (t, C23); 34.3 (t, C15); 34.8 (t, C12); 35.8 (d, C20); 43.1 (d, C9); 47.2 (s, C13); 48.5 (s, C10); 56.0 (d, C14); 57.5 (t, C27); 67.2 (d, C6); 78.6 (d, C2); 79.1 (d, C22); 84.3 (s, C5); 124.4 (d, C16); 125.7 (s, C25); 126.4 (d, C3); 141.5 (d, C4); 152.6 (s, C24); 155.3 (s, C17); 166.4 (s, C26); 206.2 (s, C1).
ESIMS m/z (%)	507 [M+Na] ⁺ (100).
ESI/MS-AR m/z	Calculado para C ₂₈ H ₃₆ O ₇ Na [M+Na] ⁺ , 507.2359; observado, 507.2355.

Withanolida W-32

**6β,27-Dihidroxi-2α,5α-dioxan-1-oxo-
witha-3,24-dienolida**

Se obtuvo como un sólido amorfo (3.1 mg).

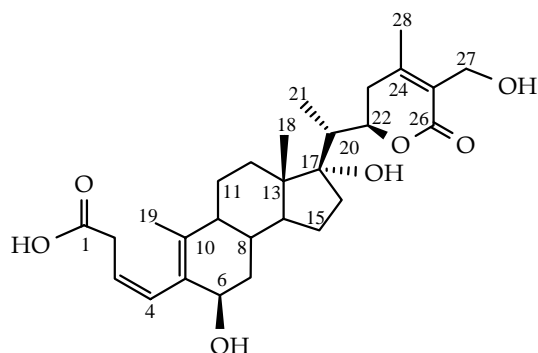
$[\alpha]_{D}^{20}$	- 3.9 (c 0.25, CHCl ₃).
UV (EtOH) λ_{max} (log ϵ)	217 (4.3) nm.
IR ν_{max}	3444, 2927, 1700, 1625, 1458, 1393, 1270, 1130, 1024, 754 cm ⁻¹ .
RMN ¹ H (δ , CDCl ₃)	0.79 (3H, s, Me18); 1.05 (3H, d, J = 6.7 Hz, Me21); 1.16 (1H, m, H17); 1.19 (1H, m, H14); 1.20 (1H, m, H15); 1.23 (1H, m, H12); 1.31 (3H, s, Me19); 1.40 (1H, m, H16); 1.60 (1H, m, H11); 1.62 (1H, m, H7 α); 1.67 (1H, m, H15); 1.69 (1H, m, H16); 1.81 (1H, m, H11); 1.83 (1H, m, H8); 1.92 (1H, m, H9); 2.02 (1H, m, H23 α); 2.03 (1H, m, H12); 2.04 (1H, m, H20); 2.08 (3H, s, Me28); 2.14 (1H, m, H7 β); 2.54 (1H, m, H23 β); 4.08 (1H, s, H6); 4.38, 4.40 (2H, d _{AB} , J = 12.2 Hz, H27); 4.46 (1H, dt, J = 3.3, 13.3 Hz, H22); 4.53 (1H, d, J = 6.5 Hz, H2); 6.70 (1H, dd, J = 6.5, 8.4 Hz, H3); 7.04 (1H, d, J = 8.4 Hz, H4).
RMN ¹³ C (δ , CDCl ₃)	12.0 (c, C18); 13.4 (c, C21); 19.5 (c, C19); 19.9 (c, C28); 22.2 (t, C11); 24.3 (t, C15); 27.2 (t, C16); 29.4 (d, C8); 29.8 (t, C23); 31.1 (t, C7); 38.8 (d, C20); 39.4 (t, C12); 42.4 (d, C9); 42.9 (s, C13); 48.2 (s, C10); 51.9 (d, C17); 54.8 (d, C14); 57.4 (t, C27); 67.1 (d, C6); 78.6 (d, C2); 78.8 (d, C22); 84.1 (s, C5); 125.6 (s, C25); 126.4 (d, C3); 141.3 (d, C4); 152.9 (s, C24); 166.7 (s, C26); 206.0 (s, C1).
ESIMS m/z (%)	509 [M+Na] ⁺ (100).
ESI/MS-AR m/z	Calculado para C ₂₈ H ₃₈ O ₇ Na [M+Na] ⁺ , 509.2515; observado, 509.2508.

Withanolida W-33

6β,17α,27-Trihidroxi-2β,5β-dioxan-1-oxo-witha-3,24-dienolida

Se obtuvo como un sólido amorfo (3.7 mg).

[α]_D²⁰	+ 31.9 (c 0.19, CHCl ₃).
UV (EtOH) λ_{max} (log ε)	214 (4.0) nm.
IR ν_{max}	3430, 2972, 2929, 2855, 1689, 1457, 1394, 1013, 754 cm ⁻¹ .
RMN ¹H (δ, CDCl₃)	0.88 (3H, s, Me18); 1.03 (1H, m, H9); 1.04 (3H, d, J= 6.9 Hz, Me21); 1.28 (1H, m, H15); 1.38 (1H, m, H12); 1.45 (1H, m, H16); 1.59 (1H, m, H14); 1.61 (3H, s, Me19); 1.68 (1H, m, H7α); 1.69 (2H, m, H11, H12); 1.72 (1H, m, H15); 1.98 (1H, m, H8); 2.00 (1H, m, H16); 2.01 (1H, m, H7β); 2.04 (3H, s, Me28); 2.26 (1H, m, H11); 2.35 (1H, m, H20); 2.55 (2H, d, J= 8.1 Hz, H23); 2.87 (1H, sa, OH); 4.15 (1H, sa, H6); 4.37, 4.41 (2H, d _{AB} , J= 11.8 Hz, H27); 4.60 (1H, d, J= 6.4 Hz, H2); 4.67 (1H, dt, J= 2.9, 11.8 Hz, H22); 6.58 (1H, d, J= 8.1 Hz, H4); 6.67 (1H, dd, J= 6.4, 8.1 Hz, H3).
RMN ¹³C (δ, CDCl₃)	9.4 (c, C21); 15.1 (c, C18); 16.0 (c, C19); 20.0 (c, C28); 23.1 (t, C11); 23.6 (t, C15); 30.4 (d, C8); 31.9 (t, C12); 32.9 (t, C23); 34.0 (t, C16); 36.4 (t, C7); 42.6 (d, C20); 48.3 (s, C13); 48.8 (s, C10); 49.4 (d, C14); 50.0 (d, C9); 57.5 (t, C27); 69.1 (d, C6); 79.1 (d, C22); 80.0 (d, C2); 84.6 (s, C5); 85.0 (s, C17); 125.2 (s, C25); 125.9 (d, C3); 142.5 (d, C4); 154.1 (s, C24); 167.1 (s, C26); 205.9 (s, C1).
ESIMS m/z (%)	525 [M+Na] ⁺ (100).
ESI/MS-AR m/z	Calculado para C ₂₈ H ₃₈ O ₈ Na [M+Na] ⁺ , 525.2464; observado, 525.2465.

Withanolida W-34

2-Carboxi-6β,17α,27-trihidroxi-1,10-seco-witha-3,5(10), 24-trienolida

Se obtuvo como un sólido amorfo (1.5 mg).

[α]_D²⁰ + 25.4 (c 0.50, CHCl₃).

UV (EtOH) λ_{max} (log ε) 222 (4.4) nm.

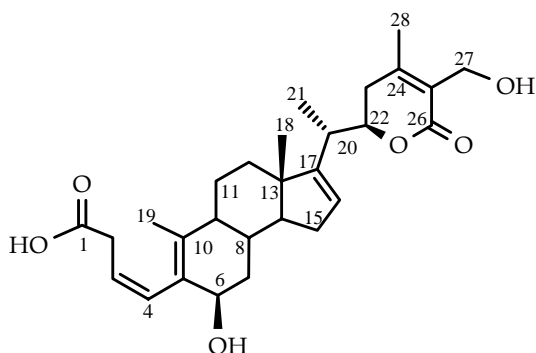
IR ν_{max} 3518-2547, 3442, 2928, 1694, 1540, 1456, 1395, 1254, 1066, 836 cm⁻¹.

RMN ¹H 0.87 (3H, s, Me18); 1.07 (3H, d, J= 6.5 Hz, Me21); 1.28 (1H, m, H12);
(δ, CDCl₃) 1.31 (1H, m, H11); 1.37 (1H, m, H8); 1.39 (1H, m, H15); 1.45 (1H, m, H7α); 1.65 (1H, m, H15); 1.69 (1H, m, H12); 1.70 (1H, m, H16); 1.74 (1H, m, H11); 1.75 (1H, m, H14); 1.76 (1H, m, H9); 1.83 (3H, s, Me19); 2.04 (1H, m, H16); 2.06 (3H, s, Me28); 2.11 (1H, m, H23α); 2.12 (1H, m, H7β); 2.37 (1H, m, H20); 2.56 (1H, m, H23β); 2.88 (1H, sa, OH); 3.23 (1H, dd, J= 9.4, 16.4 Hz, H2); 3.85 (1H, d, J= 16.4 Hz, H2); 4.37, 4.43 (2H, d_{AB}, J= 11.8 Hz, H27); 4.70 (1H, dt, J= 3.4, 11.4 Hz, H22); 5.13 (1H, sa, H6); 5.52 (1H, t, J= 9.4 Hz, H3), 6.58 (1H, d, J= 9.4 Hz, H4).

RMN ¹³C 9.5 (c, C21); 15.2 (c, C18); 15.7 (c, C19); 20.0 (c, C28); 22.7 (t, C11); 25.4 (t, C15); 29.4 (d, C8); 32.7 (t, C12); 32.9 (t, C23); 33.2 (t, C7); 35.6 (t, C2); 36.8 (t, C16); 42.6 (d, C20); 47.3 (d, C9); 48.7 (s, C13); 48.8 (d, C14); 57.5 (t, C27); 73.0 (d, C6); 79.1 (d, C22); 85.0 (s, C17); 117.5 (d, C3); 124.9 (s, C5); 125.2 (s, C25); 129.4 (d, C4); 141.6 (s, C10); 153.7 (s, C24); 167.0 (s, C26); 172.8 (s, C1).

ESIMS m/z (%) 511 [M+Na]⁺ (100).

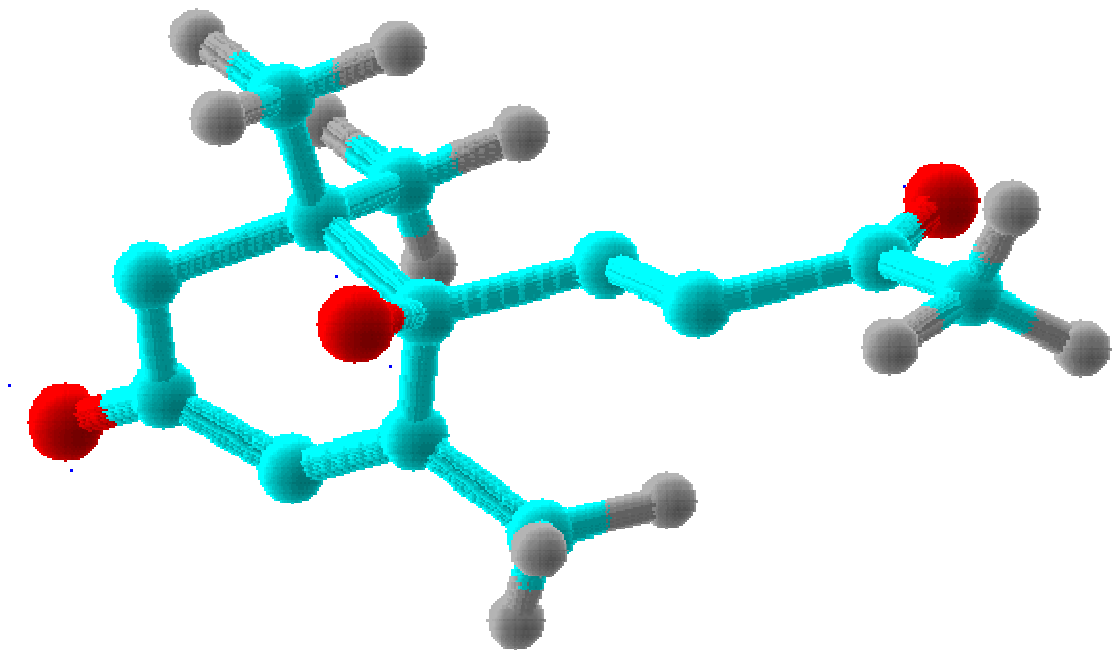
ESI/MS-AR m/z Calculado para C₂₈H₄₀O₇Na [M+Na]⁺, 511.2672; observado, 511.2676.

Withanolida W-35

**2-Carboxi-6β,27-dihidroxi-1,10-seco-
witha-3,5(10),16,24-tetraenolida**

Se obtuvo como un sólido amorfo (1.9 mg).

[α]_D²⁰	+ 30.2 (c 0.34, CHCl ₃).
UV (EtOH) λ_{max} (log ε)	215 (4.3) nm.
IR ν_{max}	3740, 3520-2555, 2929, 1700, 1538, 1456, 1394, 1254, 1064, 834 cm ⁻¹ .
RMN ¹H (δ, CDCl₃)	0.83 (3H, s, Me18); 1.16 (3H, d, J= 6.5 Hz, Me21); 1.21 (1H, m, H11); 1.38 (1H, m, H8); 1.48 (1H, m, H12); 1.49 (1H, m, H7α); 1.53 (1H, m, H14); 1.56 (1H, m, H15); 1.73 (1H, m, H9); 1.69 (1H, m, H11); 1.82 (3H, s, Me19); 1.86 (1H, m, H12); 2.06 (3H, s, Me28); 2.10 (1H, m, H15); 2.14 (1H, m, H7β); 2.17 (1H, m, H23α); 2.60 (1H, m, H23β); 2.61 (1H, m, H20); 3.21 (1H, dd, J= 9.9, 16.9 Hz, H2); 3.85 (1H, d, J= 16.9 Hz, H2); 4.36, 4.41 (2H, d _{AB} , J= 12.2 Hz, H27); 4.49 (1H, dt, J= 3.1, 12.7 Hz, H22); 5.14 (1H, sa, H6); 5.50 (1H, t, J= 9.9 Hz, H3), 5.58 (1H, s, H16); 6.58 (1H, d, J= 9.9 Hz, H4).
RMN ¹³C (δ, CDCl₃)	15.7 (c, C19); 16.2 (c, C18); 17.0 (c, C21); 19.9 (c, C28); 24.3 (t, C11); 29.6 (d, C8); 32.4 (t, C15); 33.0 (t, C23); 33.2 (t, C7); 34.9 (t, C12); 35.6 (t, C2); 35.8 (d, C20); 47.5 (s, C13); 47.6 (d, C9); 56.0 (d, C14); 57.4 (t, C27); 73.2 (d, C6); 78.8 (d, C22); 117.2 (d, C3); 124.8 (d, C16); 124.9 (s, C5); 125.4 (s, C25); 129.4 (d, C4); 141.6 (s, C10); 152.9 (s, C24); 154.9 (s, C17); 166.8 (s, C26); 172.8 (s, C1).
ESIMS m/z (%)	493 [M+Na] ⁺ (100).
ESI/MS-AR m/z	Calculado para C ₂₈ H ₃₈ O ₆ Na [M+Na] ⁺ , 493.2566; observado, 493.2561.



4.2. Carotenoides y apocarotenoides

4.2.1. Introducción

Los carotenoides son compuestos constituidos por ocho unidades de isopreno con unión cabeza-cola y la mayoría de ellos poseen cuarenta átomos de carbono.

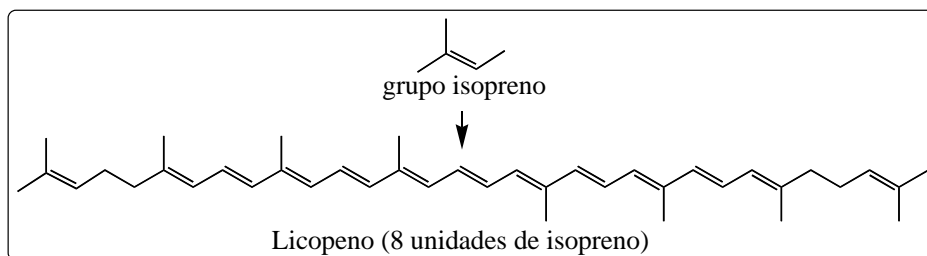


Figura 4.2.1. El carotenoide licopeno está constituido de 8 unidades de isopreno

Los carotenoides pueden clasificarse según su estructura química o bien su función en la planta. Se pueden clasificar por su estructura como carotenos, cuando están constituidos sólo por carbono e hidrógeno, como en el caso del β -caroteno y del licopeno, o ser considerados xantofilas, cuando también tienen oxígeno en su estructura, como por ejemplo, la luteína o la zeoxantina. Por otra parte, se denominan carotenoides primarios o secundarios a aquellos que son necesarios en los procesos fotosintéticos, como es el caso del β -caroteno, luteína o neoxantina, mientras que los carotenoides secundarios son aquellos que no están directamente implicados en la supervivencia de la planta, como α -caroteno o capsantina¹.

Hay más de 600 carotenoides en la naturaleza, distribuidos en plantas superiores, bacterias, hongos y algunos animales, aunque estos últimos no pueden biosintetizar estos metabolitos de forma natural y los obtienen de la dieta. La mayoría de ellos se pueden encontrar en las plantas superiores, sobre todo en sus hojas, flores y frutas.

¹ Mattea, F.; Martín, A.; Cosero, M. J. J. *Journal of Food Engineering*. 2009, 93, 255.

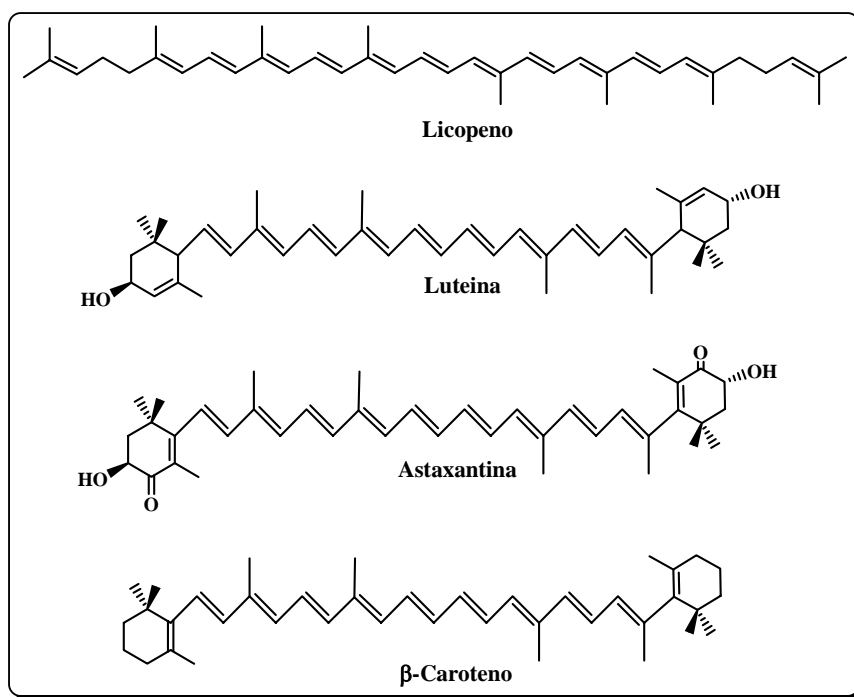


Figura 4.2.2. Ejemplos de los carotenoides más frecuentes

La principal función de los carotenoides en la naturaleza está relacionada con los procesos fotosintéticos, como foto-protectores del aparato fotosintético de la planta y como antioxidantes. Los carotenoides tienen un gran impacto en la industria alimentaria como colorantes naturales, su color, que varía desde amarillo pálido, pasando por anaranjado, hasta rojo oscuro, se encuentra directamente relacionado con su estructura, los dobles enlaces carbono-carbono que interactúan entre sí produciendo conjugación. A medida que el número de dobles enlaces conjugados aumenta la longitud de onda de la luz absorbida también lo hace, dando al compuesto una apariencia más rojiza. Por ejemplo, el fitoeno, que posee únicamente tres dobles enlaces conjugados, absorbe luz en el rango ultravioleta y aparece por tanto incoloro a la vista o el licopeno, compuesto que confiere su color rojo al tomate, contiene once dobles enlaces conjugados. Además de su papel en las plantas como pigmentos y colorantes, los carotenoides contribuyen a la salud del hombre por sus propiedades antioxidantes, disminuyendo el riesgo de contraer diversas enfermedades, particularmente algunos tipos de cáncer^{2,3}.

² Abdullaev, F. I.; Espinosa-Aguirre, J. J. *Cancer Detect. Prev.* **2004**, *28*, 426.

³ Krinsky, N. I.; Johnson, E. J. *Mol. Aspects. Med.* **2005**, *26*, 459.

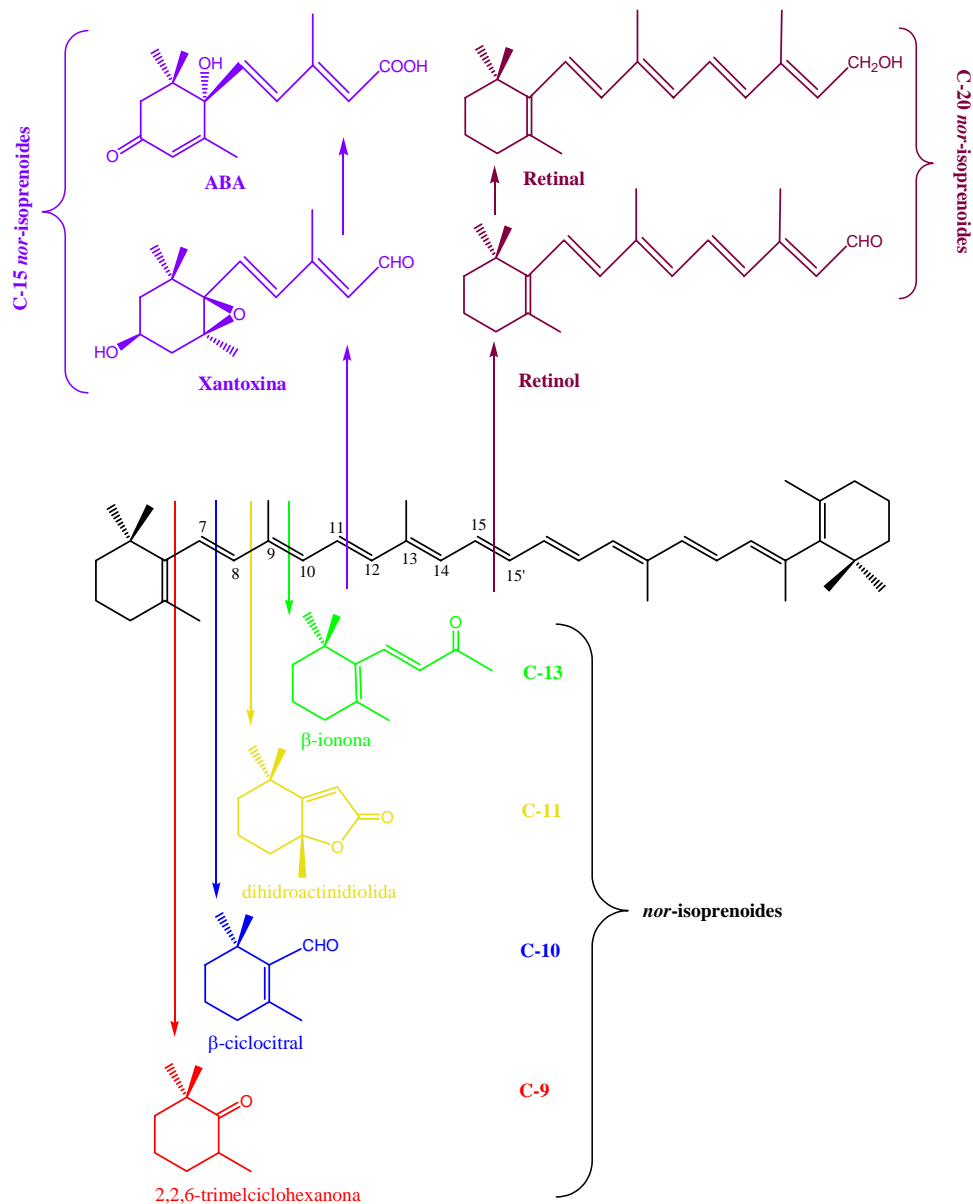
Los apocarotenoides (*apo* significa “a partir de”) son compuestos que provienen de cadenas largas hidrocarbonadas de los carotenoides de cuarenta átomos de carbono, los cuales han perdido átomos de carbono de la cadena lineal por medio de reacciones enzimáticas oxidativas. El enorme número de apocarotenoides en la naturaleza se debe a la gran variedad de carotenoides precursores que existen en la naturaleza⁴.

Estos compuestos están ampliamente distribuidos en la naturaleza y algunos poseen funciones biológicas importantes en diversos organismos. Por ejemplo, la vitamina A es necesaria para el desarrollo y la visión en animales, mientras que en plantas, el ácido abscísico (ABA) está implicado en el desarrollo de la semilla y en la adaptación a una variedad de condiciones de estrés. Las plantas producen un gran número de apocarotenoides volátiles y estos compuestos probablemente sirvan como atrayentes de insectos que son los encargados de la dispersión de semillas, como defensa alelopática y contribuyan al olor y sabor de éstas. Algunos pigmentos de apocarotenoides tienen valor económico, como la bixina y la crocetina. En la actualidad muchos apocarotenoides han sido identificados en plantas, pero sus funciones aún permanecen desconocidas⁴.

Los apocarotenoides se forman por la ruptura oxidativa de carotenoides, generando inicialmente aldehídos o cetonas en el sitio de ruptura. El mecanismo de ruptura se estableció por primera vez con la conversión del β -caroteno (provitamina A) a retinal (vitamina A) por Moore y colaboradores en 1930. Desde entonces y dada la importancia de los apocarotenoides en los sistemas vivos, así como las posibles aplicaciones comerciales en la industria alimentaria y en perfumería, se han llevado a cabo numerosos estudios en diversos campos. Estos productos de degradación por ruptura oxidativa de carotenoides son compuestos carbonílicos con 9, 10, 11, 13, 15 o 20 átomos de carbono, dependiendo de la posición donde se produzca la ruptura en el carotenoide precursor y son conocidos como *nor*-isoprenoides o apocarotenoides como se ilustra en el esquema.

Se sabe que la ruptura en la posición 9-10 del carotenoide es termodinámicamente favorable, por lo que los C13 *nor*-isoprenoides son el grupo mayoritario de este tipo de metabolitos.

⁴ Schwartz, S.; Qin, X.; Zeevaart, J. *J Biol.Chem.* **2001**, 276, 25208.



Se ha descrito carotenoides y apocarotenoides en especies de la familia solanáceas. Así, del tomate (*Solanum lycopersicum*) se han aislado 9 carotenoides: licopeno, γ -caroteno, β -zeacaroteno, fitoflueno, fitoeno, licoxantina, 1,2-epoxi-licopeno, 1,2-epoxi- ξ -caroteno y 1,2-epoxi-fitoeno, llegando a ser el contenido en licopeno mayor al 85% del total de los carotenoides en los tomates maduros, por lo que se le considera responsable del intenso color rojo del tomate⁵. Así mismo, se ha aislado un gran número de apocarotenoides de esta especie y como ejemplo están la loliolida ó la α -ionona.

⁵ Lenucci, M. S.; Cadinu, D.; Taurino, M.; Piro, G.; Dalessandro G. J. *Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 2606.

De *Capsicum annuum* (pimienta roja) se han aislado quince carotenoides (anhidroluteína I, 5,6-diepilatoxantina, cucurbitaxantina A, cucurbitaxantina B, cucurbitacroma 1, mutatoxantina, cicloviolaxantina, criptcapsina, capsantina, 5,6-diepicapsokarboxantina, 5,6-epoxi-capsantina, 3,6-epoxi-capsantina, capsantona, y capsorubina) y 2 apocarotenoides (apo-12'-capsorubinal y retro-C₁₈-diona)⁶.

En la patata (*Solanum tuberosum*) predominan carotenoides del tipo xantofilas, tales como la luteína, zeaxantina y violaxantina. Sin embargo, hay una gran diferencia en el contenido de estos carotenoides según el color de las patatas; así en patatas blancas es de 50-100 µg/100 g del peso fresco, mientras que en las patatas rojas o violetas es de 2000 µg/100 g del peso fresco⁷.

Sobre *Nicotiana tabacum* se conoce la existencia de los típicos carotenoides que suelen estar en las hojas verdes de las plantas, β-caroteno, luteína, violaxantina y neoxantina, al igual que sus precursores, así, cerca de dieciocho carotenoides han sido identificados en las hojas de tabaco verde⁸. Los carotenoides al igual que los diterpenoides son precursores de muchos productos de degradación y muchos de los aromas del tabaco pueden ser debidos a los productos de la degradación de carotenoides por ruptura oxidativa de la cadena poliénica.

⁶ Eich, E. Solanaceae and convolvulaceae: Secondary Metabolites, Springer, Verlag Berlin Heidelberg, 2008.

⁷ Brown, C. R. *Am. J. potato Res.* 2005, 82, 163-172.

⁸ Weeks, W. W. *Relationships between leaf chemistry and organoleptic properties of tobacco smoke*. In: Davis, D. L., Nielsen, M. T. (eds) Tobacco-production, Chemistry and technology. Blackwell Science, Oxford, UK, 1999, pp 304-312.

4.2.2. Resultados y discusión

Tras repetidas cromatografías de los extractos de hojas y tallos de *W. aristata*, como se indica en la parte experimental de esta Memoria, se han aislado un carotenoide (**luteína**), nueve C-13 *nor*-isoprenoides que hemos denominado de **Ap-1** a **Ap-9** y dos C-11 *nor*-isoprenoides, que hemos denominado **Ap-10** y **Ap-11**. La reunión de las fracciones 37-41 obtenidas de la cromatografía general del extracto de diclorometano de las hojas de *W. aristata*, y posterior acetilación, se aislaron tres C-13 *nor*-isoprenoides glicosilados y acetilados, que hemos denominado **Ap-12** a **Ap-14**. Los compuestos habían sido descritos en la bibliografía química, a excepción de **Ap-12**.

La estructura de **Ap-12** fue elucidada mediante técnicas espectroscópicas de RMN de ¹H y ¹³C, incluyendo experimentos homonucleares y heteronucleares, IR, UV y espectrometría de masas. Por otra parte, las estructuras de los compuestos ya descritos fueron caracterizadas basándonos en sus datos físicos y espectroscópicos y comparación de los mismos con los existentes en la bibliografía química. Así, estos compuestos **luteína** (110,0 mg), **Ap-1** (31,0 mg), **Ap-2** (5,4 mg), **Ap-3** (4,5 mg), **Ap-4** (1,5 mg), **Ap-5** (1,2 mg), **Ap-6** (2,0 mg), **Ap-7** (6,5 mg), **Ap-8** (2,0 mg), **Ap-9** (1,0 mg), **Ap-13** (2,5 mg) y **Ap-14** (8,5 mg) resultaron ser coincidentes con los descritos en la bibliografía química para **luteína**⁹, (6*S*,9*R*)-vomifoliol¹⁰, 9-hidroximegastigma-4,6*E*-dien-3-ona¹¹, (6*S*)-3-oxi-6-hidroxi- α -ionona¹², blumenol C¹³, blumenol B¹³, 3,6-dihidroxi- α -ionona¹⁴, 3-oxo- α -ionona¹⁵, (6*R*,9*R*)-3-oxo- α -ionol¹¹, 4-[(1*S*,6*S*)-1-hidroxi-2,2,6-trimetilciclohexil]-3-buten-2-ona¹⁶, (-)-loliolida¹⁷, (+)-isololiolida¹⁸, β -D-glucopiranosido tetraacetato del blumenol A¹⁹ y el tetraacetato bizantinosido B²⁰, respectivamente.

⁹ Sanae, K.; Takashi, M.; Masayoshi, N.; Akemi, O. *Phytochemistry*. **2004**, 65, 2781.

¹⁰ González, A. G.; Guillermo, J. A.; Ravelo, A. G.; Jiménez, I. A.; Gupta, M. P. *J. Nat. Prod.* **1994**, 57, 400.

¹¹ D'Abrosca, B.; Dellagrecia, M.; Fiorentino, A.; Monaco, P.; Oriano, P.; Temussi, F. *Phytochemistry*. **2004**, 65, 497.

¹² Dellagrecia, M.; Monaco, P.; Previtiera, L.; Aliotta, G.; PINTO, G. *J. Nat. Prod.* **1990**, 53, 972.

¹³ Galbraith, M. N.; Horn, D. H. S. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1972**, 3, 113.

¹⁴ Macías, F. A.; Oliva, R. M.; Varela, R. M.; Torres, A.; Molinillo, J. M. G. *Phytochemistry*. **1999**, 52, 613.

¹⁵ Hartman, D. A.; Pontones, M. E.; Kloss, V. F.; Curley, R. W. Jr.; Robertson, L. W. *J. Nat. Prod.* **1988**, 51, 947.

¹⁶ Ueno, K.; Yoneyama, H.; Mizutani, M.; Hirai, N.; Todoroki, Y. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, 15, 6311.

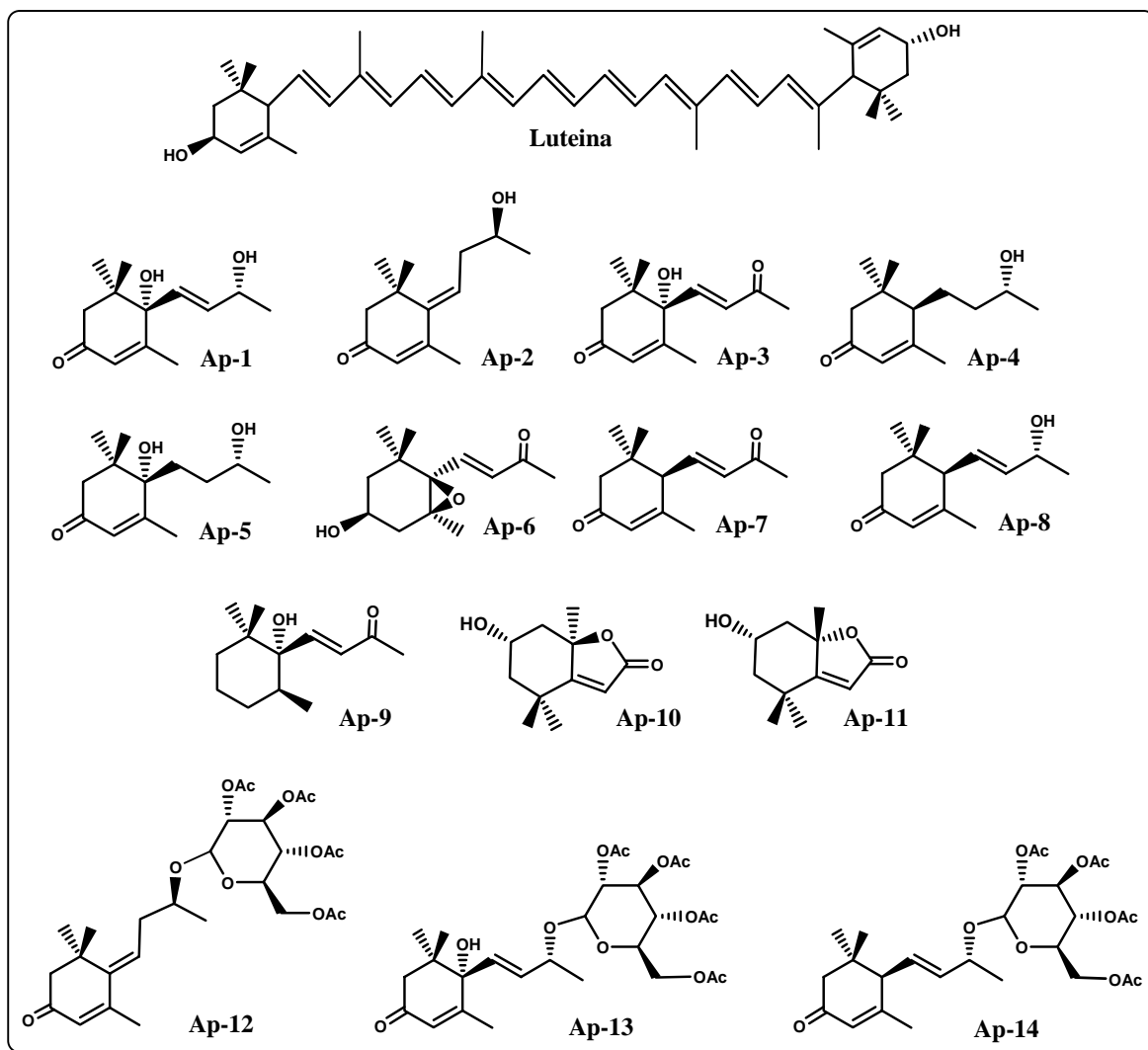
¹⁷ Valdés L. J. *J. nat. prod.* **1986**, 49, 171.

¹⁸ Schmidt, F. J.; Vanderah, D. J.; Hollenbeak, K. H.; Enwall, C. E. L.; Gopichand, Y.; Sengupta, P. K.; Hossain, M. B.; Van Der Helm, D.. *J. Org. Chem.* **1983**, 48, 3941.

¹⁹ Kodama, H.; Fujimori, T.; Kato, K. *Agric. Biol. Chem.* **1981**, 45, 941.

²⁰ Tazaki, H.; Ohta, N.; Nabeta, K.; Okuyama, H.; Okumura, M. *Phytochemistry*. **1993**, 34, 1067.

A continuación se presenta un esquema con todos los carotenoides y apocarotenoides aislados de *W. aristata*.



A continuación pasamos a describir la elucidación estructural del compuesto **Ap-12** aislado de hojas de *W. aristata*.

El compuesto **Ap-12** presentó una fórmula molecular de $C_{28}H_{42}O_{11}$ (m/z 554), determinada mediante espectrometría de masas de alta resolución electrospray. En su espectro de UV se pueden observar bandas de absorción a 230 y 285 nm, características de un sistema enona en la estructura.

Así, en su espectro de RMN de 1H se observaron señales que sugieren la presencia de un sistema β -D-glucopiranosil tetraacetato, que coinciden con los

reportados para otros β -glucopiranosidos²¹. Se observaron también señales para tres metilos a 1.27 δ (Me-11, Me-12) y 2.08 δ (Me-13) como singuletes, un metilo doblete a 1.22 δ (Me-10), cuatro protones metilénicos a 2.36 δ (d, J = 8.1 Hz, H-2) y 2.61 δ (dd, J = 7.0, 13.4 Hz, H-8), un protón metínico como multiplete a 3.88 δ (H-9) y dos protones olefínicos a 5.90 δ (s, H-4) y 6.10 δ (t, J = 6.3 Hz, H-7).

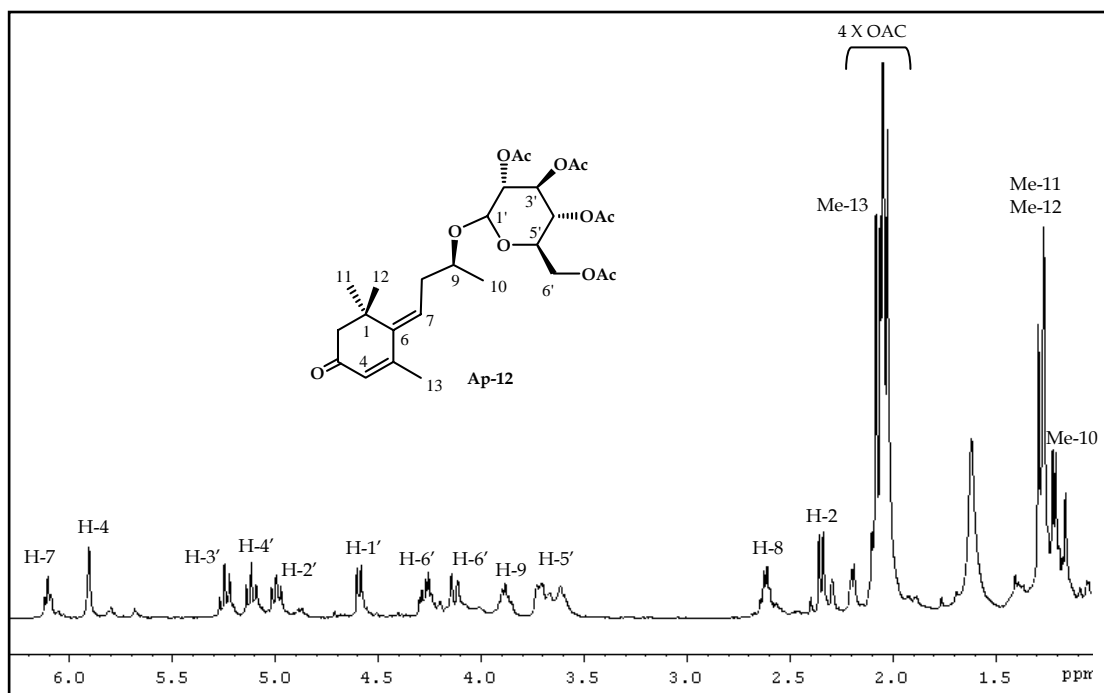


Figura 4.2.3. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de **Ap-12**.

Los experimentos de RMN de ^{13}C y DEPT mostraron señales para trece carbonos incluyendo, cuatro metilos a 19.7 δ (C-10), 28.6 δ (C-11), 28.8 δ (C-12) y 21.9 δ (C-13); dos carbonos metilénicos a 53.5 δ (C-2), 38.0 δ (C-8); un metino alifático a 75.4 δ (C-9); cuatro carbonos olefínicos a 125.2 δ (d, C-4), 142.3 δ (s, C-5), 155.2 δ (s, C-6) y 131.3 δ (d, C-7); un carbono cuaternario a 36.7 δ (d, C-1) y uno carbonílico a 199.1 δ (s, C-3). Estos datos nos llevan a concluir que la aglycona coincide con el compuesto **Ap-2** (9-hidroximegastigma-4,6E-dien-3-ona)¹⁸.

El experimento de RMN de ^{13}C también mostró señales para cinco carbonos metínicos a 99.1 δ (C-1'), 71.1 δ (d, C-2'), 72.6 δ (s, C-3'), 68.4 δ (s, C-4') y 71.5 δ (d, C-5') y uno metilénico a 61.8 δ (C-1'), todos ellos unidos a oxígeno y que corresponden a un sistema β -D-glucopiranosil, así como carbonos singuletes y metilos correspondientes para cuatro grupos acetatos.

²¹ Gueldner, A.; Winterhalter, P. J. *Agri. Food Chem.* **1991**, 39, 2142.

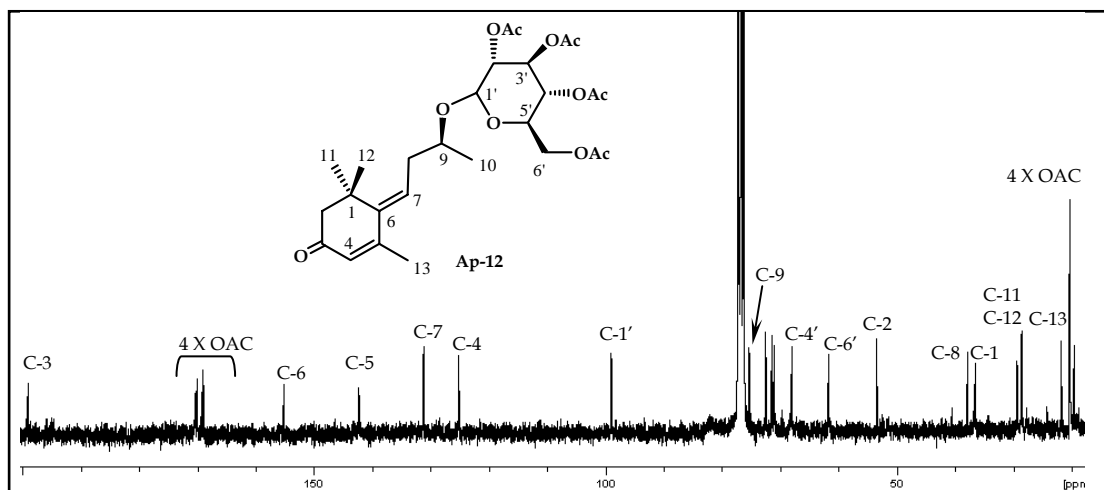


Figura 4.2.4. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) de Ap-12.

El estudio de los experimentos bidimensionales homonucleares (COSY y ROESY) y heteronucleares (HSQC y HMBC) nos permitieron establecer la posición y estereoquímica relativa de los diferentes grupos sobre la molécula. Así, el experimento COSY mostró correlaciones del metino carbinol a δ_{H} 3.88 (H-9) con el metilo doblete a δ_{H} 1.22 (Me-10) y con el protón alifático H-8 a δ_{H} 2.61, y de este último con el protón H-7 a δ_{H} 6.10, así como correlación del protón anomérico H-1' con H-2', del protón H-2'/H-3', H-3'/H-4', H-4'/H-5' y de este último con los protones H-6'. El experimento HMBC mostró como correlaciones más significativas las de H-2/C-1, C-3, C-11, C-12, H-4/C-5, C-13, H-7/C-5, C-6, C-8, C-9, H-9/C-1', C-7 y correlaciones del protón anomérico H-1' con el carbono C-9 (δ_{C} 75.4).

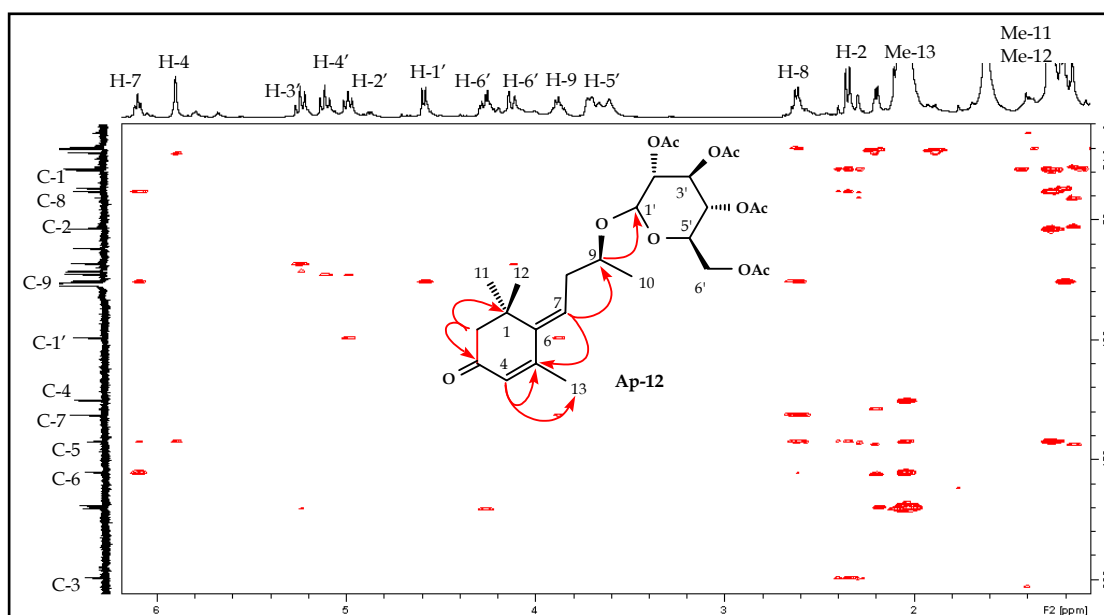
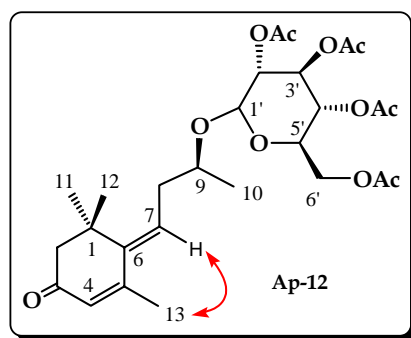


Figura 4.2.5. Experimento HMBC de Ap-12.

La estereoquímica relativa de **AP-12** fue establecida por comparación con los datos existentes en la bibliografía química para este tipo de compuestos y fue confirmada mediante un experimento ROESY. La estereoquímica del doble enlace C6-C7 se estableció como *E* en base al efecto ROE observado entre H-7 y H-13.



Estos datos nos permitieron establecer la estructura del compuesto **Ap-12** como **9-O-β-D-glucopiranosido tetraacetato 9-hidroxi-megastigma-4,6*E*-dien-3-ona**.

Tabla 1. Datos de RMN $^1\text{H}^{\text{a}}$ y $^{13}\text{C}^{\text{b}}$ de AP-12:

Proton	δ_{H}	Carbono	δ_{C}
H-1		C-1	36.7 s
H-2	2.36 d (8.1)	C-2	53.5 t
H-3		C-3	199.1 s
H-4	5.90 s	C-4	125.2 d
H-5		C-5	142.3 s
H-6		C-6	155.2 s
H-7	6.10 t (6.3)	C-7	131.3 d
H-8	2.61 dd (7.0, 13.4)	C-8	38.0 t
H-9	3.88 m	C-9	75.4 d
H-10	1.22 d (6.2)	C-10	19.7 c
H-11	1.27 s*	C-11	28.6 c
H-12	1.27 s*	C-12	28.8 c
H-13	2.08 s*	C-13	21.9 c
H-1'	4.59 d (8.1)	C-1'	99.1 d
H-2'	4.99 dd (8.1, 9.8)	C-2'	71.1 d
H-3'	5.24 t (9.8)	C-3'	72.6 d
H-4'	5.11 t (9.8)	C-4'	68.1 d
H-5'	3.71 m	C-5'	71.5 d
H-6'	4.27 dd (4.6, 12.3)	C-6'	61.8 t
H-6'	4.13 dd (2.2, 12.3)		
OAc	2.08 s*	OAc	170.4 s, 20.5 c*
OAc	2.06 s	OAc	170.1 s, 20.5 c*
OAc	2.05 s	OAc	169.2 s, 20.4 c*
OAc	2.03 s	OAc	169.0 s, 20.4 c*

^a CDCl_3 , 400 MHz. *J* entre paréntesis en Hz, * Señales solapadas.

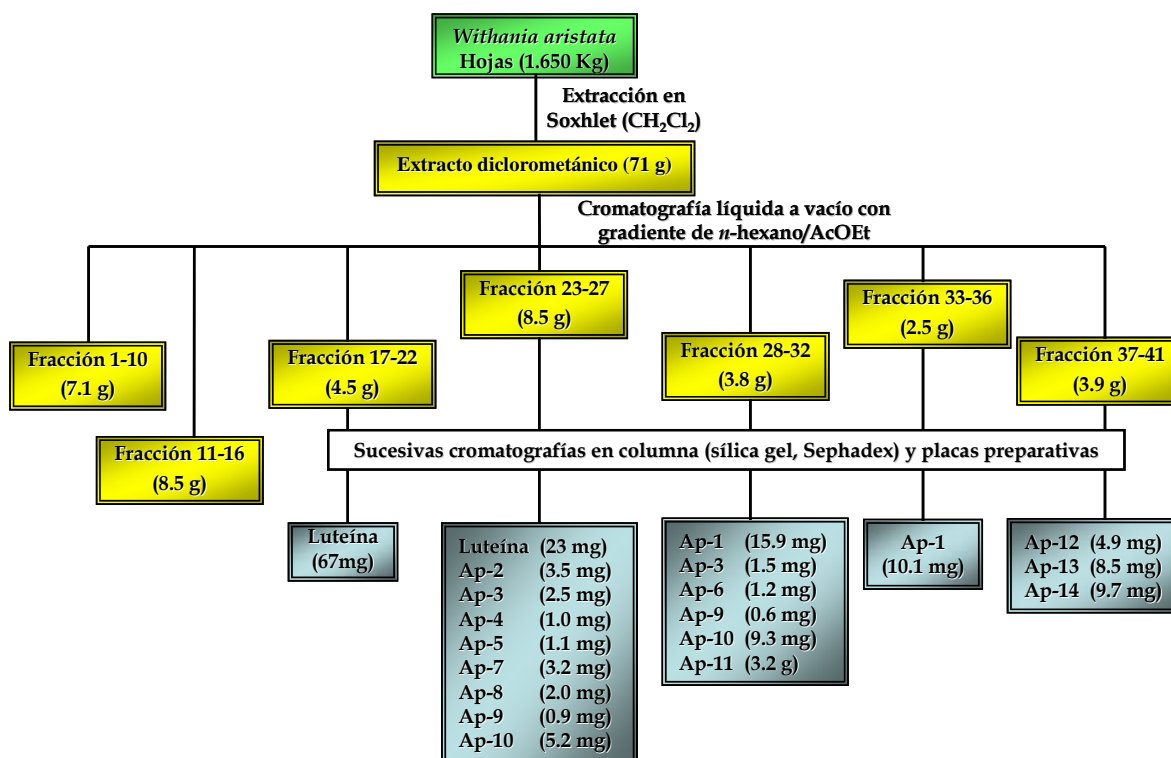
^bDatos basados en experimentos DEPT, HSQC y HMBC.

4.2.3. Parte experimental

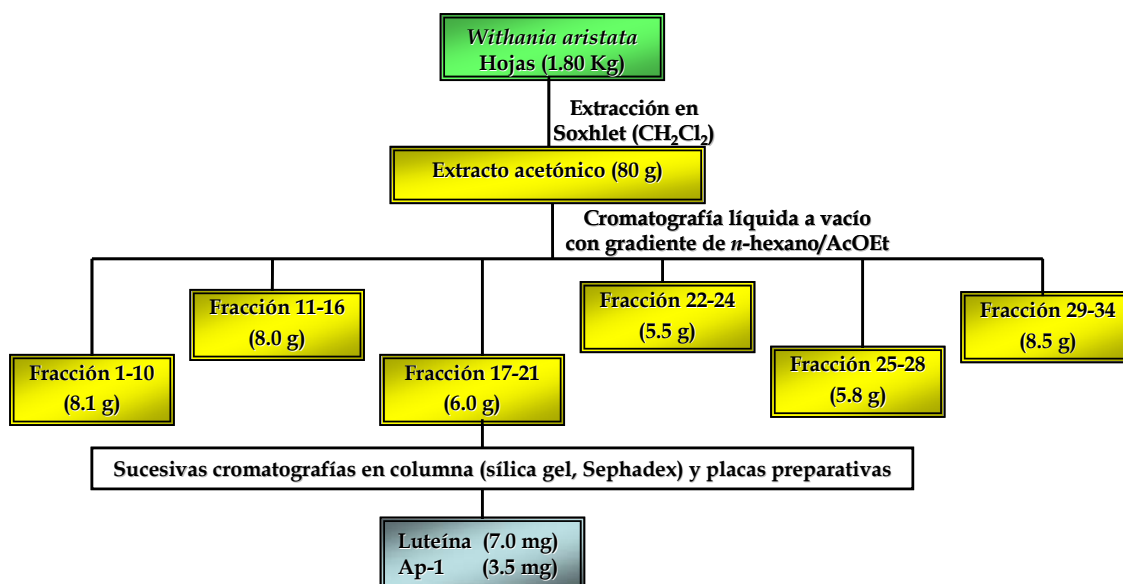
4.2.3.1. Separación cromatográfica de los carotenoides y apocarotenoides de las hojas de *W. aristata*

Sucesivas cromatografías del extracto de diclorometano y del extracto en acetona de las hojas de *Withania aristata*, dio lugar al aislamiento de un carotenoide (**luteína**) y catorce apocarotenoides (**Ap-1 a Ap-14**).

Estos metabolitos se obtuvieron de las fracciones de la primera columna a vacío en gel de sílice que se realizó a cada extracto, tal como se detalla en los siguientes esquemas, resultando el metabolito **Ap-12** (aislado de la reunión de las fracciones 33-41, que fue previamente acetilada, del extracto de diclorometano de la hojas) nuevo en la bibliografía química.



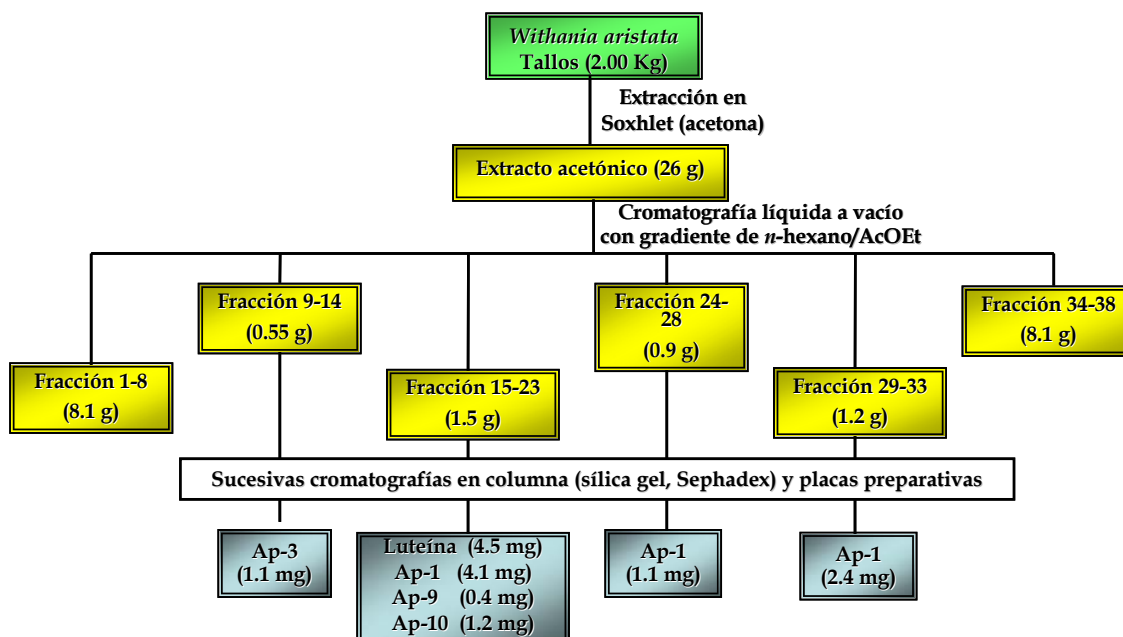
Esquema: Purificación de los carotenoides y apocatenoides del extracto de diclorometano de hojas de *W. aristata*.



Esquema: Purificación de los carotenoides y apocarotenoides del extracto de acetona de hojas de *W. aristata*.

4.2.3.2. Separación cromatográfica de los carotenoides y apocarotenoides de los tallos de *W. aristata*

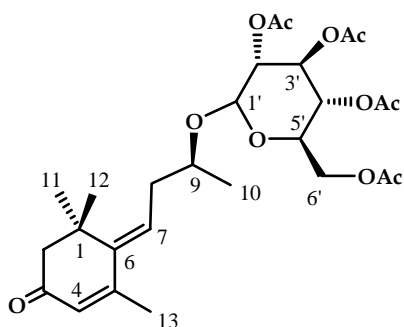
Cromatografía del extracto de acetona de los tallos de *W. aristata*, dio lugar al aislamiento de **luteína** y cuatro apocarotenoides (**Ap-1**, **Ap-3**, **Ap-9** y **Ap-10**). Estos metabolitos se obtuvieron de las fracciones de la primera columna a vacío en gel de sílice que se realizó a dicho extracto, tal como se detalla en el siguiente esquema.



Esquema: Purificación de los carotenoides y apocarotenoides del extracto de acetona de tallos de *W. aristata*.

La acetilación de la reunión las fracciones 33-41 de la cromatografía general del extracto de diclorometano de las hojas de *W. aristata*, rindió tres apocarotenoides glicosilados **Ap-12** a **Ap-14**, resultando nuevo en la bibliografía química el compuesto **Ap-12**, cuyos datos pasamos a describir a continuación.

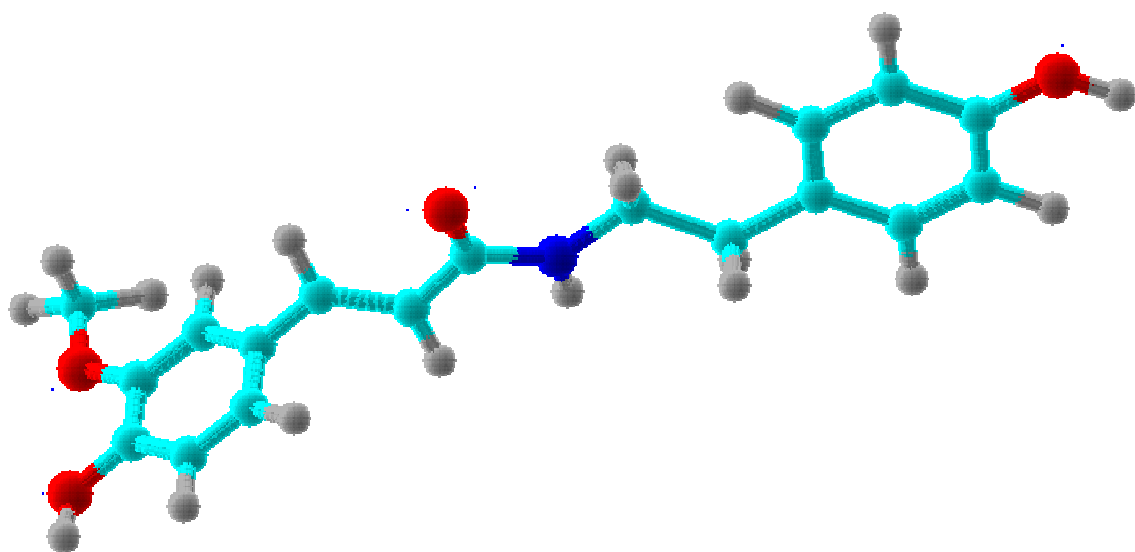
4.2.3.3. Datos espectroscópicos y espectrométricos del apocarotenoide AP-12



9-O-β-D-Glucopiranosido tetraacetato 9-hidroxi-megastigma-4,6E-dien-3-ona

Se obtuvo como un sólido amorfo (3.2 mg).

[α]_D²⁰	- 10.0 (c 0.13, CHCl ₃).
UV (EtOH) λ_{max} (log ε)	230 (4.0), 285 (4.2) nm.
IR ν_{max}	3449, 2925, 1754, 1662, 1373, 1226, 1039 cm ⁻¹ .
RMN ¹H (δ, CDCl₃)	6.10 (1H, t, J= 6.3 Hz, H7); 5.90 (1H, s, H4); 5.24 (1H, t, J= 9.8 Hz, H3'); 5.11 (1H, t, J= 9.8 Hz, H4'); 4.99 (1H, dd, J= 8.1, 9.8 Hz, H2'); 4.59 (1H, d, J= 8.1 Hz, H1'); 4.27 (1H, dd, J= 4.6, 12.3 Hz, H6'); 4.13 (1H, dd, J= 2.2, 12.3 Hz, H6'); 3.88 (1H, m, H9); 3.71 (1H, m, H5'); 2.61 (2H, dd, J= 7.0, 13.4 Hz, H8); 2.36 (2H, d, J= 8.1 Hz, H2); 2.08 (3H, s, Me13); 4 x [2.03-2.08 (12H, s, AcO)]; 2 x [1.27 (6H, s, Me11, Me12)]; 1.22 (3H, d, J= 6.2 Hz, Me10).
RMN ¹³C (δ, CDCl₃)	199.1 (s, C3); 170.4 (s, AcO); 170.1 (s, AcO); 169.2 (s, AcO); 169.0 (s, AcO); 155.2 (s, C6); 142.3 (s, C5); 131.3 (d, C7); 125.2 (d, C4); 99.1 (d, C1'); 75.4 (d, C9); 72.6 (d, C3'); 71.5 (d, C5'); 71.1 (d, C2'); 68.1 (d, C4'); 61.8 (t, C6'); 53.5 (t, C2); 38.0 (t, C8); 36.7 (s, C1); 28.8 (c, Me12); 28.6 (c, Me11); 21.9 (c, Me13); 2 x 20.5 (c, AcO); 2 x 20.4 (c, AcO); 19.7 (c, Me10).
ESIMS m/z (%)	577 [M+Na] ⁺ (100).
ESI/MS-AR m/z	Calculado para C ₂₈ H ₄₂ O ₁₁ Na [M+Na] ⁺ , 577.27271; observado, 577.27306.



4.3. Amidas y aminas

4.3.1. Introducción

Los alcaloides poseen una diversidad estructural y exhiben una gama de actividades biológicas como ningún otro grupo de productos naturales. Aunque muchos de los alcaloides clásicos fueron aislados y caracterizados hace muchas décadas, se siguen extrayendo y aislando continuamente nuevos compuestos de esta naturaleza. Se encuentran sobre todo en las plantas, aunque también se han aislado en menor extensión de microorganismos y animales.

De los miles de alcaloides conocidos la mayoría están presentes en las plantas, se calcula que el 40% de todas las familias de plantas tienen al menos una especie que contiene alcaloides, siendo importante su contenido en las leguminosas y las solanáceas, pero poco frecuentes en las gimnospermas, los helechos y las monocotiledoneas¹. Los alcaloides pueden estar presentes en toda la planta o restringidos a ciertos tejidos, como la raíz o la corteza y su concentración puede variar entre el 0.1 y el 12% del peso seco. Los alcaloides se acumulan, principalmente, en los tejidos de gran actividad (crecimiento), almacenándose frecuentemente en lugares distintos al de su biosíntesis. Cada especie adapta el sistema de biosíntesis a sus necesidades, dinámica que se manifiesta en las oscilaciones en el contenido de alcaloides a lo largo del día, siendo un buen ejemplo de ello las variaciones en la cantidad de morfina del látex de las cápsulas jóvenes de "la adormidera (*Papaver somniferum*)", que por la mañana es mayor que en el resto del día. En cuanto a la función de los alcaloides en la planta, se cree que sirven de protección frente a herbívoros y al mismo tiempo como almacén de reserva de nitrógeno.

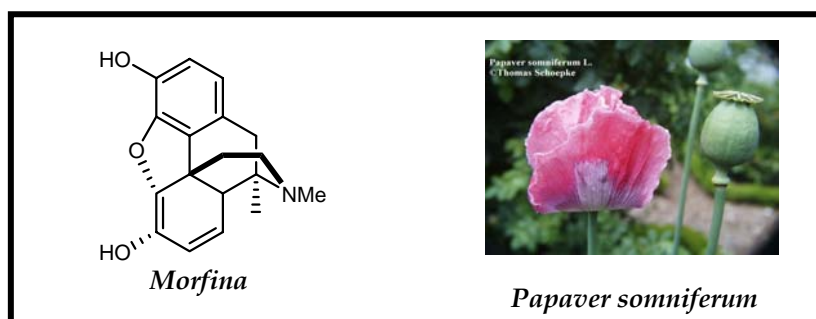


Figura 4.3.1. Principio activo de *Papaver somniferum*

¹ Samuelsson, G. *Drugs of Natural Origin*. 1999, Swedish Pharmaceutical Press, Stockholm, Sweden, 415-417.

Desde el descubrimiento de la morfina de *Papaver somniferum* hace casi dos siglos, los alcaloides han sido uno de los metabolitos secundarios más estudiados en plantas, ya que poseen un gran potencial como productos farmacéuticos por sus propiedades fisiológicas. Hoy en día se conocen alrededor de quince mil estructuras y como promedio se describe en la bibliografía un nuevo alcaloide cada día².

Los alcaloides son compuestos nitrogenados, con uno o más átomos de nitrógeno, que pueden estar presentes como aminas primarias, secundarias o terciarias. Se clasifican de acuerdo a la naturaleza del tipo de heterociclo de nitrógeno presente en su estructura, como por ejemplo los derivados de pirrolidina, piperidina, quinolina, isoquinolina, indol, etc, mientras que a medida que aumenta su complejidad, se incrementa el número de subdivisiones. El átomo de nitrógeno del aminoácido del cual proviene se mantiene intacto en la estructura del alcaloide, mientras que el carbono carboxílico frecuentemente se pierde por descarboxilación.

Los alcaloides también se pueden clasificar en función del aminoácido del que derivan. Así, de especies de la familia Solanaceae se han aislado alcaloides de cinco grupos derivados del aminoácido **ornitina**:

1. Alcaloides pirrolidínicos simples.

No existe mucha información a cerca del aislamiento de este tipo de alcaloides de solanáceas. De la raíz de *Nicandra physalodes* y *Datura discolor* se han aislado varios alcaloides pirrolidínicos simples, como por ejemplo la higrina y cuscohigrina, alcaloides mayoritarios. Así mismo, de la raíz de *Withania somnifera* se aislaron, en los años 60, varios compuestos de este tipo, destacando la withasomnina que mostró actividad analgésica, anestésica y espasmolítica³.

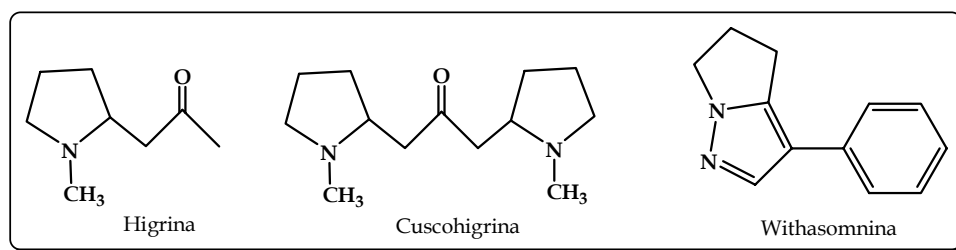


Figura 4.3.2. Alcaloides pirrolidínicos simples aislados de especies de Solanaceae

² Oksman-Caldentey, Kirsi-Marja. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2007, 8, 203.

³ Hueller, H.; Peters, R.; Scheler, W.; Schmidt, D.; Stremmel, D. *Pharmazie*, 1971, 26, 361.

2. Alcaloides *N*-acetilpirrolidinas.

Extractos de la planta *Chamaesaracha conioides*, que crece en Texas, mostraron actividad citotóxica y un fraccionamiento bioguiado llevó al aislamiento y elucidación estructural de dos *N*-*n*-decanoilhigrolinas, conioidinas A y B, que presentaron una potente actividad citotóxica⁴.

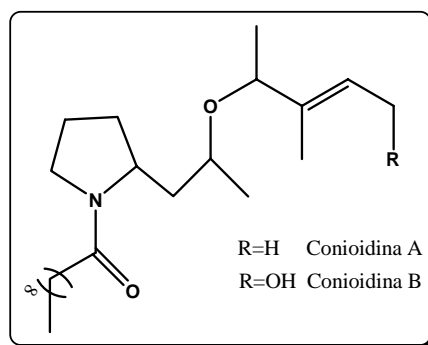


Figura 4.3.3. *N*-*n*-decanoilhigrolinas con potente actividad citotóxica

3. Alcaloides pirrolidínicos tipo nicotinoide.

Nicotiana tabacum es la especie más usada para la producción de tabaco y por ello una de las plantas más estudiadas y examinadas, tanto por sus componentes químicos como por sus efectos biológicos. Sin embargo, este tipo de alcaloides no han sido aislados sólo del género *Nicotiana*, sino que también se han aislado en pequeñas cantidades de otros géneros de esta familia, como por ejemplo *Duboisia*, *Cyphanthera*, *Petunia*, *Solanum* o *Datura*.

El principal alcaloide del tabaco y que da nombre a este grupo es la nicotina, aislada por primera vez por Posselt y Raimann en 1828 y cuya elucidación estructural no se completó hasta finales del siglo XIX. La nicotina es un potente veneno para los animales, se sabe que aproximadamente 60 mg de este alcaloide son la dosis suficiente para matar a una persona, cantidad que equivale a la que hay en cinco cigarrillos, cantidad que disminuye al fumar debido a que el alcaloide se descompone por pirólisis⁵. La nicotina también es usada de forma terapéutica para el síndrome de abstinencia en fumadores, como antagonista de receptores corticales en el tratamiento del síndrome de Tourette, que se caracteriza por producir tics persistentes tanto motores como sonoros, como

⁴ Chan, G. W.; Berry, D.; DeBrosse, C. W.; Hemling, M. E.; MacKenzie-LoCasto, L.; Offen, P. H.; Westley, J. *W. J. Nat. Prod.*, **1993**, 56, 708.

⁵ Neuwinger, H. D. **1998**. Alkaloids in arrow poisons. In: Roberts M.F.; Wink, M. (eds.) *Alkaloids biochemistry, ecology, and medicinal applications*. Plenum press, Nueva York, pp 45-84.

agente neuroprotector en enfermedades como el Parkinson o el Alzheimer y para el tratamiento de la colitis ulcerosa. Así mismo, son muchas las referencias que indican que la nicotina presenta una potente actividad alelopática e insecticida. Pero no todo son ventajas, ya que por otra parte, la nicotina estimula la angiogénesis y promueve el crecimiento tumoral y la arterioesclerosis⁶.

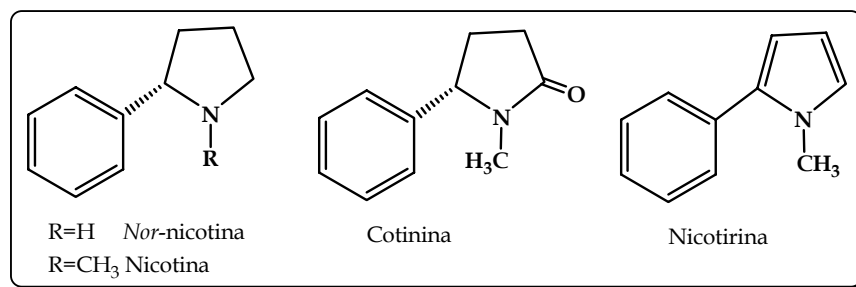


Figura 4.3.4. Alcaloides pirrolidínicos tipo nicotinoide

4. Alcaloides tropánicos.

Los alcaloides tropánicos constituyen el grupo de metabolitos secundarios más característico de la familia Solanaceae, encontrándose alcaloides de este tipo en las subfamilias Schizanthoideae, Solanoideae y Nicotianoideae, siendo especialmente abundantes en los géneros *Datura*, *Brugmansia*, *Hyoscyamus*, *Atropa*, *Scopolia*, *Anisodus*, *Przewalskia*, *Atropanthe*, *Physochlaina*, *Mandragora*, *Anthotroche*, *Cyphantera* y *Duboisia*⁷.

El uso de plantas de la familia Solanáceas como medicinales, alucinógenas o venenosas y con alcaloides tropánicos se remonta a la antigüedad, ya en 1800 aC en el Papiro Ebers se recogían notas sobre el uso de *Atropa belladonna*. La hiosciamina y su racemato, atropina, fueron aislados y estructuralmente caracterizados por primera vez en 1833, mientras que la escopolamina se identificó casi 60 años después. La producción comercial de alcaloides tipo tropano se realiza a partir del aislamiento de estos del material vegetal cultivado, ya que la síntesis química ha demostrado no ser rentable económicamente. Las plantas cultivadas incluyen los géneros *Duboisia* (*Duboisia myoporoides*, *D. leichhardtii* y sus híbridos), *Datura* (*Datura stramonium* y *D. metel*), *Hyoscyamus* (*Hyoscyamus niger* y *H. muticus*) y *Atropa* (*Atropa belladonna*) y otras especies con

⁶ Heeschen, C.; Jang, J. J.; Weis, M.; Pathak, A.; Kaji, S.; Hu, R. S.; Tsao, P.S.; Jonhson, F. L.; Cooke, J. P. *Nature med.* **2001**, 7, 833.

⁷ Wink, M. *Phytochemistry.* **2003**, 64, 3.

menos frecuencia, como son *Scopolia carniolica*, *Mandragora officinarum*, *Brugmansia candida*. Así, la hiosciamina suele ser el principal alcaloide en la mayoría de las especies, mientras que la escopolamina es el principal alcaloide en *Duboisia*². La atropina, la escopolamina y la hiosciamina afectan al sistema nervioso parasimpático, inhibiendo competitivamente los receptores muscarínicos de la acetilcolina y actúan como antagonistas muscarínicos no-selectivos, produciendo efectos periféricos antimuscarínicos, sedantes, antieméticos y amnésicos⁸.

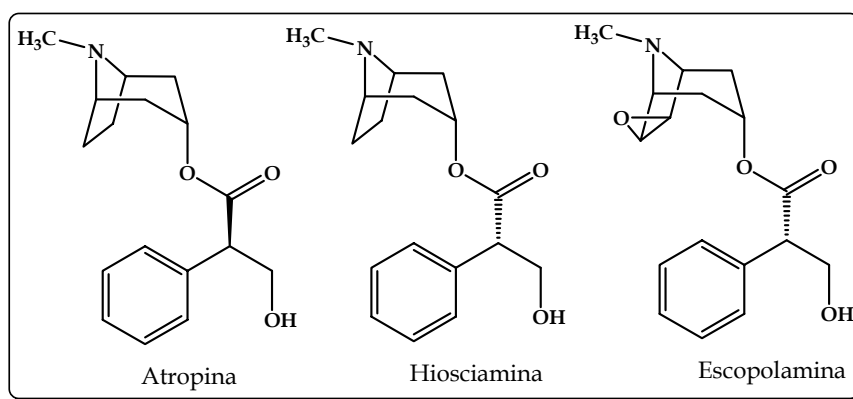


Figura 4.3.5. Alcaloides tropánicos aislados de especies de Solanáceas

5. Calisteginas.

Estos compuestos se caracterizan por ser polihidroxi-alcaloides, en realidad son monosacáridos en los cuales el átomo de oxígeno del anillo de azúcar ha sido reemplazado por un átomo de nitrógeno. Su interés terapéutico ha aumentado en los últimos años al demostrarse que tienen potente actividad antiviral, anticancerígena y para el tratamiento de la diabetes. Se han aislado alcaloides de este tipo en unos trece géneros y unas treinta y una especies de la familia Solanaceae, incluyendo especies del género *Datura*, *Capsicum*, *Cestrum*, *Nicotiana* y *Withania*, pero son *Solanum* y *Capsicum* los que aportan un mayor número de estos metabolitos. Los compuestos más frecuentes en la familia solanácea son las calisteginas A₃, B₁ y B₂ y pueden aparecer en cualquier parte de la planta, de hecho, se han aislado calisteginas de setenta variedades de papa (*Solanum*) y de *Withania frutescens* y *W. somnifera* se han aislado las calisteginas⁹ A₃, B₁, B₂, B₃ y C₁.

⁸ De Simone, R.; Margarucci, L.; De Feo, V. *Pharmacologyonline*, 2008, 1, 70.

⁹ Bekkouche, K.; Daali, Y.; Cherkaoui, S.; Veuthey, J.L.; Christen, P. *Phytochem.* 2001, 58, 455.

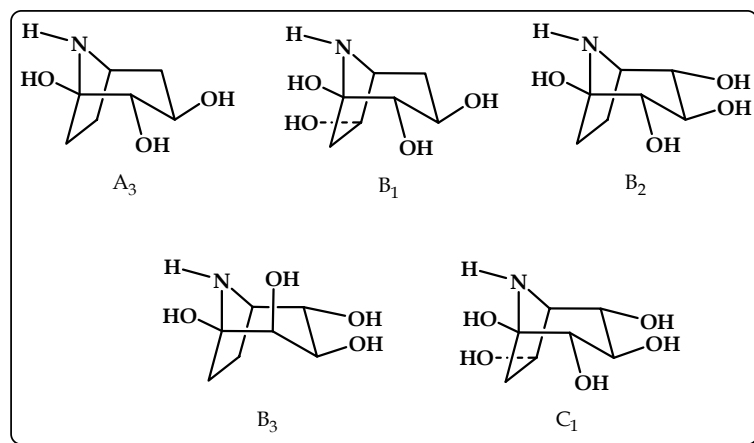


Figura 4.3.6. Calisteginas aisladas del género *Withania*

Alcaloides derivados del aminoácido **triptófano**:

1. β -Carbolinas

La primera referencia de alcaloides de este tipo en la familia Solanaceae data de 1978, cuando se aisló 1-acetil-3-carbometoxi- β -carbolina como constituyente de las hojas de *Vestia foetida*, posteriormente, se aislaron también licoperodina-1 como constituyente del tomate (*Solanum lycopersicum*), al cual debe su nombre.¹⁰ Dos alcaloides tetracíclicos de este tipo fueron aislados de *Datura stramonium* y debido a sus propiedades fluorescentes y al género fueron llamados fluorodaturatina y homofluorodaturatina.

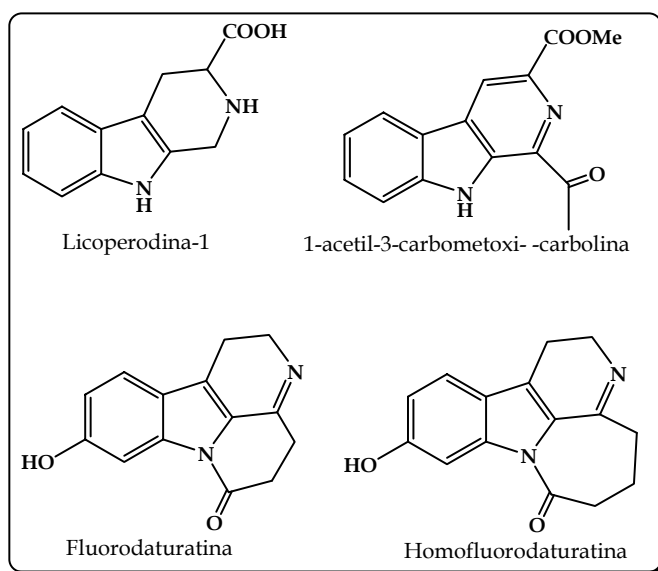


Figura 4.3.7. β -Carbolinas aisladas de Solanaceae

¹⁰ Yahara, S.; Uda, N.; Yoshio, E.; Yae, E. *J. Nat. Prod.* **2004**, 67, 500.

Alcaloides derivados del aminoácido **fenilalanina**:

1. Capsaicinoides

Este tipo de metabolitos aparecen únicamente en el género *Capsicum*, siendo los metabolitos principales en los frutos de las especies de este género. Se han aislado unos veinticinco compuestos de este tipo, siendo la capsaicina el alcaloide mayoritario y al que se le atribuye el sabor picante de la pimienta. Estudios recientes han revelado que los capsaicinoides muestran un potente efecto antiproliferativo en diferentes células de cáncer de próstata y que pueden ser usados como preventivos de cáncer de colon en humanos. También existen muchas patentes de su uso como insecticidas, pesticidas y repelentes de insectos.

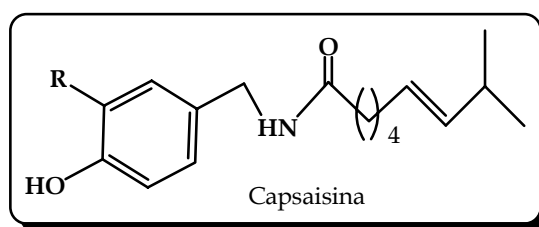


Figura 4.3.8. La capsaicina es el alcaloide responsable del sabor picante de las especies del género *Capsicum*

2. Amidas derivadas del ácido hidroxicinámico.

Las amidas del ácido hidroxicinámico, tales como la putrescina, tiramina y espermidina fueron identificadas como los componentes fenólicos mayoritarios en los órganos reproductivos de las especies *Solanum lycopersicum*, *Nicotiana tabacum* y *Petunia X hibrida*, lo que sugiere que estos compuestos juegan un papel fisiológico fundamental en la floración; además, se ha comprobado la acumulación de este tipo de compuestos en *N. tabacum* en el tiempo de floración de la planta. Estas amidas poseen propiedades antivirales.

3. N-Aciltiraminas

Se ha aislado *N*-trans-feruloiltiramina, *N*-trans-*p*-coumaroiltiramina y *N*-trans-*p*-coumaroiloctopamina de la raíz de *Solanum melonguera*, compuestos que también fueron aislados de la raíz de *Cápsicum annuum*. Se cree que estos compuestos tienen función de respuesta química frente al ataque de insectos.

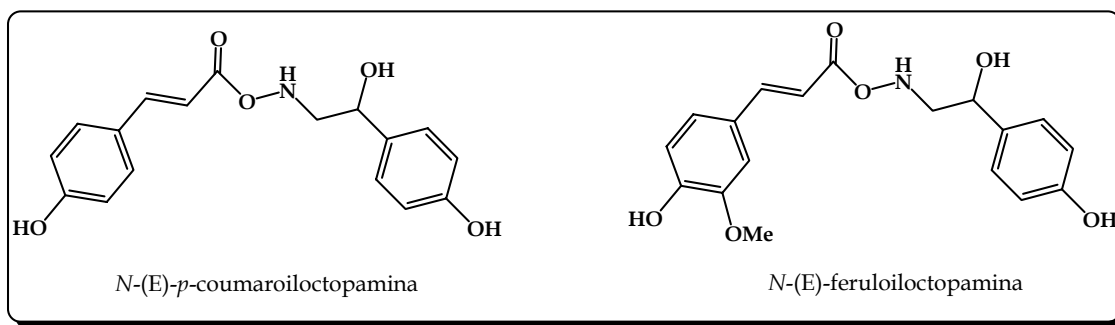


Figura 4.3.9. *N*-Aciltiraminas aisladas de géneros *Solanum* y *Capsicum*

También se han aislado amidas del ácido hidroxicinámico conjugadas con putrescina y espermidina de un gran número de especies de solanáceas, compuestos que presentan actividad como hipotensores.

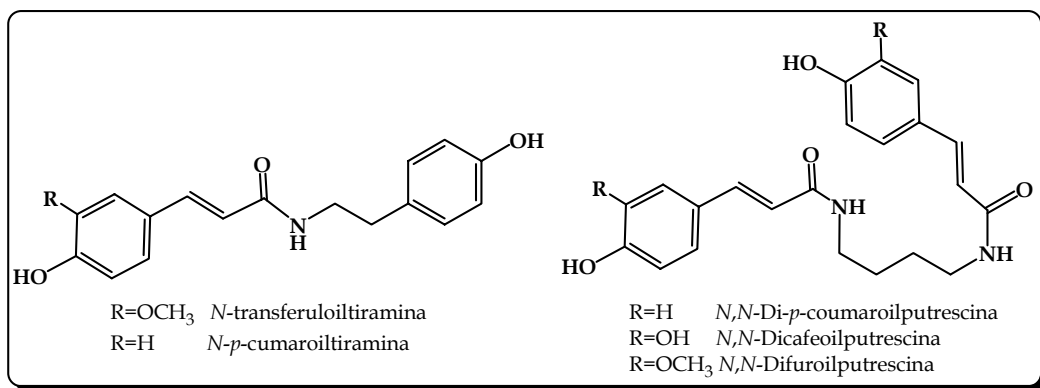


Figura 4.3.10. Amidas del ácido hidroxicinámico conjugadas con putrescina y espermidina

4.3.2. Resultados y discusión

Siguiendo los objetivos propuestos de aislamiento y elucidación estructural de los metabolitos secundarios de hojas y tallos de *Withania aristata* y tras repetidas cromatografías, se aislaron trece alcaloides, siendo dos de éstos, nuevos en la bibliografía química. Estos compuestos los hemos agrupado de la siguiente forma:

➤ **Amidas fenólicas**, que hemos denominado de **AM-1** a **AM-6**, resultaron ser conocidas en la bibliografía química, siendo **AM-4** descrita por primera vez como natural. Estos compuestos fueron identificados como: *N-trans*-feruloil-tiramina (**AM-1**)¹¹, *N-cis*-feruloil-tiramina (**AM-2**)¹², *N-p*-cumaroil-tiramina (**AM-3**)¹³, *N-trans*-feruloil-metoxitiramina (**AM-4**)¹⁴, *N-trans*-feruloil-octopamina (**AM-5**)¹¹ y *cis-N-p*-cumaroil-tiramina (**AM-6**)¹⁵. Cabe destacar que es la primera vez que se describen compuestos de este tipo de una especie del género *Withania*.

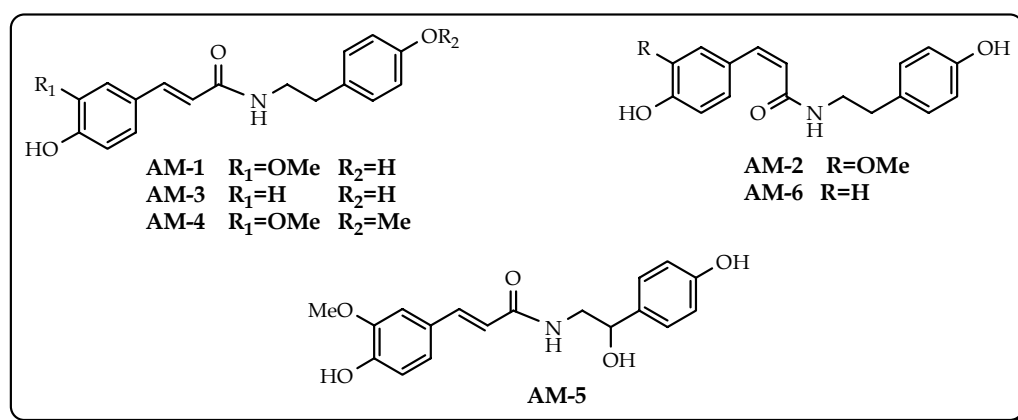


Figura 4.3.11. Amidas fenólicas aisladas de *W. aristata*

➤ **Aminas aromáticas**, que hemos denominado de **AM-7** a **AM-13**, de las cuales dos resultaron nuevas en la bibliografía química (**AM-11** y **AM-12**). El resto fueron identificados, como: *p*-tiramina (**AM-7**)¹⁶, 4-*O*-metildopamina (**AM-8**)¹⁷, 3-metoxitiramina (**AM-9**)¹⁶, 3,4-

¹¹ Yoshihara, T.; Takamatsu, S.; Sakamura, S. *Agric. Biol. Chem.* **1978**, *42*, 623.

¹² Yoshihara, T.; Yamaguchi, K.; Takamatsu, S.; Sakamura, S. *Agric. Biol. Chem.* **1981**, *45*, 2593.

¹³ Slatkin, D.J.; Doorenbos, N.J.; Harris, L.S.; Masoud, A.N.; Quimby, M.W.; Schiff, P.L., Jr. *J. Pharm. Sci.* **1971**, *60*, 1891.

¹⁴ Nesterenko, V.; Putt, K.S.; Hergenrother, P.J. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14672.

¹⁵ Goda, Y.; Shibuya, M.; Sankawa, U. *Chem. Pharm. Bull.* **1987**, *35* (7), 2668.

¹⁶ Wheaton, T.A.; Stewart, I. *Lloydia.* **1970**, *33*, 244.

dimetoxi-epinefrina (**AM-10**)¹⁸ y ácido nicotínico (**AM-13**)¹⁹, siendo todas ellas aisladas por primera vez del género *Withania*.

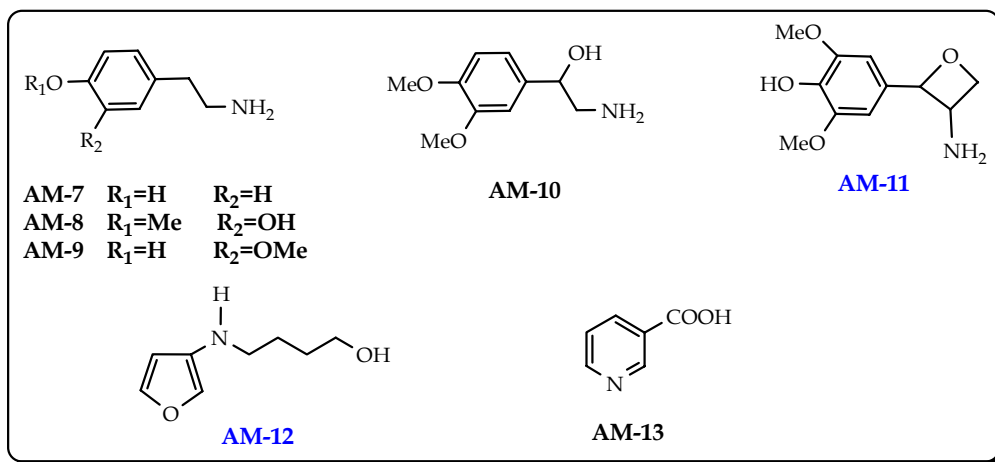


Figura 4.3.12. Aminas aromáticas aisladas de *W. aristata*. En azul se muestran las aminas que resultaron nuevas en la bibliografía química.

A continuación pasamos a discutir la elucidación estructural de las amidas aisladas de *Withania aristata* que no habían sido descritas anteriormente.

Amina AM-11

El compuesto que hemos denominado **AM-11** presentó una fórmula molecular de $C_{11}H_{15}NO_4$, determinada mediante espectrometría de masas de alta resolución, que indica cinco grados de insaturación en la molécula. En su espectro de IR se observaron bandas de absorción a 3475 cm^{-1} que indica la presencia de grupos hidroxilos.

¹⁷ Bruhn, J.G.; Lundstrom, J. *Lloydia*. **1976**, 39, 197.

¹⁸ Daly, J.W.; Creveling, C.R.; Witkop, B. *J. Med. Chem.* **1966**, 9, 273.

¹⁹ Schreiber, K.; Sembdner, G. *Planta Med.* **1960**, 8, 107.

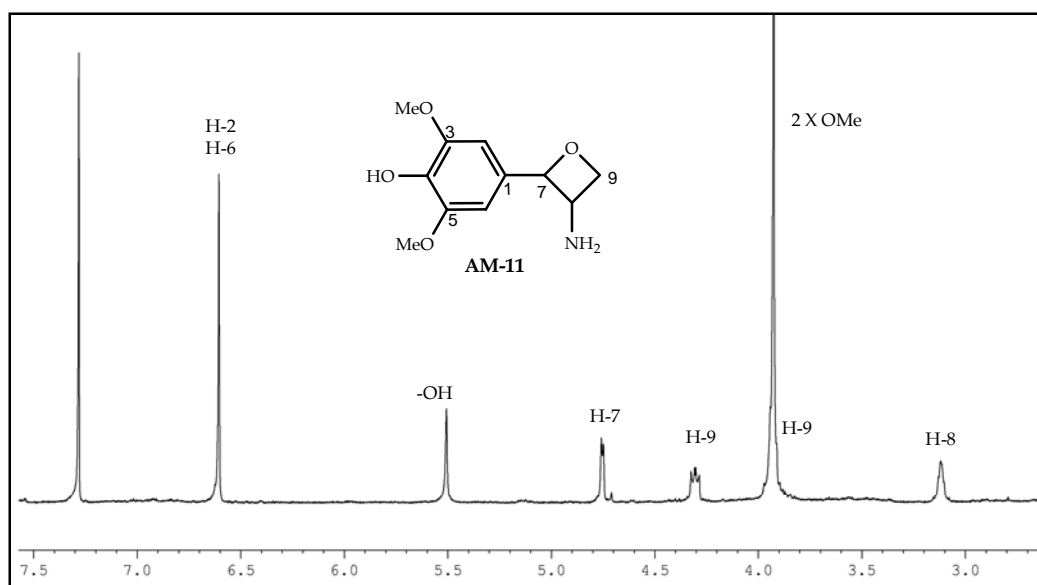


Figura 4.3.13. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de AM-11.

En su espectro de RMN de ^1H se observaron cuatro protones metínicos, dos de ellos aromáticos a $6.61 \delta_{\text{H}}$ (s, H-2 y H-6), uno sobre carbono unido a oxígeno a $4.75 \delta_{\text{H}}$ (d, $J = 4.2$ Hz, H-7) y otro sobre carbono unido a nitrógeno a $3.12 \delta_{\text{H}}$ (sa, H-8). Así mismo, se observaron señales correspondientes a un metileno unido a oxígeno a $3.93 \delta_{\text{H}}$ (m, H-9) y $4.31 \delta_{\text{H}}$ (dd, $J = 7.1, 9.4$ Hz, H-9) y dos metoxilos a $3.93 \delta_{\text{H}}$ (6H, s).

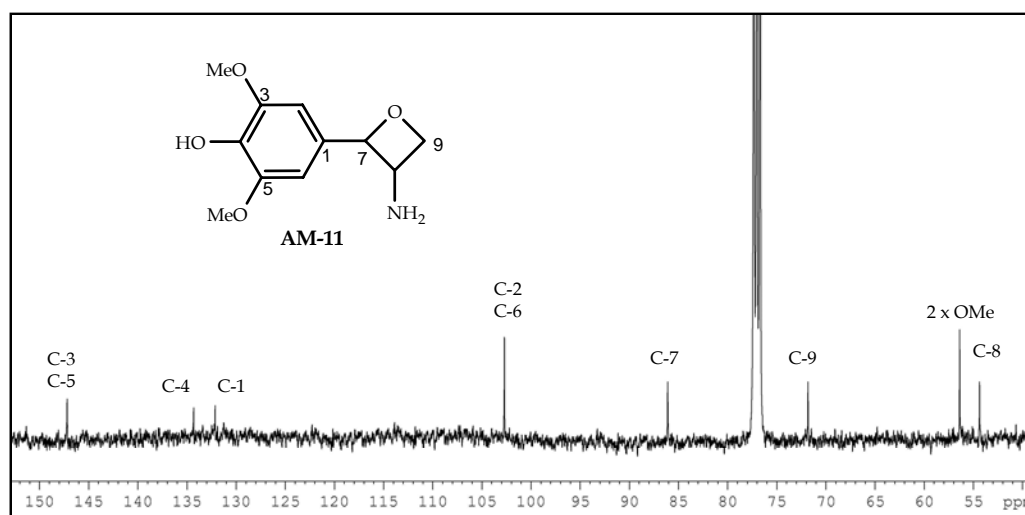


Figura 4.3.14. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) de AM-11.

Datos que fueron confirmados mediante RMN ^{13}C y experimentos DEPT 90 y 135, donde se observaron señales correspondientes para once carbonos, distribuidos de la siguiente forma: dos carbonos de metilos unidos a oxígeno a $56.4 \delta_{\text{C}}$ (2 x OMe), un carbono secundario a $71.8 \delta_{\text{C}}$ (C-9), cuatro carbonos terciarios a $54.4 \delta_{\text{C}}$ (C-8), $86.1 \delta_{\text{C}}$ (C-7) y $102.7 \delta_{\text{C}}$ (C-2, C-6) y cuatro carbonos cuaternarios aromáticos a $132.2 \delta_{\text{C}}$ (C-1), $134.3 \delta_{\text{C}}$ (C-4) y $147.2 \delta_{\text{C}}$ (C-3, C-5).

El conjunto de estos datos, junto con el estudio de los experimentos COSY, ROESY, HMBC y HSQC, nos permitió establecer la estructura de nuestro producto **AM-11**. Así, en el experimento ^1H - ^1H COSY se observó acoplamiento del protón H-7 con H-8 y de este último con los protones H-9. La localización de los distintos grupos funcionales en la molécula se determinó a partir de las correlaciones a larga distancia observadas en un experimento HMBC: H-7/C-2, C-6, C-8, C-9; H-2 y H-6/C-3, C-4, C-5, C-7; OMe/C-3, C-5; así como correlación del hidroxilo aromático con los carbonos C-3, C-4 y C-5. Ello permitió establecer la estructura de **AM-11** como **2-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-3-oxetanamina**.

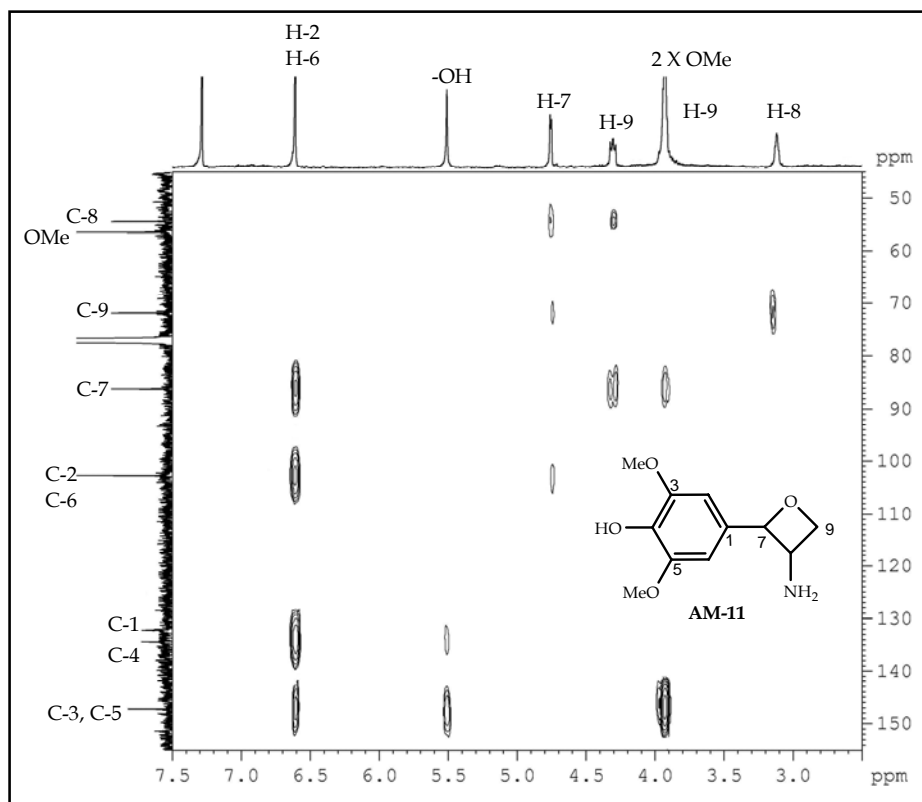


Figura 4.3.15. Experimento HMBC de AM-11.

Amina AM-12

El compuesto que hemos denominado **AM-12** presentó una fórmula molecular de $C_8H_{13}NO_2$, determinada mediante espectrometría de masas de alta resolución, que indica la presencia de tres grados de insaturación en la molécula. En su espectro de IR se observó una banda de absorción a 3344 cm^{-1} , que indica la presencia de grupos hidroxilos.

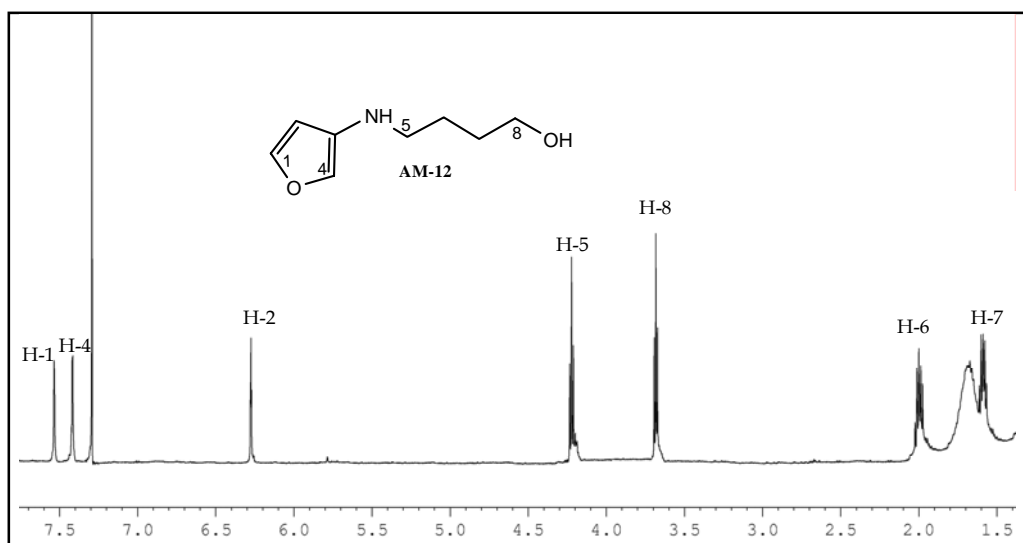


Figura 4.3.16. Espectro de RMN 1H ($CDCl_3$, 400 MHz) de **AM-12**.

Así, en su espectro de RMN de 1H se observaron tres protones metínicos aromáticos a δ 6.26 (s, H-2), δ 7.41 (s, H-4) y δ 7.52 (s, H-1), señales correspondientes a ocho protones metilénicos, dos unidos a nitrógeno a δ 4.21 (2H, t, $J=6.9$ Hz, H-5), otros dos unidos a oxígeno a δ 3.68 (2H, t, $J=6.0$ Hz, H-8) y cuatro alifáticos a δ 1.58 (2H, m, H-7) y δ 1.99 (2H, m, H-6).

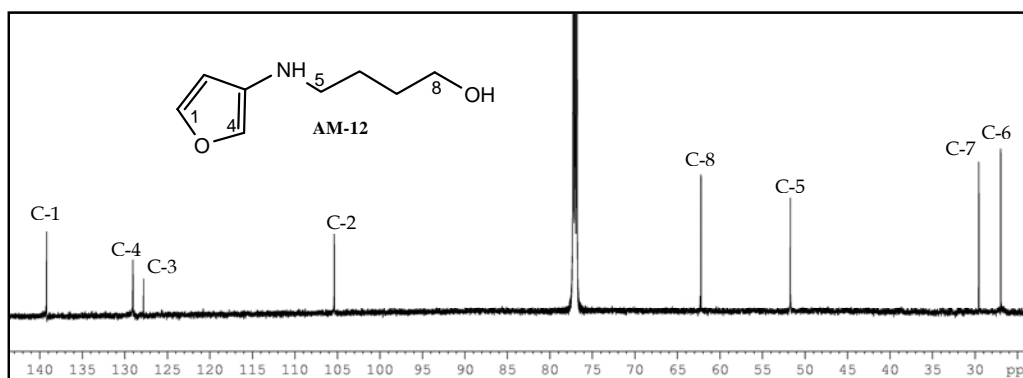


Figura 4.3.17. Espectro de RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz) de **AM-12**.

Estos datos fueron confirmados mediante RMN ^{13}C y experimentos DEPT 90 y 135, donde se observaron señales para ocho carbonos distribuidos de la siguiente forma: cuatro carbonos metilénicos a δ 27.0 (C-6), δ 29.5 (C-7), δ 51.7 (C-5) y δ 62.2 (C-8); tres carbonos metínicos a δ 105.4 (C-2), δ 129.1 (C-4) y δ 139.2 (C-1) y un carbono cuaternario a δ 127.8 (C-3).

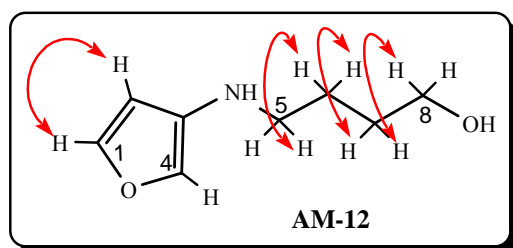


Figura 4.3.18. Correlaciones observadas en el experimento COSY de AM-12

El conjunto de estos datos, junto con el estudio de los experimentos COSY, ROESY, HMBC y HSQC, nos permitió establecer la estructura de AM-12. Así, En el experimento ^1H - ^1H COSY se observó acoplamiento entre los protones H-1 y H-2. Así mismo, se observó correlación de H-5 con H-6, de H-6 con H-7 y de este último con los protones H-8.

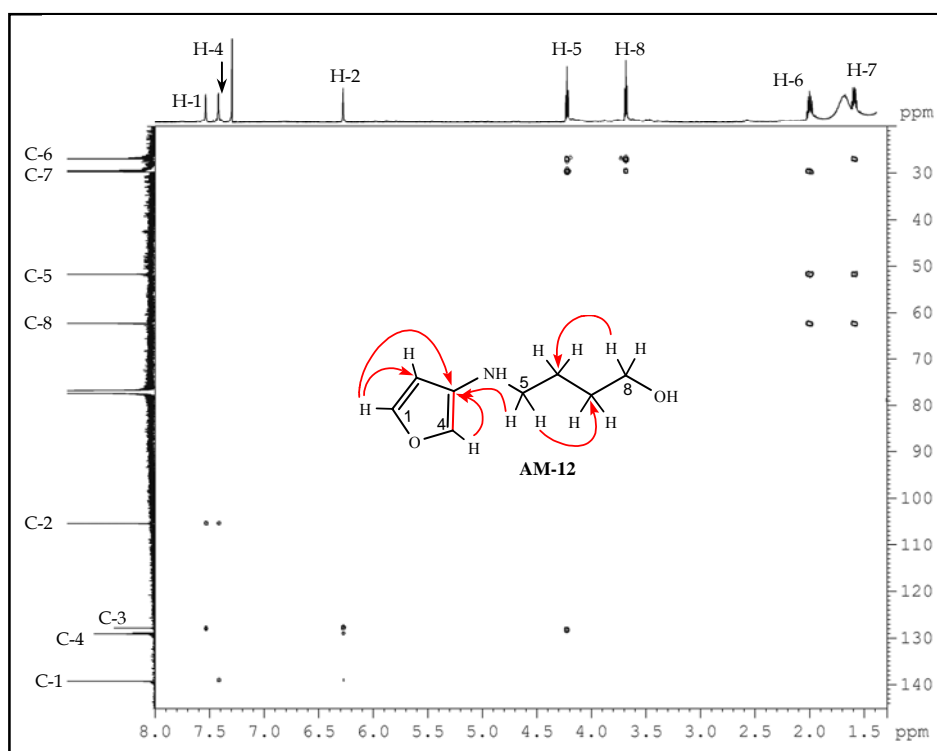


Figura 4.3.19. Experimento HMBC de AM-12.

En un experimento HMBC se observó correlación del protón H-1 y H-4 con los carbonos C-2 y C-3; así como correlación de los protones H-5 con los carbonos C-3, C-6 y C-7; y de H-8 con C-6 y C-7. Ello permitió establecer la estructura de **AM-12** como **N-4-(3-furoilamino)-1-butanol**.

Tabla 1. Datos de RMN ^1H y ^{13}C (δ , CDCl_3) de **AM-11** y **AM-12**.

Posición	AM-11		AM-12	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1		132.2 s	7.52 s	139.2 d
2	6.61 s*	102.7 d*	6.26 s	105.4 d
3		147.2 s*		127.8 s
4		134.3 s	7.41 s	129.1 d
5		147.2 s*	4.21 t (6.9)	51.7 t
6	6.61 s*	102.7 d*	1.99 m	27.0 t
7	4.75 d (4.2)	86.1 d	1.58 m	29.5 t
8	3.12 sa	54.4 d	3.68 t (6.0)	62.2 t
9	3.93 m 4.31 dd (7.1, 9.4)	71.8 t		
OMe	3.93 s*	56.4 s*		
OMe	3.93 s*	56.4 s*		
OH	5.51 s			

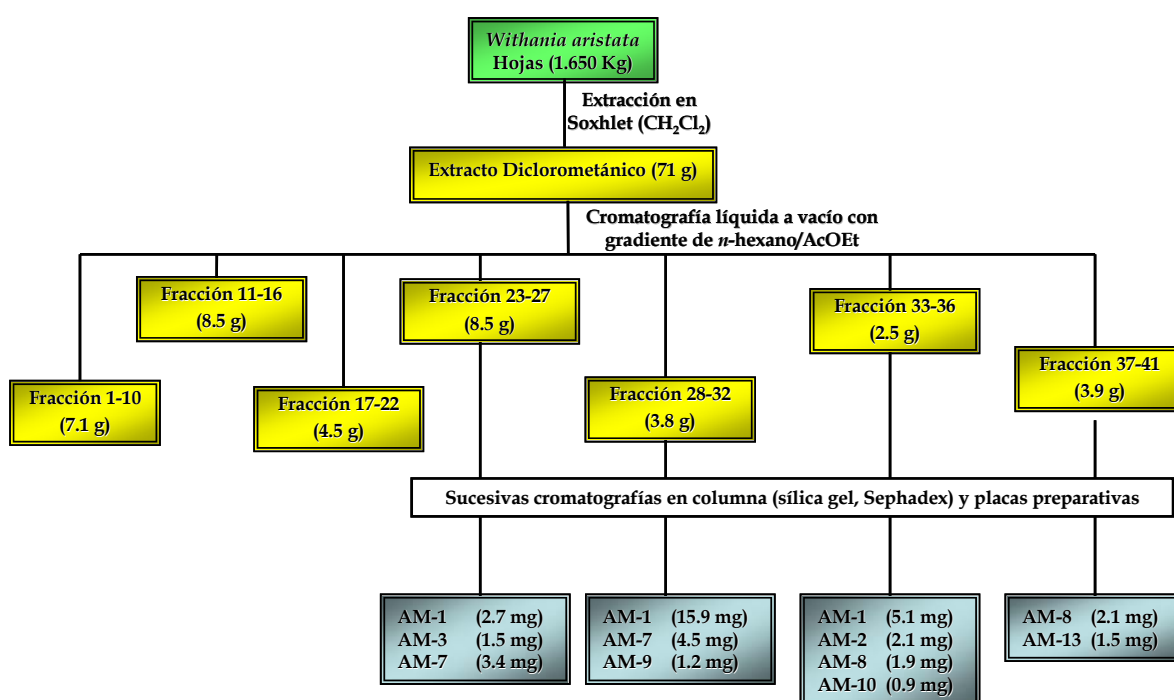
* Señales solapadas, *J* entre paréntesis en Hz.

Datos basados en experimentos DEPT, HSQC y HMBC.

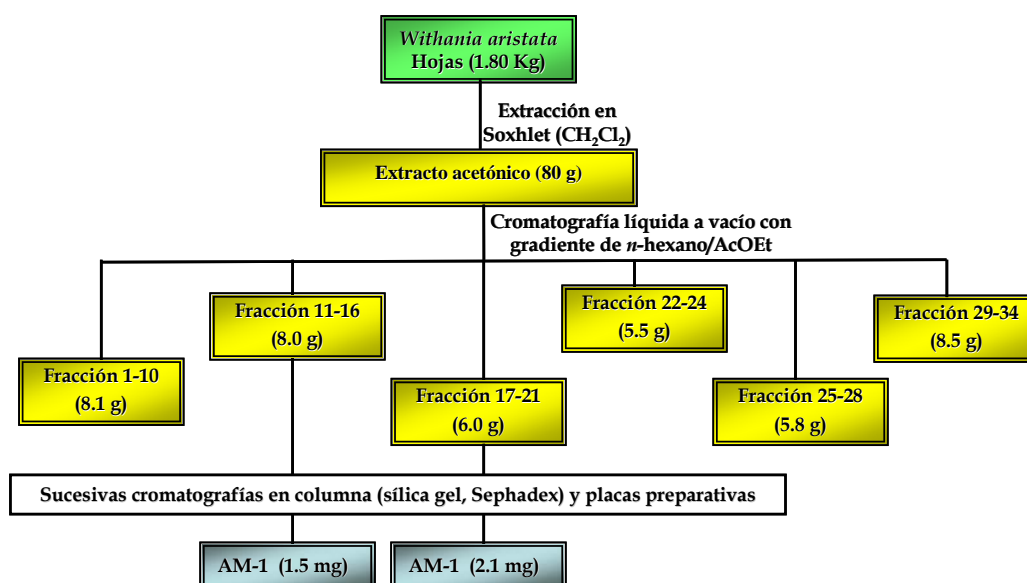
4.3.3. Parte experimental

4.3.3.1. Separación cromatográfica de las amidas y aminas de las hojas de *W. aristata*

Repetidas cromatografías de los extractos de diclorometano y de acetona de hojas y tallos de *Withania aristata*, dio lugar al aislamiento de ocho alcaloides todos ellos conocidos en la bibliografía química. Estos metabolitos se obtuvieron de las fracciones de la primera columna a vacío en gel de sílice que se realizó a cada extracto, tal como se detalla en los siguientes esquemas:



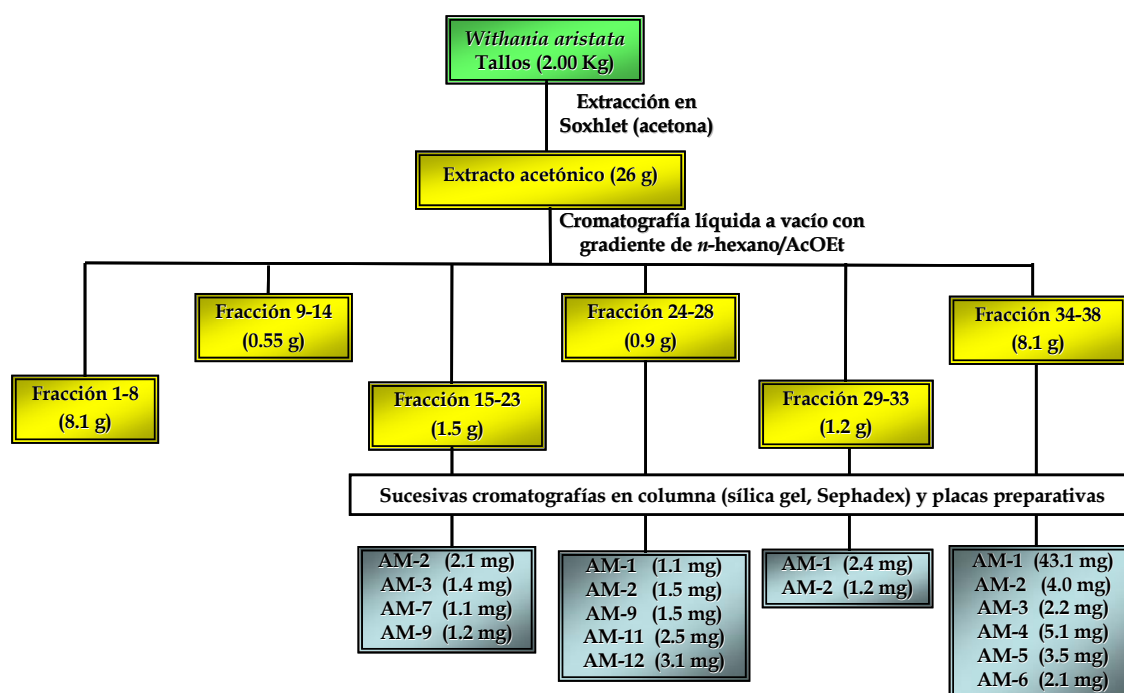
Esquema: Purificación de las amidas y aminas del extracto de diclorometano de las hojas de *W. aristata*.



Esquema: Purificación de las amidas y aminas del extracto de acetona de las hojas de *W. aristata*.

4.3.3.2. Separación cromatográfica de las aminas y amidas de los tallos de *W. aristata*

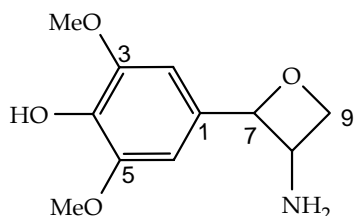
La purificación mediante cromatografía del extracto de acetona de los tallos de *Withania aristata*, dio lugar al aislamiento de diez aminas y amidas, de los cuales dos resultaron nuevos en la bibliografía química (AM-11 y AM-12). Estos metabolitos se obtuvieron de las fracciones de la primera columna a vacío en gel de sílice que se realizó a dicho extracto, tal como se detalla en el siguiente esquema.



Esquema: Purificación de las amidas y aminas del extracto de acetona de los tallos de *W. aristata*

4.3.3.3. Datos espectroscópicos y espectrométricos

Amina AM-11

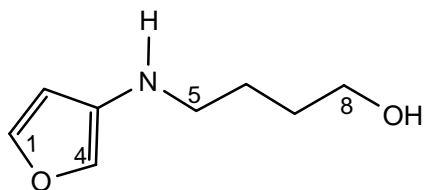


2-(4-Hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-3-oxetanamina

Se obtuvo como un sólido amorfo (2.2 mg).

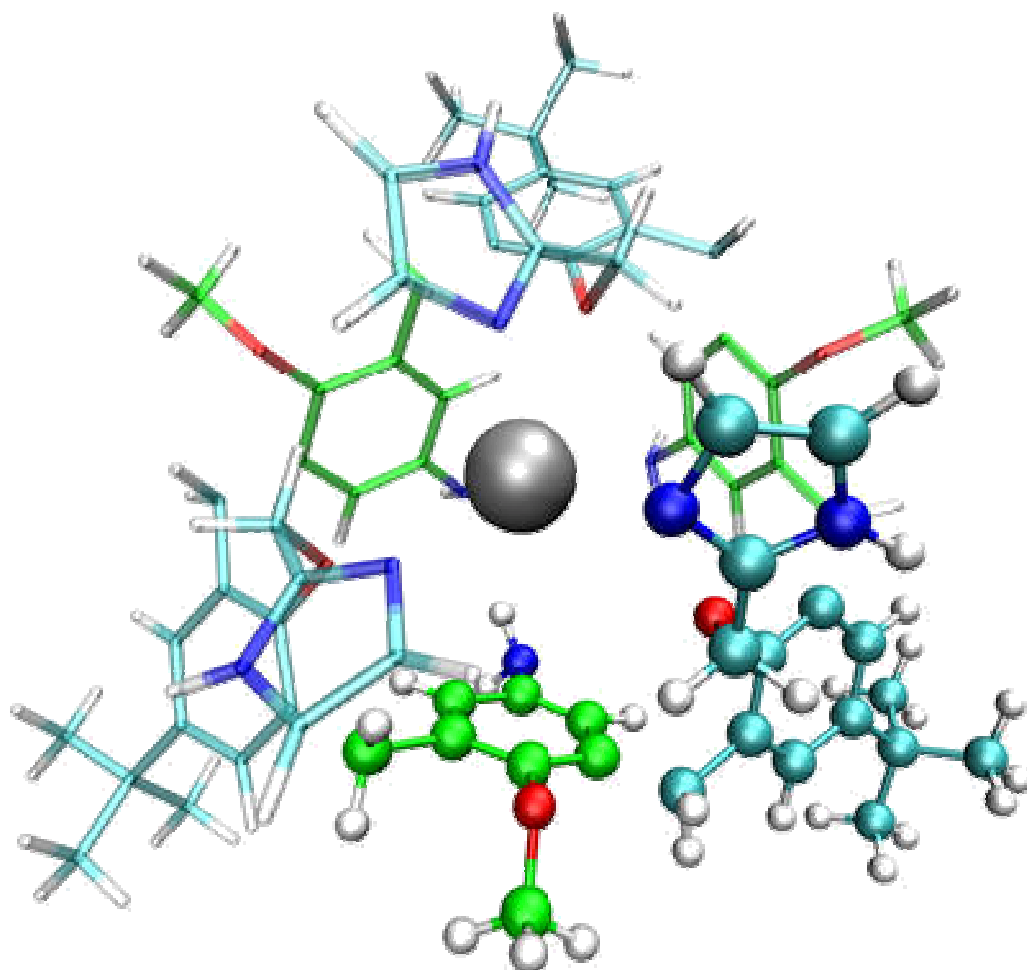
[α]_D²⁰	+ 5.0 (c 0.20, CHCl ₃).
UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ)	228 (4.0), 294 (3.2) nm.
IR ν_{\max}	3475, 2925, 1700, 1662, 1373, 1226, 1039 cm ⁻¹ .
RMN ¹H (δ, CDCl₃)	3.12 (1H, sa, H8); 3.93 (1H, m, H9); 3.93 (6H, s, 2 x OMe); 4.31 (1H, dd, J= 7.1, 9.4 Hz, H9); 4.75 (1H, d, J= 4.2 Hz, H7); 5.51 (1H, s, OH); 6.61 (2H, s, H2, H6).
RMN ¹³C (δ, CDCl₃)	54.4 (d, C8); 56.4 (2 x s, OMe); 71.8 (t, C9); 86.1 (d, C7); 102.7 (2 x d, C2, C-6); 132.2 (s, C-1); 134.3 (s, C-4); 147.2 (2 x s, C3, C-5).
EIMS m/z (%)	248 [M+Na] ⁺ (100).
ESI/MS-AR m/z	Calculado para C ₁₁ H ₁₅ NO ₄ Na [M+Na] ⁺ , 248.0899; observado, 248.0903.

Amina AM-12

**N-4-(3-Furoilamino)-1-butanol**

Se obtuvo como un sólido amorfo (2.2 mg).

UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ)	220 (4.1), 275 (3.4) nm.
IR ν_{\max}	3344, 3069, 2943, 1528, 1450, 1380, 1258, 1069, 1011, 978, 774 cm^{-1} .
RMN ^1H (δ, CDCl_3)	1.58 (2H, m, H7); 1.99 (2H, m, H6); 3.68 (2H, t, $J = 6.0$ Hz, H8); 4.21 (2H, t, $J = 6.9$ Hz, H5); 6.26 (1H, s, H2); 7.41 (1H, s, H4); 7.52 (1H, s, H1).
RMN ^{13}C (δ, CDCl_3)	27.0 (t, C6); 29.5 (t, C7); 51.7 (t, C5); 62.2 (t, C8); 105.4 (d, C2); 127.8 (s, C3); 129.1 (d, C4); 139.2 (d, C1).
EIMS m/z (%):	178 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (100).
ESI/MS-AR m/z:	Calculado para $\text{C}_8\text{H}_{13}\text{NO}_2\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 178.0844; observado, 178.0850.



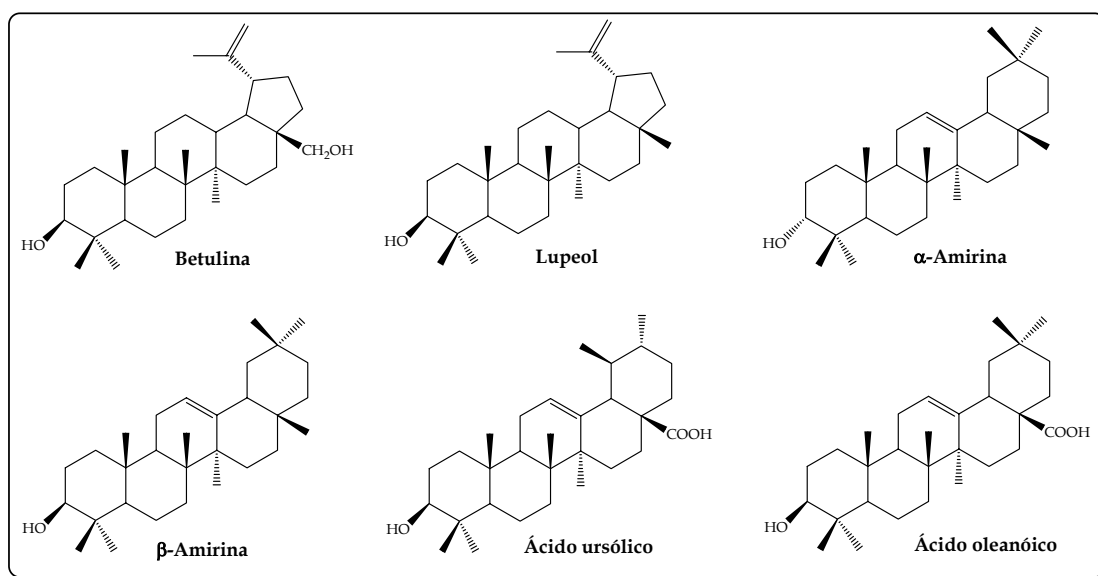
4.4. Miscelánea

4.4. Miscelánea

Además de los metabolitos aislados anteriormente, de los extractos de hojas y tallos de *Withania aristata*, se aislaron otros compuestos de estructuras diversas previamente descritos, cuyas estructuras fueron establecidas basándonos en sus datos espectroscópicos y espectrométricos, así como comparación con los datos de la bibliografía química y que relacionamos a continuación.

➤ Triterpenos:

De *Withania aristata* se aíslan seis triterpenos. Uno de ellos aislado por primera vez de una Solanaceae: Betulina¹; dos aislados por primera vez del género *Withania*: lupeol² y α -amirina³; y tres ya conocidos de este género: β -amirina⁴, ácido ursólico⁵ y ácido oleanólico⁵.



➤ Compuestos aromáticos:

Se aíslan y describen por primera vez del género *Withania* trece compuestos aromáticos, que hemos denominado de **A-1** a **A-13**. El compuesto **A-1** se describe por primera vez como natural. Los compuestos de **A-2** a **A-5**, de **A-7** a **A-8** y **A-12** se aislaron

¹ Sholichin, M.; Yamasaki, K.; Kasai, R.; Tanaka, O. *Chem. Pharm. Bull.* **1980**, *28*, 1006.

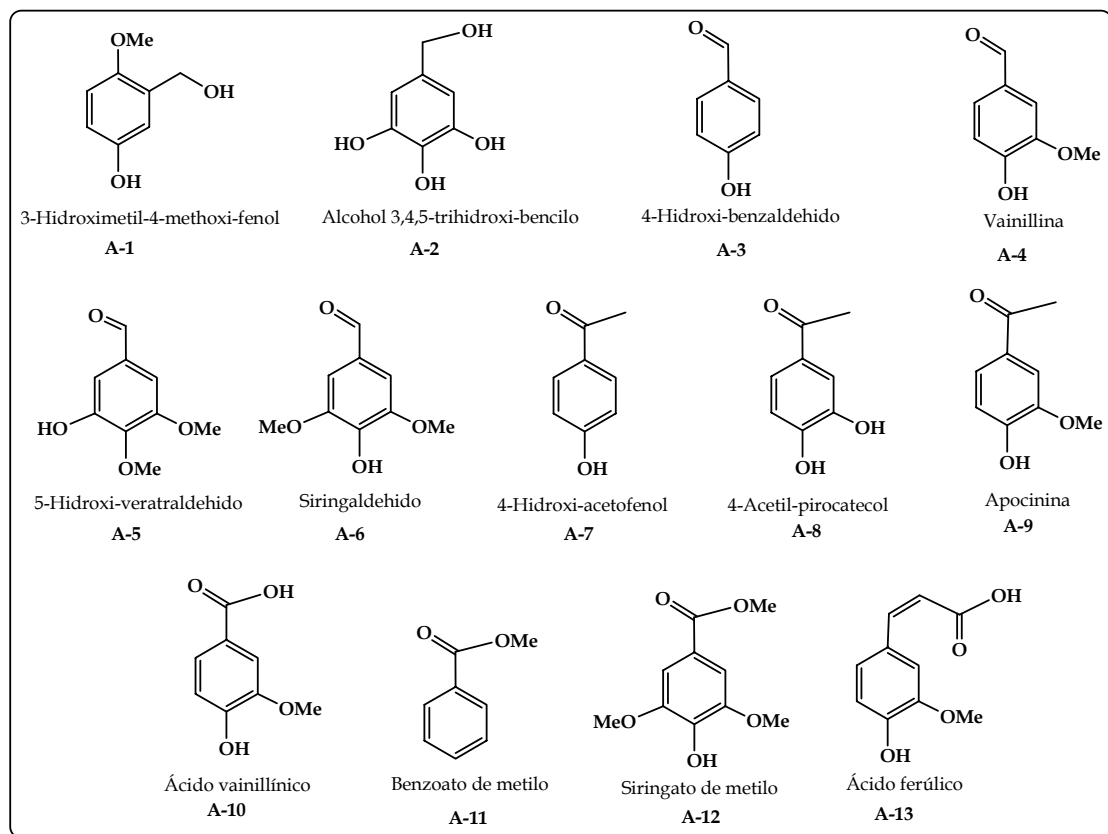
² Wenkert, E. T.; Baddeley, G. V.; Burfitt, I. R.; Moreno, L. N. *Org. Magn. Resonance.* **1978**, *11*, 337.

³ Buckley, D. G.; Green, G. H.; Ritchie, E.; Taylor, W. C. *Chem. Ind. (London)*, **1971**, *11*, 298.

⁴ Knight, S.A. *Org. Magn. Resonance.* **1974**, *6*, 603.

⁵ Glick, R. E.; Mumma, R. O.; Shamma, M. *Chem. Ind. (London)*, **1959**, 1092.

por primera vez de una especie de la familia Solanaceae. Estos compuestos fueron identificados como: 3-hidroximetil-4-metoxi-fenol⁶ (A-1), alcohol 3,4,5-trihidroxi-bencilo⁷ (A-2), 4-hidroxi-benzaldehido⁸ (A-3), vainillina⁹ (A-4), 5-hidroxi-veratraldehido¹⁰ (A-5), siringaldehido¹¹ (A-6), 4-acetofenol¹² (A-7), 4-acetil-pirocatecol¹³ (A-8), apocinina¹⁴ (A-9), ácido vainillínico¹⁵ (A-10), benzoato de metilo¹⁶ (A-11), siringato de metilo¹⁷ (A-12) y ácido ferúlico¹⁶ (A-13).



⁶ Schmidt, U.; Boekens, H.; Lieberknecht, A.; Griesser, H. *Liebigs Ann. Chem.* **1983**, 9, 1459.

⁷ Ozawa, T.; Haga, K.; Arai, N.; Takino, Y. *Agric. Biol. Chem.* **1978**, 42, 1511.

⁸ Schmid, H.; Karrer, P. *Helv. Chim. Acta.* **1945**, 28, 722.

⁹ Smith, D. M. *J. Asso. Oficial Agr. Chem.* **1964**, 47, 808.

¹⁰ Battersby, A. R.; Dobson, T. A.; Foulkes, D. M.; Herbert, R. B. *J. Chem. Soc.* **1972**, 14, 1730.

¹¹ Steelink, C. *J. Am. Chem. Soc.*, **1965**, 87, 2056.

¹² Sawlewicz, L.; Weiss, E.; Reichstein, T. *Helv. Chim. Acta.* **1967**, 50, 504.

¹³ Lin, Y. L.; Lin, T. C.; Kuo, Y. H. *J. Nat. Prod.* **1997**, 60, 368.

¹⁴ Domínguez, X. A.; Pugliese, O. *Planta Med.* **1967**, 15, 401.

¹⁵ Morita, H. *J. Chromatogr.* **1972**, 71, 149.

¹⁶ Kite, G. C.; Leon, C. *Phytochemistry.* **1995**, 40, 1093.

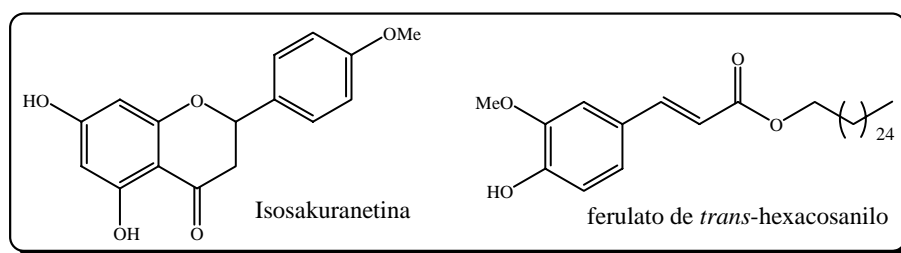
¹⁷ Jurd, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, 81, 4606.

➤ Flavonoide:

Se aísla por primera vez de una especie de la familia Solanaceae, el flavonoide Isosakuranetina¹⁸.

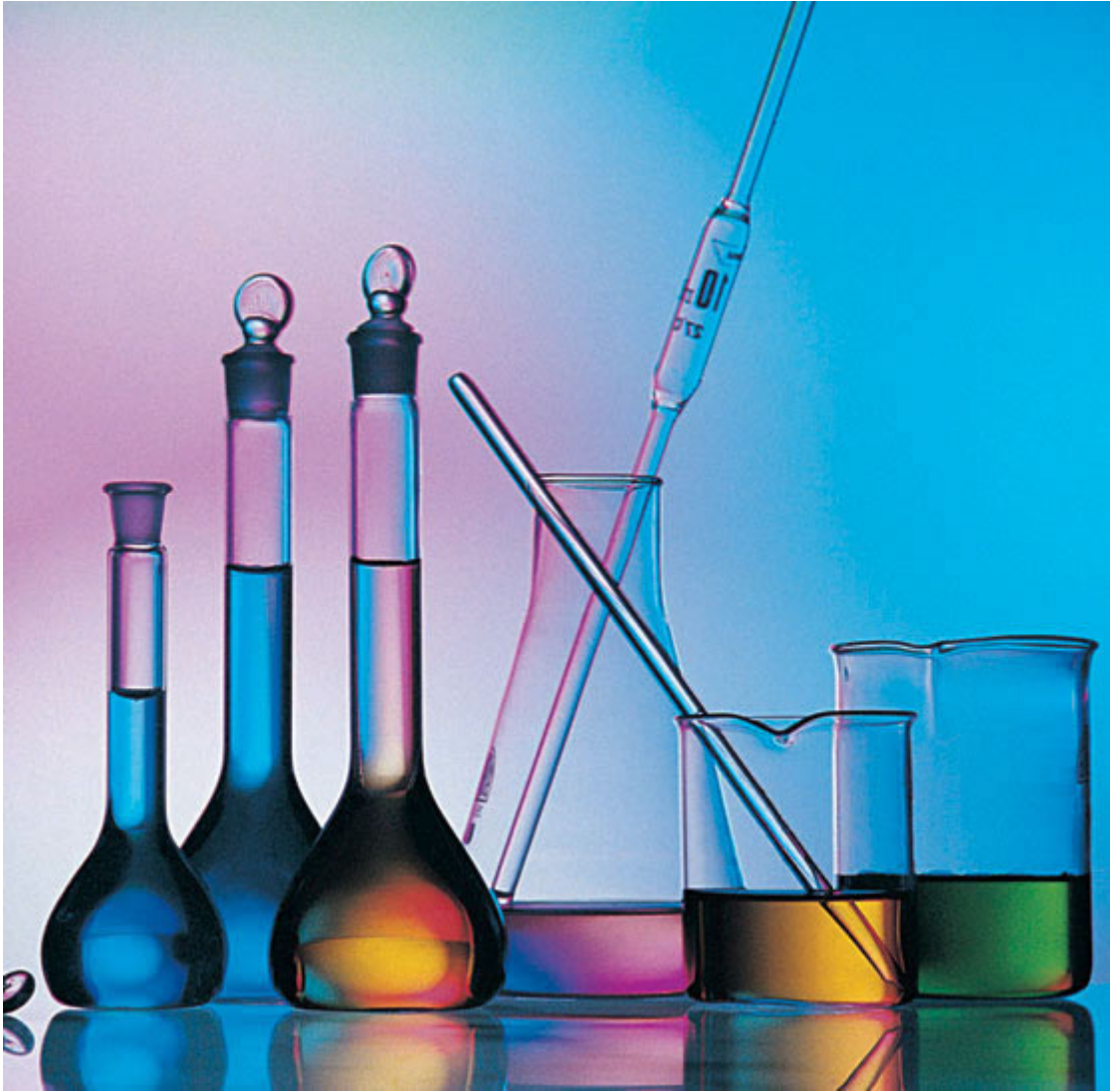
➤ Éster ferúlico:

Se aísla el ferulato de *trans*-hexacosanil¹⁹ por primera vez de una especie de la familia Solanaceae.



¹⁸ Wagner, H.; Chari, V. M.; Sonnenbichler, J. *Tetrahedron Lett.* **1976**, 21, 1799.

¹⁹ del Rio, J. C.; Rodriguez, I. M.; Gutierrez, A. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004**, 18, 2691.



5. Modificaciones estructurales

5.1. Introducción

La historia del medicamento se remonta a los orígenes de la sociedad humana. Desde los primeros tiempos el hombre ha acudido a la naturaleza para obtener sustancias que, o bien le ayudaran a paliar el dolor o los síntomas de sus enfermedades..., o bien le facilitarían la obtención del alimento (veneno para la caza), sus relaciones sociales y religiosas (estimulantes y alucinógenos), etc. Estas circunstancias han permitido disponer de una amplia información, que sometida a la observación atenta y al estudio crítico, ha dado lugar al planteamiento de ideas que, debidamente desarrolladas, han llevado a la obtención de nuevos medicamentos o de sustancias líderes.

Esta historia previa es la causa de que en la actualidad, más de la mitad de los fármacos de los que se dispone, sean de origen natural. Modelos que, obtenidos a partir de un organismo vivo, han sufrido diferentes modificaciones en el laboratorio, encaminadas a obtener moléculas más potentes y menos tóxicas que las originales, las cuales en realidad no habían sido diseñadas para un tratamiento específico.

El **descubrimiento** de un nuevo medicamento y su desarrollo posterior, son dos fases que condicionan el logro de un nuevo producto, útil en terapéutica. Se considera, de manera general, que el descubrimiento comprende toda la fase necesaria para que podamos asegurar que el compuesto tiene un perfil deseable de actividad; comprende desde la síntesis, el aislamiento de la fuente natural, o la obtención biotecnológica y toda la fase preclínica, incluida la toxicología; de manera tal que nos confirmen que el compuesto es aceptable en cuanto eficacia y seguridad para su ensayo en seres humanos. Comprende en un sentido más amplio, un gran conjunto de actos que culminan en la utilización terapéutica de un nuevo medicamento.

Esta fase de descubrimiento, o sea, desde la obtención hasta la primera aplicación en humanos, se estima que dura aproximadamente 42,6 meses (3,55 años) como promedio. La fase de desarrollo comprende la de los estudios clínicos y la del registro farmacéutico y se estima que duren entre 68.6 meses y 30.3 meses, respectivamente. Todo este largo proceso, desde su obtención hasta su registro comprende un total de 11.8 años de investigación, con un costo promedio de 231 millones de dólares por cada nuevo medicamento que salga al mercado.

Lo más alarmante es que sólo una de cada 10.000 moléculas ensayadas pasa a la fase de desarrollo, una de cada 100.000 supera los ensayos clínicos y logra registrarse y sólo 3 de cada 10 nuevos medicamentos registrados recupera su inversión inicial. Esto genera una triste realidad, por cada millón de moléculas que se inician en esta larga cadena para la obtención de un nuevo medicamento, sólo tres recuperan la inversión inicial. Por tal motivo el diseño racional de fármacos, constituye una herramienta casi indispensable en el desarrollo actual de nuevos medicamentos, contribuyendo a un aumento de las posibilidades de éxito y a una reducción de los costos.

El **desarrollo** de medicamentos cada vez más seguros, adecuados, específicos y efectivos, es una tarea que requiere del esfuerzo coordinado e inteligente de un elevado número de profesionales de distinta formación y dedicación. Si se conoce la base biológica de una enfermedad o de un desarreglo metabólico, es posible diseñar un medicamento utilizando un mecanismo de aproximación al proceso patológico. Cuando se conoce este proceso en su base molecular y se pueden definir las moléculas implicadas en el mismo, es posible diseñar medicamentos que interactúen con la molécula responsable, de tal forma que la modifique y se modifique así mismo la patología. Para conocer en profundidad el proceso fisiológico, es necesario conocer la estructura tridimensional de la(s) molécula(s) objetivo. Esto es posible pocas veces, sobre todo por la dificultad de obtener los receptores en estado cristalino. Los métodos más utilizados en este sentido son la Resonancia Magnética Nuclear, la cristalografía de rayos X y los cálculos teóricos de las fuerzas que mantienen la configuración de un sistema, ya sea por mecánica molecular o mecánica cuántica.

Aunque en la búsqueda de un **cabeza de serie** se pueden aplicar varios métodos los más empleados son:

- El empleo de productos activos presentes en drogas utilizadas en la medicina tradicional.
- Estudio de nuevos compuestos provenientes de la síntesis química o de la biotecnología.

Ambos métodos requieren de la existencia previa de una amplia batería de ensayos biológicos cuidadosamente diseñados, que permitan determinar con rapidez y de manera inequívoca la actividad biológica de los nuevos compuestos. En el caso de

estudios de compuestos empleados en la medicina tradicional, es más fácil, en principio, el diseño de la prueba biológica, ya que se cuenta con información previa de la actividad prevista; se trata de comprobar simplemente de manera científica el empleo popular. Sin embargo, cuando se desconoce la posible actividad, la batería de ensayos ha de ser lo suficientemente amplia, en un intento de no perder ninguna información interesante.

Otras vías de obtener un compuesto líder o cabeza de serie son:

- Aislamiento de los productos responsables de una acción biológica determinada y su posterior identificación y caracterización. Ejemplos son las hormonas esteroidales y el ácido araquidónico, que permitió el desarrollo de las prostaglandinas y tromboxanos.
- Detección y observación de efectos secundarios o acciones biológicas inesperadas durante el empleo de compuestos activos. Ejemplos son la acción antiagregante de la aspirina por inhibición de la ciclooxigenasa (enzimas implicadas en la síntesis de prostaglandinas) ó la acción diurética de sulfamidas antibacterianas como la acetazolamina (por inhibición de la anhidrasa carbónica).
- Por observación del metabolismo de los compuestos. En ocasiones, algunos de los compuestos derivados del metabolismo de un fármaco presentan una actividad superior o diferente a la del propio fármaco de partida. La síntesis de sulfonamidas bacterianas a partir del metabolismo del antibiótico prontosil puede servir de ejemplo para este tipo de búsqueda.
- El análisis de la actividad biológica de productos intermedios de la síntesis de un fármaco. Tal es el caso de las tiosemicarbazonas empleadas en la síntesis del sulfatiadiazol, que provocaron una nueva estrategia para la terapia de la tuberculosis y el desarrollo de la amiatizona.

La **modificación estructural** de un prototipo o cabeza de serie tiene por objeto:

- Mejora de la potencia del líder.
- Eliminación de efectos secundarios no deseados.

- Potenciación de acciones secundarias deseadas, ya sea por complemento sinérgico a la acción principal o por sí misma.
- Separación de actividades en compuestos multiacción. Tiene como objetivo potenciar alguna de las acciones farmacológicas sobre las demás, o eliminar algunas de ellas en beneficio de las otras.
- Combinar actividades. Se trata de reunir en una entidad actividades diferentes que puedan actuar en común frente a desórdenes asociados. Tal es el caso de los antiinflamatorios con efecto antiinflamatorio y analgésico para el tratamiento de enfermedades reumatoideas. Otro ejemplo sería sumar una actividad antiagregante a los vasodilatadores habituales para el tratamiento de enfermedades vasculares, principalmente en ancianos.
- Modificación de la biodisponibilidad del fármaco líder. Desde la segunda mitad del siglo XIX se observó que el efecto fisiológico que produce una molécula estaba relacionado con su estructura^{1,2}. El estudio de esta relación, cuando es cualitativa, se denomina estudio de relación estructura-actividad, más conocido como estudio **SAR** (*Structure-Activity Relationship*) y **QSAR** (*Quantitative Structure-Activity Relationship*), cuando se establecen relaciones cuantitativas.

La finalidad de dichos estudios es determinar qué partes de una molécula son esenciales para su actividad biológica. Esto se lleva a cabo mediante la comparación estructural de metabolitos secundarios similares o mediante la síntesis o semisíntesis de una serie de compuestos, con pequeñas variaciones estructurales con respecto a la molécula natural y ver que efecto tienen sobre la actividad biológica. Un ejemplo de estudios SAR, es el del producto natural anticancerígeno, paclitaxel (taxol)³, a partir del cual se realizaron numerosas modificaciones estructurales, lo que permitió determinar que partes de la molécula son imprescindibles para su actividad (figura 5.1.1.).

Este proceso es prácticamente indispensable en el desarrollo de cualquier fármaco. Incluso, si no se llegan a conseguir análogos con mejor actividad, las correlaciones cualitativas y cuantitativas que pueden establecerse entre las

¹ Crum-Brown, A.; Fraser, T. R. *Proc. Roy. Soc. Edinburgh*. **1872**, 7, 663.

² Richardson, B. W. *Med. Times Gaz.* **1869**, 18, 703.

³ Silverman, R. B. *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*. **2005**, Ed. Elsevier: Chicago.

modificaciones estructurales realizadas y los datos de actividad biológica son de gran utilidad para avanzar en el conocimiento del **farmacóforo** (parte de la molécula que interactúa con la diana farmacológica, que explica la acción biológica a nivel molecular).

La identificación de los distintos grupos farmacofóricos es esencial en el diseño de fármacos y constituye uno de los principales objetivos de la Química Médica⁴. Así por ejemplo, la mitoxantrona, un agente anticancerígeno, fue sintetizada como resultado de las conclusiones obtenidas al examinar la estructura de algunos compuestos antitumorales, como la camptotecina y la estreptonigrina, al comprobarse que todos ellos forman un triángulo con dimensiones semejantes, en cuyos vértices se sitúan dos oxígenos y un nitrógeno¹¹ (figura 5.1.2.).

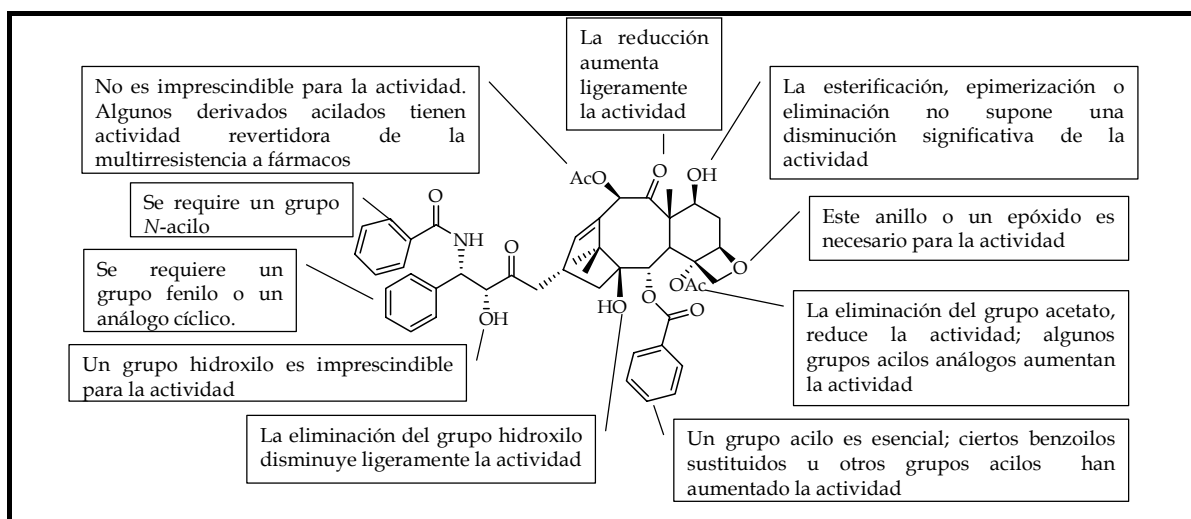


Figura 5.1.1. Estudios SAR del paclitaxel (Taxol).

⁴Avendaño, C. *Introducción a la Química Farmacéutica*. 2001, Madrid, McGraw-Hill/Interamericana de España S. A. U.

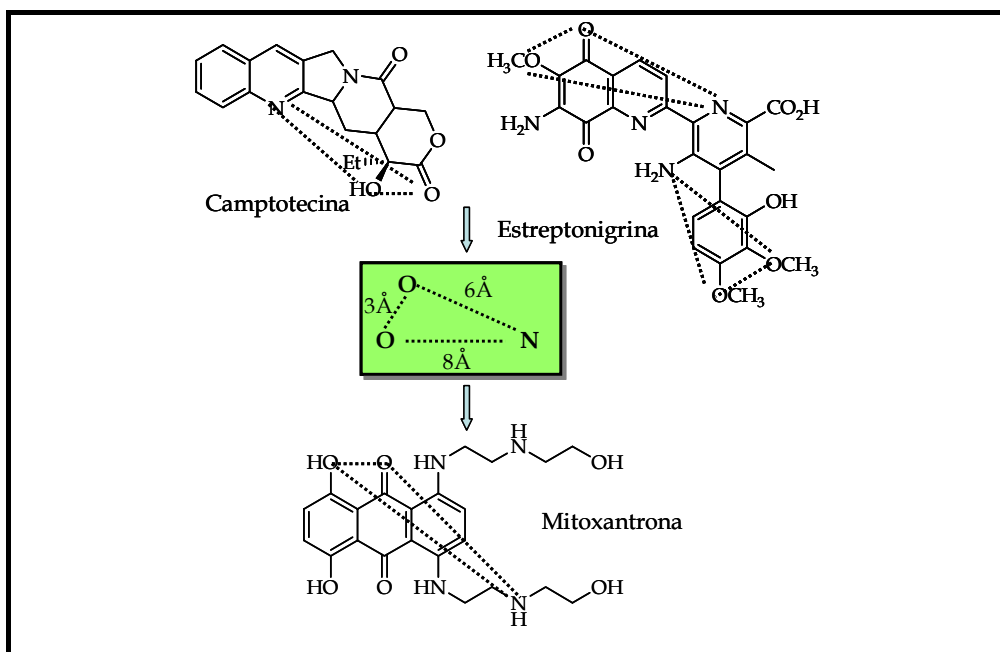


Figura 5.1.2. Diseño de la mitoxantrona basándose en el farmacóforo, expresado en distancias interatómicas.

Al realizar modificaciones estructurales en un cabeza de serie, se tienen en cuenta las siguientes estrategias estándar, que se han ido estableciendo a lo largo de muchos años de estudio de relación estructura-actividad:

- **Sustitución bioisostérica.**

En general, el término bioisosterismo se aplica para todo el conjunto de analogías que se pueden establecer entre dos agrupaciones atómicas, incluyendo tanto elementos estéricos como electrónicos y que producen efectos fisiológicos similares o antagonicos (ya que frecuentemente interactúan con la misma diana). Ejemplo de esto son los antibióticos β -lactámicos, en la serie de las penemas, oxapenemas y carbapenemas, en los que el cambio del átomo de azufre por el de oxígeno, aumenta la reactividad del anillo β -lactámico y lo convierte en una molécula "suicida" que inactiva a las β -lactamasas. La sustitución entonces del oxígeno por el etileno (CH_2) disminuye nuevamente esta reactividad, incluso a valores inferiores que los de las penemas, por lo que genera moléculas menos activas, aunque aún con utilidad farmacológica. Otro ejemplo es el producido al halogenar el uracilo con fluor, dando el fluorouracilo que tiene actividad antitumoral.

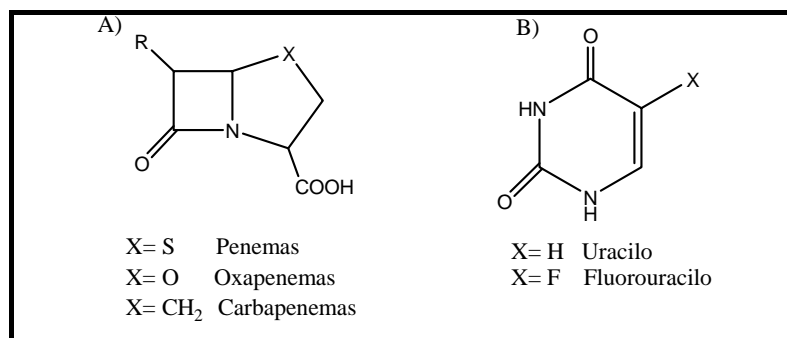


Figura 5.1.3. A) Diseño de antibióticos β -lactámicos basados en el bioisosterismo, intercambiando el azufre por grupos equivalentes y B) diseño de un antitumoral al intercambiar hidrógeno por fluor en el uracilo.

- **Simplificación de la estructura.** Conocida tradicionalmente como variación disyuntiva, se aplica frecuentemente a los productos naturales con estructura compleja, facilitando su síntesis, pero con el inconveniente de la posible pérdida de selectividad. Por ejemplo, los análogos simplificados de la morfina, por eliminación de estereocentros, mantienen la actividad analgésica (figura 5.1.4.).

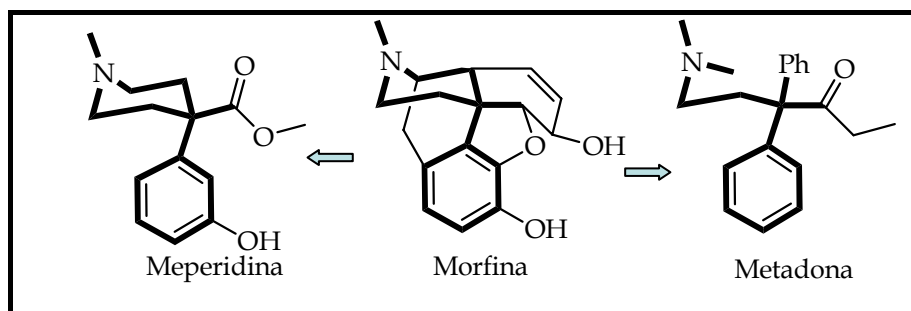


Figura 5.1.4. Simplificación estructural de la morfina. El farmacóforo está representado en trazo más grueso. La metadona tiene una potente actividad analgésica al igual que la morfina, pero tiene un único estereocentro, mientras que la morfina posee cinco. La meperidina, un análogo aquiral de la morfina, es un potente narcótico y analgésico.

- **Asociación de dos moléculas.** En ocasiones se fusionan fármacos entre sí (híbridos idénticos) o con otros fármacos (híbridos no idénticos) para formar una nueva estructura que potencie la acción de ambos, un ejemplo es el analgésico benorilato (figura 5.1.5.) que procede de la unión covalente entre la aspirina y el paracetamol. Las uniones de estos fármacos puede ser a través de cadenas, uniones covalentes o solapamientos.

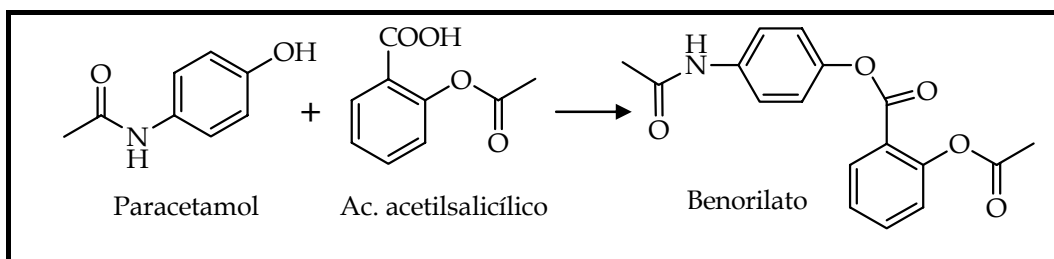


Figura 5.1.5. Benorilato es un analgésico generado por la reacción de dos fármacos, el paracetamol y el ácido acetilsalicílico.

- **Variación de los sustituyentes**, introduciendo grupos dadores y aceptores de electrones, halógenos (uno de cada tres fármacos poseen un grupo halogenado), grupos metilos, etc.

Compuesto Original	Compuesto modificado	Resultado
<p style="text-align: center;">Lisinopril</p>	<p style="text-align: center;">Camptopril</p>	Es 10 veces más activo como anticolésterolémico
<p style="text-align: center;">Tolbutamida</p>	<p style="text-align: center;">Cloropropamida</p>	Prolonga su acción hipoglucemiante
<p style="text-align: center;">Morfina</p>	<p style="text-align: center;">Codeina</p>	Cambio en el perfil farmacológico, de analgésico a antitusivo

Figura 5.1.6. Ejemplos de variaciones realizadas a fármacos en un sustituyente.

- **Aumento de la rigidez**, por ejemplo, con el cierre de anillos o la introducción de dobles enlaces, lo que disminuye la libertad conformacional. Evans y col.⁵ realizaron derivados de los β -bloqueantes tipo fenilpropanolaminas (figura 5.1.7.) con el objeto de disminuir su actividad β -bloqueante, pero manteniendo la actividad hipotensora, al restringir la conformación, lo que consiguieron con el cromakalim.

⁵ Evans, J. M.; Fake, C. S.; Hamilton, T. C.; Poyser, R. H.; Watts, E. A. *J. Med. Chem.* **1983**, 26, 1582.

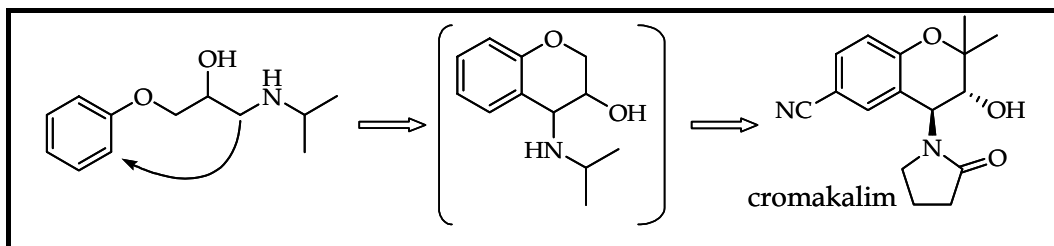


Figura 5.1.7. Análogos cíclicos de los β -bloqueantes fenilpropanolaminas.

- **Extensión y contracción del anillo.** En la figura 5.1.8. se presenta como afecta a la actividad inhibidora de la enzima que sintetiza la angiotensina el aumento del tamaño del anillo⁶ en análogos del enalaprilat, incrementando la actividad 4000 veces cuando aumentamos el anillo de 5 ($n=2$) a 8 miembros ($n=5$).

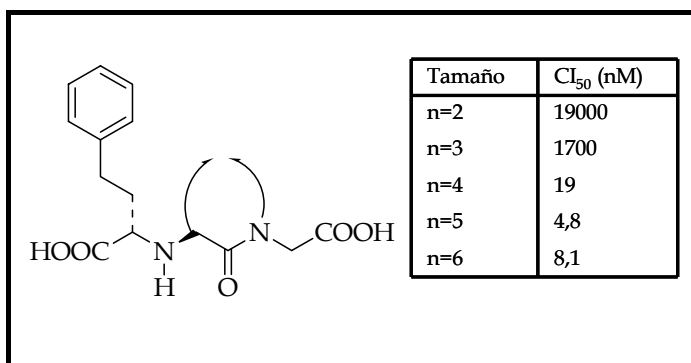


Figura 5.1.8. Análogos del enalaprilat y su actividad inhibidora de la angiotensina convertasa.

⁶ Thorsett, E. D.; Harris, E. E.; Aster, S. D. ; Peterson, E. R.; Snyder, J. P.; Springer, J. P.; Hirshfield, J.; Tristram, E. W.; Patchett, A. A.; Ulm, E. H. *J. Med. Chem.* **1986**, 29 (2), 251.

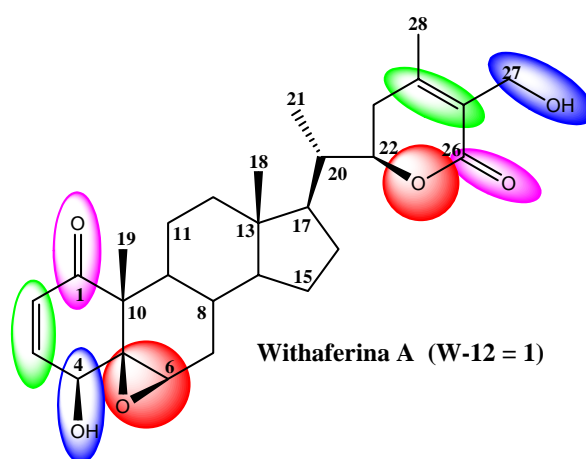
5.2. Preparación de derivados para modular la actividad biológica

Este capítulo de la presente Memoria de Tesis, se desarrolló dado el interés despertado por los compuestos con esqueleto base de withanolidas, no sólo por el amplio rango de actividades biológicas que presentan, sino también por sus características estructurales, lo que hace de este grupo de productos naturales *estructuras privilegiadas*. Ello se pone de manifiesto por los diversos grupos de investigación de prestigio internacional que han dedicado su esfuerzo en esta línea.

5.2.1. Transformaciones de Withaferina A.

Desde el punto de vista sintético y farmacológico, la withaferina A nos parecía el sintón o cabeza de serie más apropiado, debido a que es el producto mayoritario en la planta (3.2 g), con un rendimiento del 4.5% con respecto al extracto total de diclorometano (71 g). Este producto presenta una amplia gama de actividades biológicas, que reseñamos en la introducción de esta Memoria. Como parte de los objetivos de este trabajo hemos evaluado la actividad citotóxica de las withanolidas aisladas, resultando algunas de ellas prometedoras para estudios posteriores. Por ello y con la finalidad de profundizar en el conocimiento de la relación estructura-actividad (SAR), se preparó una **quimioteca** a partir de la withaferina A (**W-12 = 1**), aislada de las hojas de *Withania aristata*.

Al observar la estructura de la withaferina A vemos que existen diversas zonas potenciales de interacción con una molécula diana o receptor. En base a ello, hemos llevado a cabo diversas modificaciones en los grupos funcionales para conocer la importancia de estos en la expresión de la actividad biológica.



5.2.1.1. Transformaciones de los alcoholes sobre C-4 y C-27 de la withaferina A.

Los grupos hidroxilos juegan un papel fundamental en la actividad biológica de una molécula, ya que le confieren cierto grado de polaridad a la molécula, haciéndolas más solubles en disolventes polares. También, intervienen en interacciones mediante enlaces de hidrógeno con la molécula diana y además, el oxígeno del grupo hidroxilo también puede actuar como nucleófilo.

Con el fin de saber cual es el papel que juegan los grupos hidroxilos en la actividad, se llevaron a cabo una serie de modificaciones estructurales sobre estos.

5.2.1.1.1. Reacciones de acilación

Este tipo de reacciones nos da información sobre las interacciones del grupo hidroxilo y la molécula diana o receptor, ya que si el átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo está formando enlaces de hidrógeno con la diana, al acilar, esta interacción se pierde y la actividad debe desaparecer o disminuir. También, se puede potenciar la actividad al introducir ésteres de distinta naturaleza, como por ejemplo aumentando la lipofilia con ésteres de cadena alifática o introduciendo ésteres aromáticos, que puedan interactuar mediante enlaces π - π hidrofóbicos y enlaces de hidrógeno.

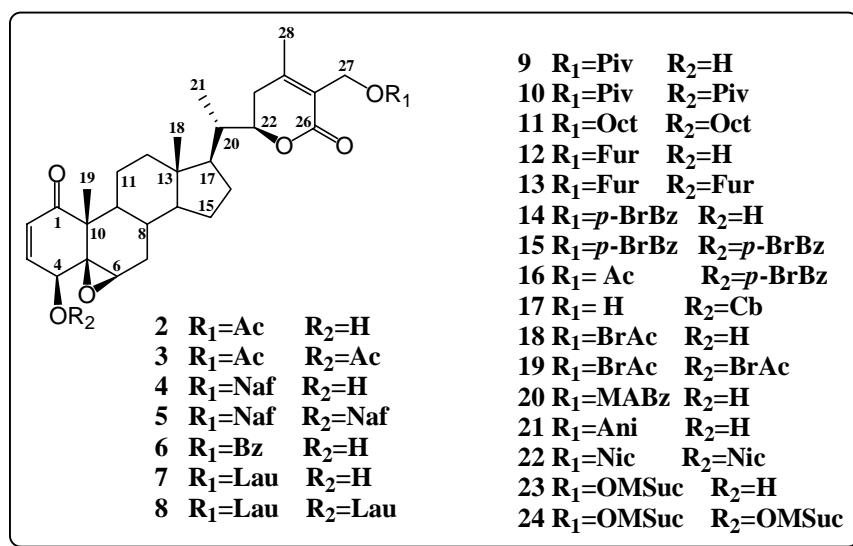


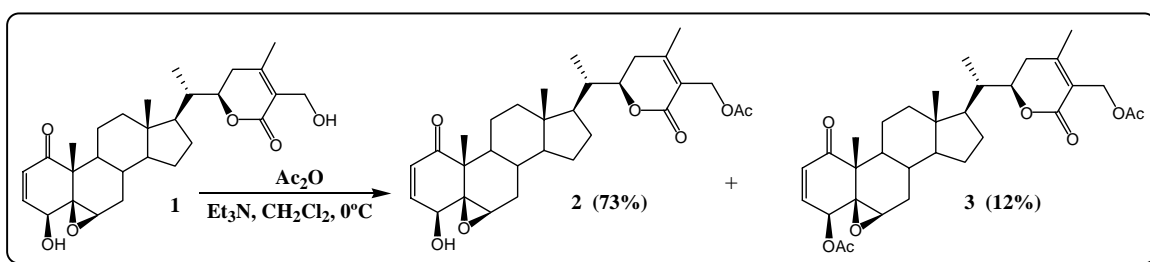
Figura 5.2.1. Derivados obtenidos vía esterificación de la withaferina A.

Así, se prepararon veintitrés derivados, modificando los alcoholes en C-4 y C-27 a ésteres de forma regioselectiva en algunos casos y determinar, posteriormente, como afectan estas sustituciones a la actividad.

En los siguientes apartados se describirán las modificaciones realizadas, las condiciones de reacción empleadas y los resultados obtenidos.

5.2.1.1.1. Acetilación

Cuando la withaferina A (**1**) fue tratada con anhídrido acético y trietilamina en diclorometano, a 0° C y durante 2.5 horas, dio como resultado los compuestos **2** y **3**, con un 73% y un 12% de rendimiento, respectivamente. Cabe destacar, que es la primera vez que se obtiene el derivado monoacetilado en C-27.

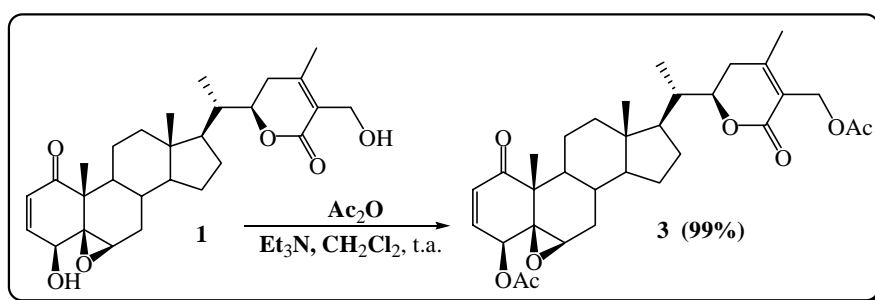


Las estructuras de los compuestos **2** y **3** se determinaron mediante el estudio de sus datos espectroscópicos, observándose en sus espectros de RMN ¹H, el desplazamiento de las señales de H-4 y H-27 a campos más bajos, así como la aparición de las señales correspondientes a uno o dos metilo de grupos acetatos.

Tabla 1. Datos de RMN de ¹H de H-2 y H-4 en los productos **1**, **2** y **3**

Producto	H-4	H-27
1	3.76 (1H, d, J= 5.8 Hz)	4.34, 4.41 (2H, d _{AB} , J= 12.7 Hz)
2	3.76 (1H, d, J= 5.9 Hz)	4.88, 4.92 (2H, d _{AB} , J= 11.9 Hz)
3	4.65 (1H, d, J= 6.0 Hz)	4.85, 4.90 (2H, d _{AB} , J= 12.1 Hz)

Cuando esta misma reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 24 horas, se obtuvo el derivado diacetilado **3** de forma cuantitativa.



5.2.1.1.1.2. Acilación con cloruros de ácidos

Se utilizaron diferentes cloruros de ácidos y anhídridos, que fueron seleccionados para conferir diferentes características estereo-electrónicas y lipofílicas a los derivados, que van a permitir ampliar el estudio de relación estructura-actividad, aportando más información sobre los requerimientos de una withanolida para que tenga un mejor rango terapéutico. Además, cabe destacar que el 50% de los fármacos presentan un grupo aromático en su estructura⁷, que participa, no sólo en interacciones hidrofóbicas (interacciones π - π), sino que también el sistema π puede actuar formando enlaces de hidrógeno⁸, por lo que resulta de gran interés la introducción de un grupo aromático en la molécula y estudiar su efecto en la actividad biológica.

- Derivados **alifáticos**: ácido acético, ácido láurico, ácido octanoico, ácido pivaloico, ácido carbamoico, ácido 2-bromoacético, ácido metil-succínico.
- Derivados **aromáticos**: ácido 1-naftoico, ácido benzoico, ácido furoico, ácido *p*-bromo-benzoico, ácido *N*-metilisatoico, ácido 4-metoxi-benzoico y ácido nicotínico.

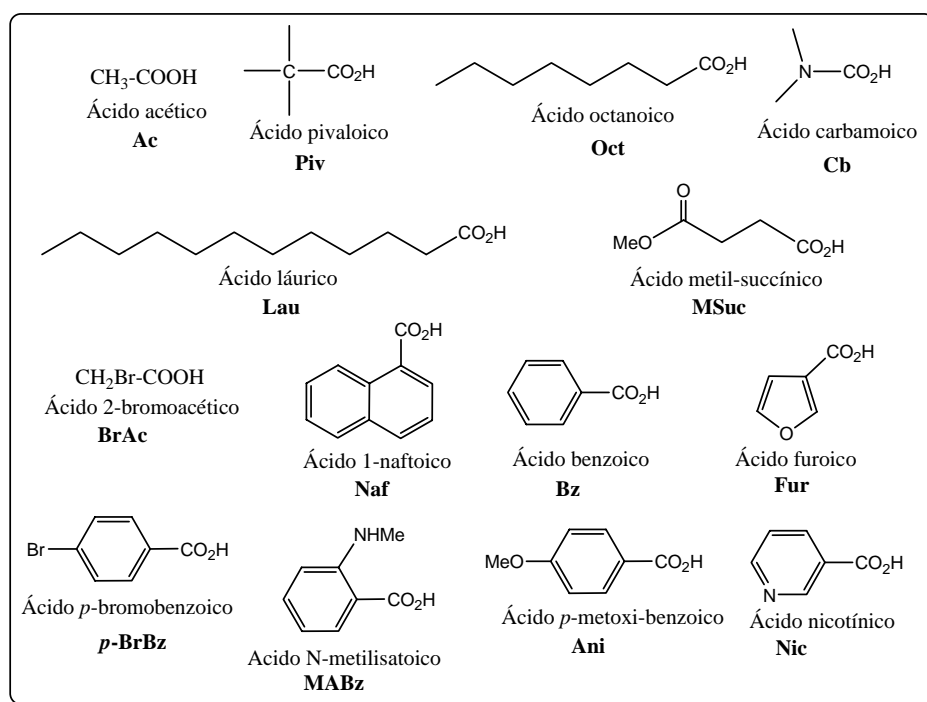


Figura 5.2.2. Ácidos empleados en la esterificación de withanolidas. La abreviatura que emplearemos para cada ácido carboxílico se indica en **negrita**.

⁷ Wermuth, C. G. *The Practice of Medicinal Chemistry*. 2003, Academic Press: Elsevier Science, San Diego.

⁸ Meyer, E. A.; Castellano, R. K.; Diederich, F. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2003, 42 (11), 1210.

Los derivados **4-24** se obtuvieron por tratamiento de la withaferina A con los diferentes cloruros de ácidos y anhídridos seleccionados, usando condiciones de reacción diferentes según la reactividad del cloruro de ácido. Se obtuvo el mono éster sobre el carbono C-27 cuando la reacción se pudo llevar a cabo de forma regioselectiva y el diéster en los carbonos C-4 y C-27 cuando la reacción no se pudo controlar.

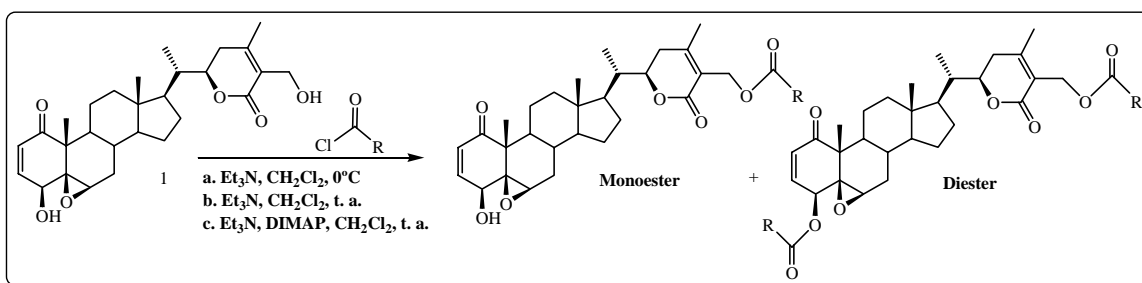
Tabla 2. Reactivos, condiciones de reacción y rendimiento de los ésteres obtenidos a partir de **1**.

Cloruro de ácido	Condiciones de reacción	Acilación en C-27	Acilación en C-4 y C-27
Naf-Cl	Et ₃ N, 0 °C, 3 h	61%	11%
Bz-Cl	Et ₃ N, t. a., 24 h	33%	
Lau-Cl	Et ₃ N, 0 °C, 1.5 h	38%	62%
Piv-Cl	Et ₃ N, 0 °C, 1 h	93%	6%
	Et ₃ N, DIMAP, t. a., 30 min		99%
Oct-cl	Et ₃ N, 0 °C, 2.0 h		61%
Fur-Cl	Et ₃ N, 0 °C, 1.5 h	32%	41%
<i>p</i> -BrBz-Cl	Et ₃ N, 0 °C, 24 h	n.r.	n.r.
	Et ₃ N, t. a., 24 h	n.r.	n.r.
	Et ₃ N, DIMAP, t. a., 4 h	51%	24%
Cb-Cl	Et ₃ N, 0 °C, 24 h	n.r.	
	Et ₃ N, DIMAP, t. a., 48 h	54% ^a	
BrAc-Cl	Et ₃ N, 0 °C, 4.5 h	47%	31%
MABz-Cl	Et ₃ N, 0 °C, 24 h	n.r.	
	Et ₃ N, DIMAP, t. a., 24 h	73%	
Ani-Cl	Et ₃ N, 0 °C, 24 h	n.r.	
	Et ₃ N, DIMAP, t. a., 2.5 h	80%	
Nic-Cl	Et ₃ N, 0 °C, 24 h	n.r.	
	Et ₃ N, DIMAP, t. a., 24 h	73%	
Msuc-Cl	Et ₃ N, 0 °C, 30 min.	45%	50%
	Et ₃ N, t. a., 30 min	0%	99%

n.r. : no reaccionó.

^a Se produce la esterificación en el alcohol secundario sobre C-4

Lo que se intentó en todo momento, fue llevar a cabo acilaciones en las que obtuviéramos tanto el mono como el diéster, para obtener un mayor número de derivados y así más información sobre el papel que juega cada uno de los alcoholes en el cabeza de serie, withaferina A (**1**). Para ello tuvimos presente la mayor reactividad y el menor impedimento estérico que presenta el alcohol primario en C-27 frente al alcohol secundario en C-4, así como la temperatura de reacción. Como método general, las reacciones se intentaban en primer lugar a 0 °C y Et₃N para favorecer la formación del mono éster, si la reacción no marchaba, eran llevadas a cabo a temperatura ambiente, y si aún así no se observaba reacción, añadíamos una cantidad catalítica de DIMAP como catalizador.



El estudio de los datos espectroscópicos de RMN y espectrométricos nos permitió establecer la estructura de los derivados obtenidos. Así los derivados acilados con cadena alifática presentaron como principal característica en su espectro de RMN ¹H, el desplazamiento de las señales asignadas a H-27 a campos más bajos en los monoésteres, mientras que en los diésteres se observó el mismo comportamiento en el desplazamiento de las señales correspondientes a H-4 y H-27, con respecto al producto de partida **1** (withaferina A). Así mismo se observó la presencia de las señales características de la cadena alifática del éster introducido.

Los derivados con ésteres aromáticos presentaron además, las señales correspondientes a los protones aromáticos, entre 7.00 y 8.00 ppm dependiendo de las características particulares de cada éster, como se muestra en los espectros de protón de los derivados **14** y **15** esterificados con cloruro de *p*-bromo-benzoilo.

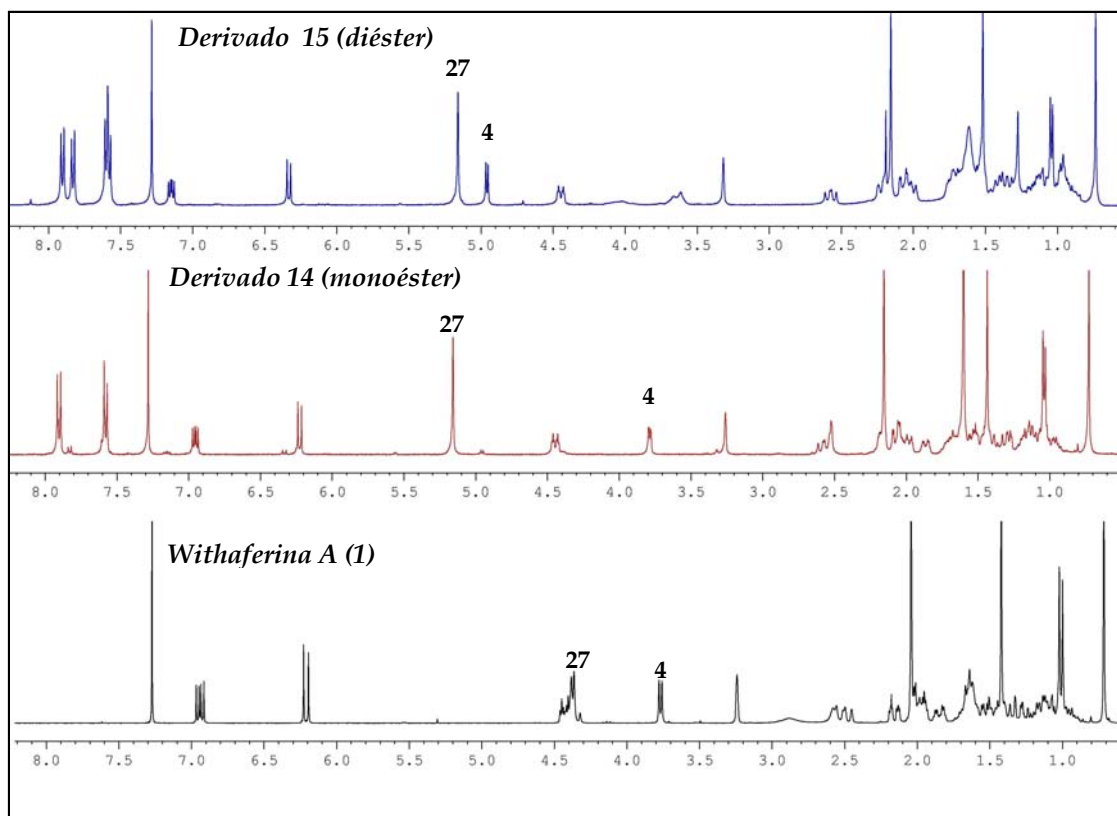
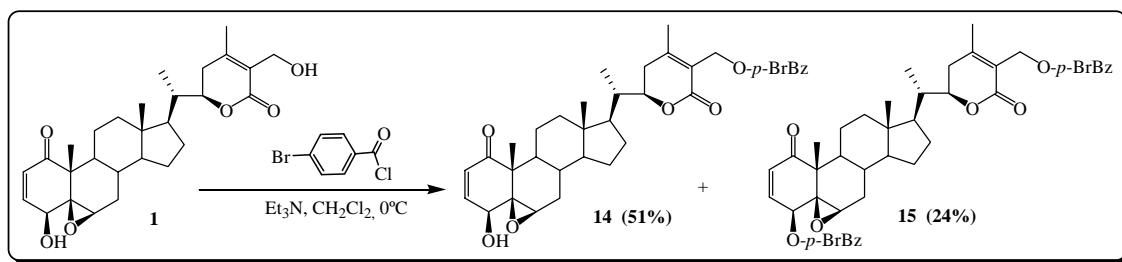
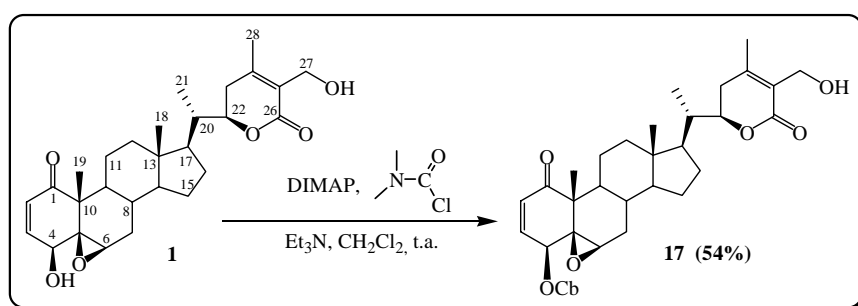


Figura 5.2.3. Espectro de RMN ^1H (CDCl₃, 400 MHz) de withaferina A y sus derivados **14** y **15**.

Cabe destacar que al tratar el compuesto **1** con cloruro de carbamoilo en diclorometano seco, Et_3N y DIMAP y a temperatura ambiente, se obtuvo como único producto el inusual monoéster **17** en el alcohol secundario sobre C-4, a diferencia del resto de reacciones con los cloruros de ácidos, donde se veía favorecida la esterificación del alcohol en C-27 debido a su mayor reactividad y factores estéricos.



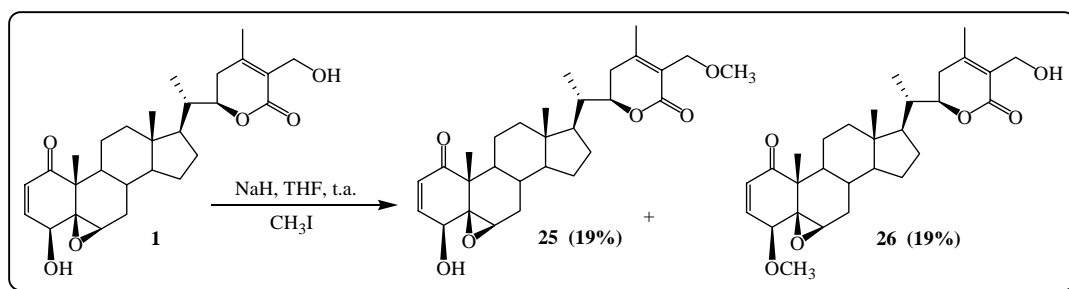
Los derivados obtenidos en este apartado no habían sido descritos con anterioridad en la bibliografía química, a excepción del derivado **14**⁹, sin embargo no se dan todos sus datos de RMN de ¹H y ¹³C, por lo cual incluimos la asignación completa de los datos espectroscópicos de este derivado en la parte experimental de este capítulo.

5.2.1.1.2. Preparación de éteres

Al igual que en el caso de los ésteres, los éteres reducen la posibilidad de la molécula de formar puentes de hidrógeno con la diana a través de los grupos hidroxilos. Suelen presentar una alta hidrofobicidad y no tienden a ser hidrolizados ya que no reaccionan fácilmente, lo que modifica su metabolismo.

5.2.1.1.2.1. Formación de éteres metílicos

El tratamiento de la withaferina A (**1**) con hidruro sódico y yoduro de metilo en tetrahydrofurano (THF) rindió los derivados **25** y **26**.

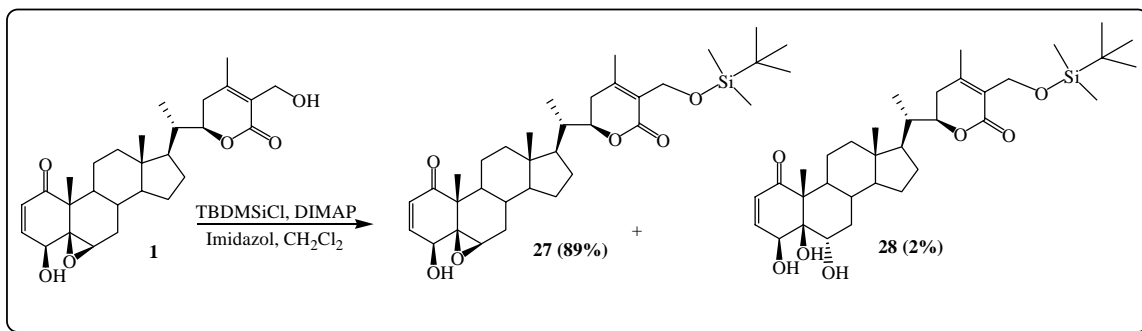


El compuesto **25** presentó como principal característica en su espectro de RMN ¹H un ligero desplazamiento de los protones H-27 (4.18, 4.31 δ_{H}) a campos más altos, al compararlo con el compuesto de partida, así como una señal que integra para tres protones a δ 3.40, correspondiente al grupo metoxilo. Así mismo, en el compuesto **26**, se observó el desplazamiento de la señal asignada a H-4 (3.28 δ_{H}) a campos más altos y la señal de un grupo metoxilo a δ 3.47.

⁹ Kupchan, S. M.; Anderson, W. K.; Bollinger, P.; Doskotch, R. W.; Smith, R. M.; Saenz-Renaud, J. A.; Schnoes, H. K.; Burlingame, A. L.; Smith, D. H. *J. Org. Chem.* **1969**, *34*(12), 3858.

5.2.1.1.2.2. Formación de éteres de silicio

La formación del éter de silicio con cloruro de *tert*-butil-di-metilsililéter (TBDMS-Cl) de la withaferina A (**1**), según se describe en el esquema¹⁰, rindió el derivado **27**, sililado sobre el hidroxilo en C-27 con alta regioselectividad (95%) y como compuesto minoritario **28**, producto de la apertura del epóxido C5-C6, además de la formación del éter de silicio en el hidroxilo primario.



La estructura de los derivados **27** y **28**, al igual que la del resto de derivados fue determinada mediante el estudio de sus datos espectroscópicos de RMN. En el espectro de RMN ¹H del compuesto **27** se observaron dos singuletes a δ 0.08 (6H) y 0.88 (9H), correspondientes a los metilos del silano, así como el desplazamiento a campos más bajos de los protones H-27 con respecto a **1**. Por otra parte, el espectro de RMN ¹H del compuesto **28** presentó como principal diferencia con respecto al derivado **27** el desplazamiento a campos más bajos de H-4 a δ 4.73 (1H, d, J = 4.1 Hz) y de H-6 a δ 4.14 (1H, s). El mismo efecto se observó en su espectro de RMN ¹³C, donde los carbonos C-5 (δ 75.5) y C-6 (δ 74.9) se desplazan en más de 12 ppm y el carbono C-4 (δ 75.2) en 5.5 ppm respecto al derivado **27**.

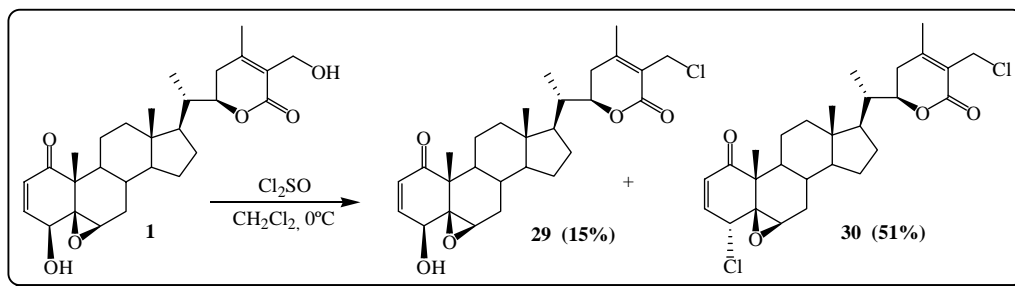
5.2.1.1.3. Halogenación

Los halógenos confieren una marcada influencia en la actividad biológica de los compuestos orgánicos. Así, uno de cada tres fármacos posee un átomo halogenado, por lo que la introducción de halógenos en la molécula resulta una buena estrategia para potenciar la actividad de un cabeza de serie.

¹⁰ Bilodeau, F.; Dube, L.; Deslongchamps, P. *Tetrahedron*. 2003, 59, 2781.

5.2.1.1.3.1. Reacción con cloruro de tionilo

Con el objetivo de sustituir los grupos hidroxilos por átomos de cloro, se hizo reaccionar el producto natural **1** con 1.5 equivalentes de cloruro de tionilo¹¹ en diclorometano y a temperatura ambiente, dando lugar a la formación del derivado **29**, clorado en C-27 como producto minoritario y el derivado **30**, diclorado en las posiciones C-4 y C-27 con un rendimiento moderado.



La formación de los correspondientes derivados clorados fue confirmada mediante sus datos espectroscópicos. En el espectro de RMN ^1H del derivado **29** se observó que la señal de los protones H-27 mantenía su desplazamiento químico, con respecto al del producto de partida, pero su multiplicidad pasaba de ser un doblete AB a un doblete AM a δ 4.34, 4.44 (2H, $J = 11.3$ Hz) y en su espectro de RMN ^{13}C se observó que la señal de C-27 se desplazaba a campos más altos (δ 37.1).

El compuesto **30** mostró la misma tendencia en los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C que **29**, mostrando como principal diferencia el desplazamiento de la señal asignada a H-4 (δ_{H} 4.05) y a C-4 a (δ_{C} 58.1), indicando la sustitución del OH-4 por un átomo de cloro, lo que se corroboró por espectrometría de masas al observar un ión molecular a 529 m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ que se corresponde con una fórmula molecular de $\text{C}_{28}\text{H}_{36}\text{O}_4\text{Cl}_2\text{Na}$, así como un pico dos unidades superior al ión molecular (531 m/z), característico de compuestos halogenados y que se corresponde con los isótopos del cloro. La configuración relativa del sustituyente sobre C-4 fue establecida como α ya que se observó efecto ROE de H-4 con el Me-19 en un experimento ROESY.

¹¹ Krishna, T. R.; Jayaraman, N. *Tetrahedron*. **2004**, *60*, 10325.

Tabla 3. Datos más significativos de RMN de ^1H y ^{13}C de los productos **1**, **29** y **30**

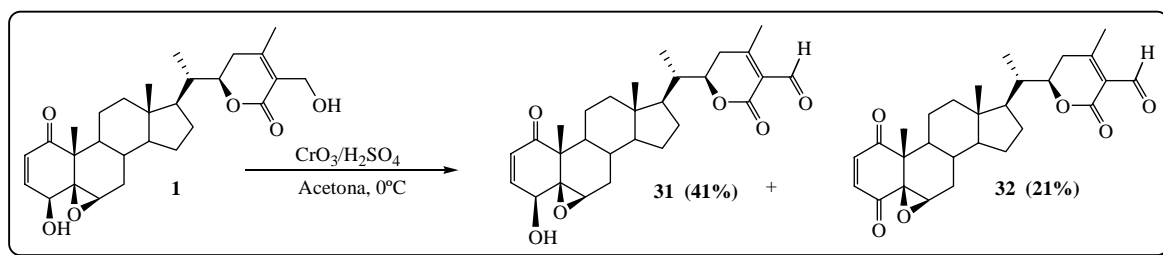
Producto	RMN ^1H		RMN ^{13}C	
	H-27	H-4	C-27	C-4
1	4.34, 4.41 (2H, d_{AB} , $J=12.7$ Hz)	3.76 (1H, d, $J=5.8$ Hz)	57.5 t	69.9 d
29	4.34, 4.44 (2H, d_{AM} , $J=11.3$ Hz)	3.77 (1H, dd, $J=2.2, 5.9$ Hz)	37.1 t	69.9 d
30	4.34, 4.44 (2H, d_{AM} , $J=11.0$ Hz)	4.05 (1H, d, $J=6.3$ Hz)	37.1 t	58.1 d

5.2.1.1.4. Reacciones de oxidación

El cambio de un grupo hidroxilo a su correspondiente carbonilo conlleva el cambio del carácter de este grupo frente a una posible formación de enlaces de hidrógeno, ya que pasa de ser dador y aceptor de enlaces de hidrógeno a únicamente aceptor, lo que nos da información sobre la implicación del grupo hidroxilo libre en la molécula.

5.2.1.1.4.1. Reacción con Reactivo de Jones

La reacción del compuesto **1** con el reactivo de Jones (trióxido de cromo en ácido sulfúrico acuoso)¹² dio como compuesto mayoritario **31**, producto de la oxidación del alcohol primario en C-27 a aldehído y como producto minoritario el derivado **32**, oxidado igualmente en C-27 a aldehído y en C-4 a cetona.



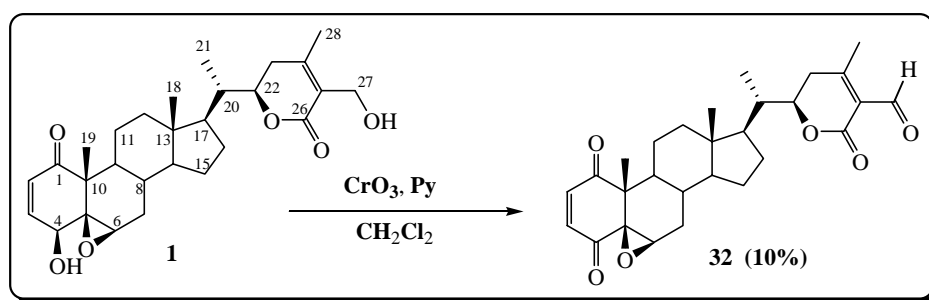
Las estructuras de los derivados **31** y **32**, fue determinada por el estudio de sus datos espectroscópicos. El espectro de RMN ^1H del producto **31** mostró una señal que integraba para un protón a δ 10.20, así como la desaparición de la señal de los hidrógenos metilénicos H-27. En su espectro de RMN ^{13}C se observó un carbono doblete a δ 190.7 (C-27) y la desaparición del carbono triplete a δ 57.5 (C-27), presente

¹² Djerassi, C.; Engle, R.; Bowers, A. J. *Org. Chem.*, **1956**, 21, 1547.

en el producto **1**. Estos datos fueron confirmados con los experimentos bidimensionales heteronucleares, HMBC y HSQC. Los espectros de RMN del compuesto **32** fueron semejantes al del producto **31**, presentando como principal diferencia la desaparición de las señales correspondientes al alcohol secundario sobre C-4 en **31** y la presencia de un carbono carbonílico a δ_C 193.6 como singulete.

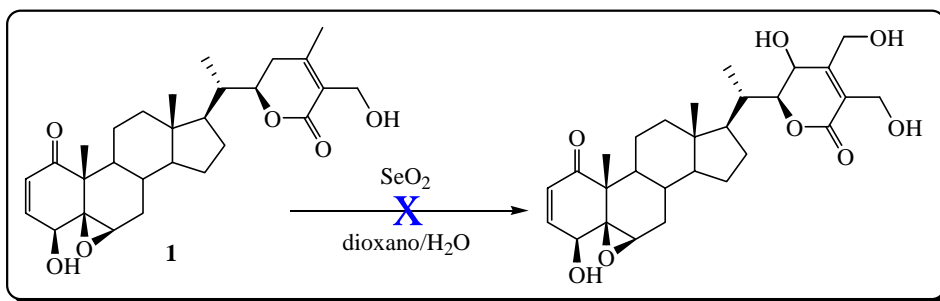
5.2.1.1.4.2. Reacción con Reactivo de Collins

La oxidación de Collins (CrO_3 en piridina)¹³ del compuesto **1**, rindió un compuesto cuyos datos de RMN fueron coincidentes con los del derivado **32**.



5.2.1.1.4.3. Reacción con SeO_2

Con el objetivo de realizar la oxidación alílica en los carbonos C-23 y C-28 de la withaferina A (**1**), se hizo reaccionar una disolución de **1** en dioxano/agua con 3 equivalentes de dióxido de selenio (SeO_2) a temperatura ambiente durante tres días. Sin embargo, se recuperó el producto de partida, lo mismo ocurrió cuando llevamos a cabo la reacción a reflujo a 90 °C durante 24 horas.



¹³ Harris, P. W. R.; Woodgate, P. D. *Tetrahedron*, **2000**, 56(24), 4001.

5.2.1.2. Transformaciones de los dobles enlaces de la withaferina A (1).

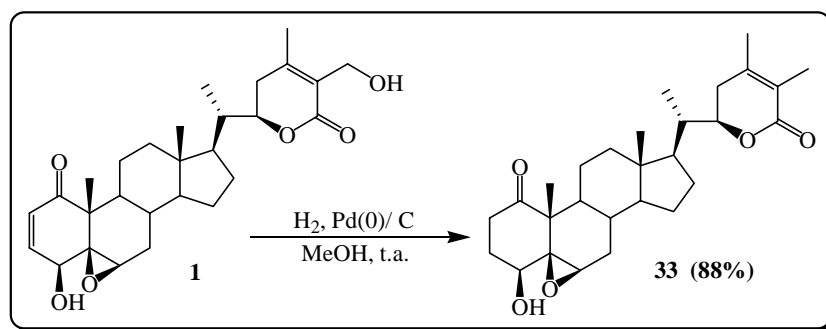
La presencia de un doble enlace le confiere una mayor rigidez a la estructura de una molécula, así como la posibilidad de generar a través de éstos, interacciones de tipo Van der Waals con la molécula diana o receptor. Para evaluar su posible implicación, se llevaron a cabo diversas modificaciones en los dobles enlaces de la estructura de la withaferina A (1), con el objetivo de ver la influencia de este grupo funcional en la actividad, así como evaluar la introducción de distintos heteroátomos en esta región de la molécula.

5.2.1.2.1. Hidrogenación

La hidrogenación de la withaferina A se llevó a cabo siguiendo dos métodos, que pasamos a comentar a continuación.

5.2.1.2.1.1. Hidrogenación con paladio sobre carbón activo al 10%

Aunque la reacción de hidrogenación catalítica con paladio ya ha sido realizada en varias ocasiones, nos propusimos llevar a cabo la hidrogenación catalítica con el fin de disponer de un mayor número de compuestos con el que llevar a cabo el estudio de relación estructura-actividad. La reacción de 1 con paladio sobre carbono al 10% y atmósfera de hidrógeno dio como resultado el derivado 33, en el cual se hidrogenó regioselectivamente el doble enlace disustituido C2-C3 y se eliminó el grupo hidroxilo en C-27 por hidrogenólisis¹⁴.



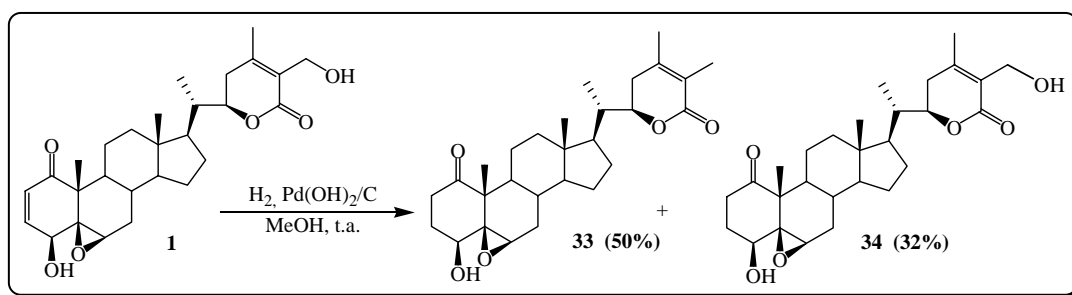
La estructura del derivado 33 fue determinada por el estudio de sus datos espectroscópicos. En sus espectros de RMN de ¹H y ¹³C, se observó la desaparición de las señales del doble enlace de la enona y del alcohol primario en C-27 presentes en 1,

¹⁴ Lavie, D.; Glotter, E.; Shvo, Y. *J. Org. Chem.* **1965**, 30(6), 1774.

así como la presencia de señales correspondientes a un metilo sobre doble enlace adicional a $1.88 \delta_{\text{H}}$ (3H, s) y $12.5 \delta_{\text{C}}$ (c, C-27) y dos metilenos a $26.4 \delta_{\text{C}}$ (t, C-3) y $31.8 \delta_{\text{C}}$ (t, C-2).

5.2.1.2.1.2. Hidrogenación con hidróxido de paladio sobre carbón activo al 20%

La reducción catalítica con $\text{Pd}(\text{OH})_2$ del compuesto **1**, rindió como productos de reacción los derivados **33** y **34**.



Los espectros de RMN del derivado **34** presentaron como principal diferencia con respecto al producto de partida **1**, la desaparición de las señales del doble enlace C2-C3.

Tabla 4. Datos de RMN de ^1H de H-2, H-3, H-4 y H-27 en los productos **1**, **33** y **34**

Prod	H-2 (δ_{H})	H-3 (δ_{H})	H-4 (δ_{H})	H-27 (δ_{H})
1	6.21 (1H, d, $J=10.0$ Hz)	6.94 (1H, dd, $J=5.8, 10.0$ Hz)	3.76 (1H, d, $J=5.9$ Hz)	4.34, 4.41 (2H, d_{AB} , $J=12.4$ Hz)
33	2.65 (1H, m) 2.51 (1H, m)	2.12 (1H, m) 2.02 (1H, m)	3.51 (1H, t, $J=3.7$ Hz)	1.88 (3H, s)
34	2.68 (1H, m) 2.52 (1H, m)	2.13 (1H, m) 2.01 (1H, m)	3.53 (1H, t, $J=3.7$ Hz)	4.35, 4.40 (2H, d_{AB} , $J=12.5$ Hz)

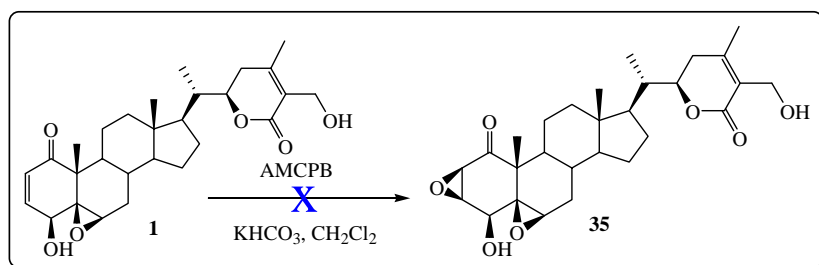
5.2.1.2.2. Reacciones de epoxidación

Los epóxidos son grupos funcionales muy reactivos ya que están formados por ciclos muy tensionados e interactúan con la molécula diana a través de enlaces covalentes muy difíciles de romper.

5.2.1.2.2.1. Epoxidación con ácido *m*-cloro-perbenzoico

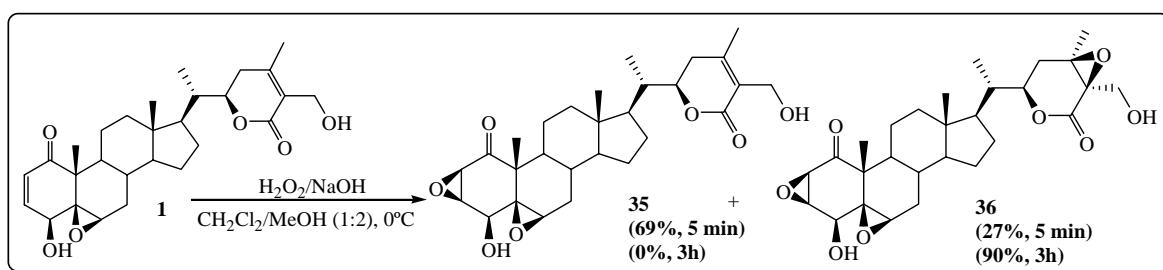
Con el objetivo de transformar regioselectivamente el doble enlace de **1** en un epóxido, se trató la withaferina A (**1**) con 1 equivalente de ácido *m*-cloroperbenzoico

(AMCPB) y 1 equivalente de KHCO_3 , a temperatura ambiente¹⁵ y durante 24 horas, recuperándose todo el producto de partida transcurrido este tiempo. Lo mismo ocurrió cuando llevamos a cabo la reacción con un exceso de ácido *m*-cloroperbenzoico y KHCO_3 .



5.2.1.2.2. Epoxidación con agua oxigenada e hidróxido sódico

En 1981 Pelletier y colaboradores¹⁶ aislaron de *Physalis viscosa* el compuesto **35**, siendo la única referencia que existe sobre derivados de la withaferina A con epóxido en los carbonos C2-C3. Este producto **35** no ha sido evaluado por su actividad biológica, por lo que consideramos oportuno su preparación y posterior evaluación.



Al hacer reaccionar el compuesto **1** con H_2O_2 y una disolución de NaOH (4N) durante 3 horas, se obtuvo como único producto el diepóxido **36**, con un rendimiento del 90%. Sin embargo, al llevar a cabo la reacción, en las mismas condiciones, pero reduciendo el tiempo de reacción a 5 minutos, se obtuvieron los derivados **35** y **36**.

En el análisis de los datos espectroscópicos de los compuestos **35** y **36**, se observa la aparición de señales asignables a grupos epóxido, así como la ausencia de las señales de los dobles enlaces con respecto al producto de partida **1**.

¹⁵ Khalaf, J.K.; VanderVelde, D.G.; Datta, A. *J. Org. Chem.* **2008**, 73(15), 5977.

¹⁶ Pelletier, S.W.; Gebeyehu, G.; Nowacki, J.; Mody, N.V. *Heterocycles.* **1981**, 15(1), 317.

Tabla 5. Datos de RMN de ^{13}C de C-2, C-3, C-24 y C-25 en los productos 1, 35 y 36

Comp.	C-2 (δ_{C})	C-3 (δ_{C})	C-24 (δ_{C})	C-25 (δ_{C})
1	132.3 d	141.9 d	152.8 s	125.7
35	54.6 d	55.1 d	152.7 s	125.4 s
36	54.6 d	55.1 d	63.0 s	60.4 s

La disposición en β de los grupos epóxidos formados fue confirmada mediante un experimento ROESY, donde se observó como efectos ROE más relevantes los del protón H-3/H-2, H-4 y del protón H-22/H-27, Me-28.

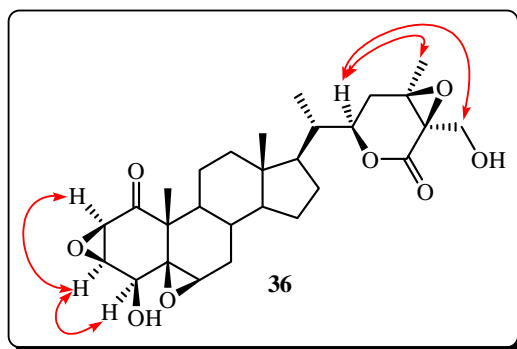


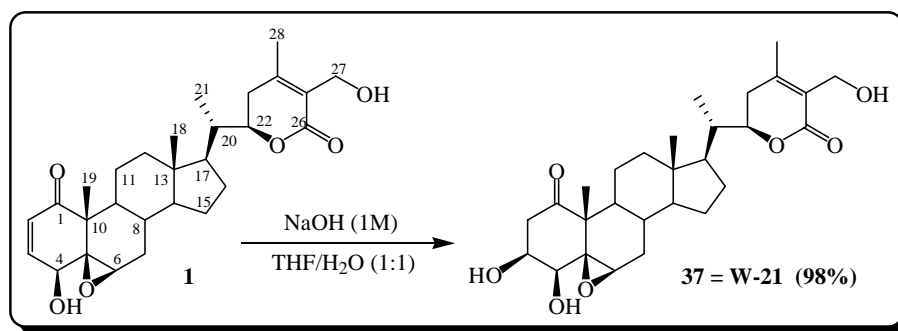
Figura 5.2.4. Efectos ROE observados en el experimento ROESY de 36

5.2.1.2.3. Adiciones conjugadas al doble enlace α,β insaturado de 1

La introducción de grupos polares mejoran la hidrosolubilidad de un compuesto, modificando a su vez su paso através de las membranas biológicas.

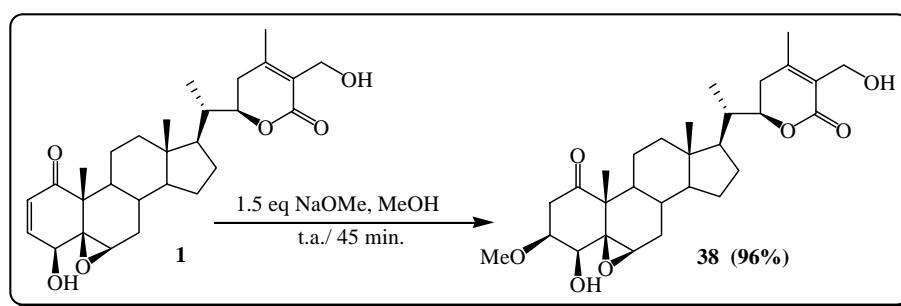
5.2.1.2.3.1. Adición conjugada de agua

Con el objetivo de obtener mayor cantidad para su posterior evaluación biológica del compuesto natural W-21 (37), aislado de *W. aristata*, llevamos a cabo la adición conjugada de agua en la withaferina A. Para ello, el compuesto 1 en las condiciones de reacción que se muestran en el esquema, rindió el derivado 37, cuyos datos espectroscópicos de RMN ^1H y ^{13}C fueron coincidentes con los del producto W-21, obtenido de forma natural. Así, presentó como principales características la desaparición de las señales del doble enlace C2-C3, así como la presencia de señales para un carbono metilénico a 42.1 δ (t, C-2) y un carbono metínico unido a oxígeno a 77.0 δ (d, C-3).



5.2.1.2.3.2. Adición conjugada de metanol

Al llevar a cabo la reacción de **1** con 1.5 equivalentes de NaOMe en metanol durante 45 minutos se obtuvo el derivado metoxilado **38**. Este compuesto ya había sido descrito en la bibliografía química¹⁷, pero no así su actividad biológica.



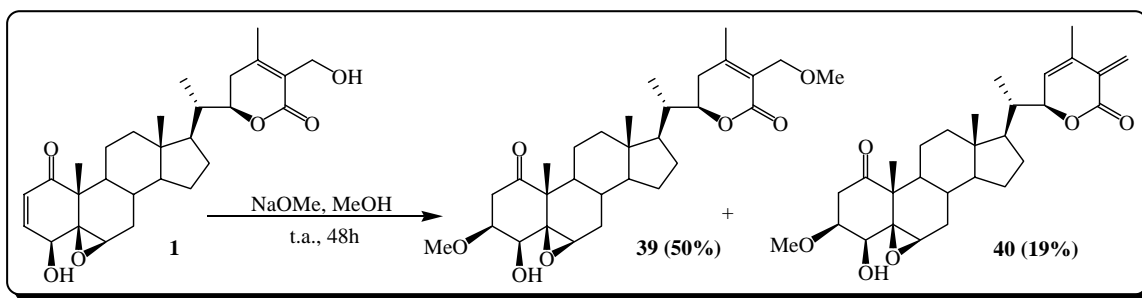
El producto **38** mostró en su espectro de RMN de ^1H , como diferencias más significativas con el producto **1**, la presencia de señales para un grupo metoxilo a 3.36 δ_{H} (3H, s, OMe), un protón oximetínico a 3.72 δ_{H} (m, H-3) y un metileno a 2.63 δ_{H} (dd, $J = 3.8, 15.0$ Hz, H-2) y 3.01 δ_{H} (dd, $J = 6.5, 15.0$ Hz, H-2), así como la desaparición de las señales de los protones vinílicos H-2 y H-3. La disposición del metoxilo sobre C-3 fue asignada como β al observarse correlación en un experimento ROESY entre H-3 y H-4 α .

Al llevar a cabo esta misma reacción pero con 15 equivalentes de NaOMe en metanol y durante 48 horas, se obtuvieron el derivado dimetoxilado **39**¹⁸ y el producto **40**¹⁹, compuestos que ya habían sido descritos anteriormente, pero no así su actividad biológica.

¹⁷ Pelletier, S. William; Mody, Naresh V.; Nowacki, Jacek; Bhattacharyya, J. *J. Nat. Prod.* **1979**, *42*, 512.

¹⁸ Lavie, D.; Glotter, E.; Shvo, Y. *J. Chem. Soc.* **1965**, 7517.

¹⁹ Proksa, B.; Uhrin, D.; Fуска, J. *Pharmazie* . **1986**, *41*, 282.



El producto **39** mostró en su espectro de RMN de ^1H dos nuevas señales asignadas a dos metoxilos a δ 3.38 y 3.40, así como la desaparición de las señales correspondientes a los protones vinílicos H-2 y H-3, presentes en el espectro de RMN ^1H de **1**. La estructura fue confirmada mediante experimentos 2D de RMN heteronucleares (HMBC y HSQC) y la disposición en β del metoxilo sobre C-3 fue asignada al observarse correlación en el experimento ROESY entre H-3 y H-4 α .

En el espectro de RMN ^1H del derivado **40** observamos la presencia adicional, respecto al derivado anterior, de tres protones vinílicos, dos de ellos de un doble enlace exocíclico en C-27 [δ_{H} 5.64 (1H, s) y 6.44 (1H, s), δ_{C} 122.2 (t, C-27)] y el otro protón vinílico asignado a H-23 [δ_{H} 5.69 (1H, s) y δ_{C} 122.0 (d, C-23)], así como una señal de un metoxilo en posición C-3. La estructura de **40** fue confirmada mediante las correlaciones observadas en los experimentos HMBC y COSY (H-2/H-3 y de H-3/H-4).

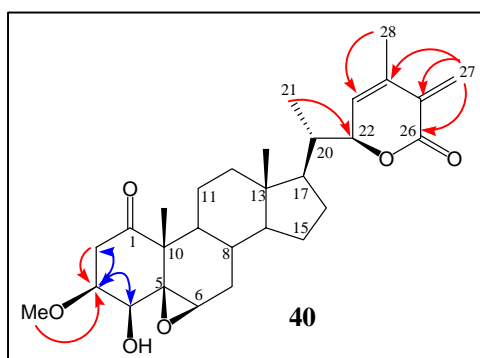
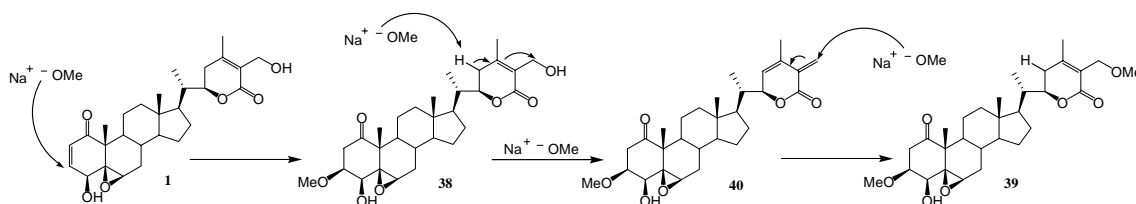


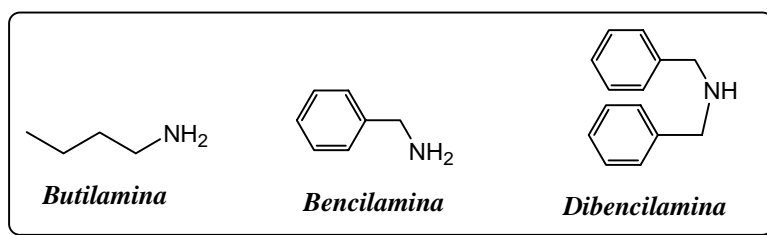
Figura 5.2.5. Correlaciones más significativas observadas en experimentos HMBC (rojo) y COSY (azul) de **40**

En el siguiente esquema se presenta un posible mecanismo de la formación de los productos **39** y **40**.



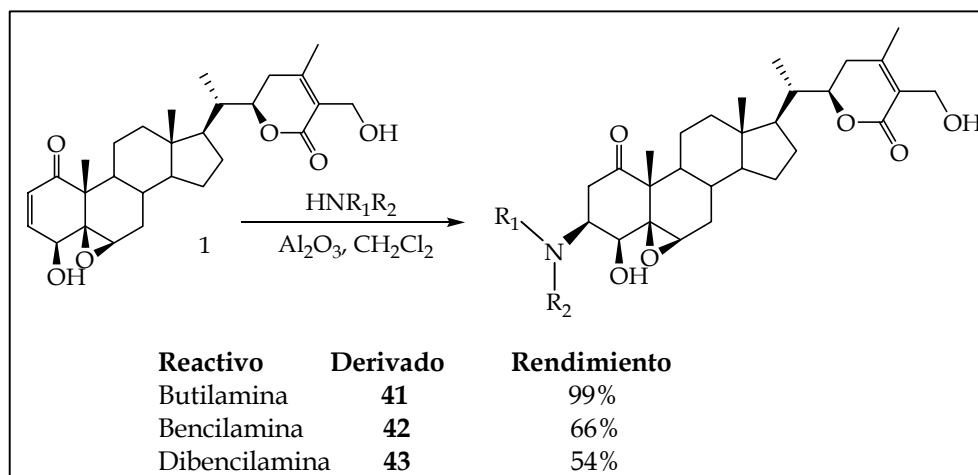
5.2.1.2.3.3. Adiciones conjugadas de aminas

El átomo de nitrógeno confiere propiedades básicas a los compuestos conocidos como alcaloides, por ello, está involucrado en posibles reacciones ácido-base e interacciones mediante enlaces de hidrógeno con un hipotético receptor. Por ello, nos pareció interesante la obtención de derivados de la withaferina A (**1**) con aminas, tanto alifáticas como aromáticas.



Se llevó a cabo la reacción de la withaferina A (**1**) con tres aminas siguiendo el procedimiento descrito por Pelletier y *col.*²⁰ para la adición de aminas secundarias a un doble enlace α,β -insaturado, catalizada por alúmina. Para ello, a una disolución de **1** (1 eq) en CH_2Cl_2 se le añadió Al_2O_3 y la amina correspondiente, obteniéndose en todos los casos y como único producto el de adición de la amina en C-3 con rendimientos de aceptables a muy buenos.

²⁰ Pelletier, S. W.; Gebeyehu, G.; Mody, N. V. *Heterocycles*. **1982**, 19(2), 235.



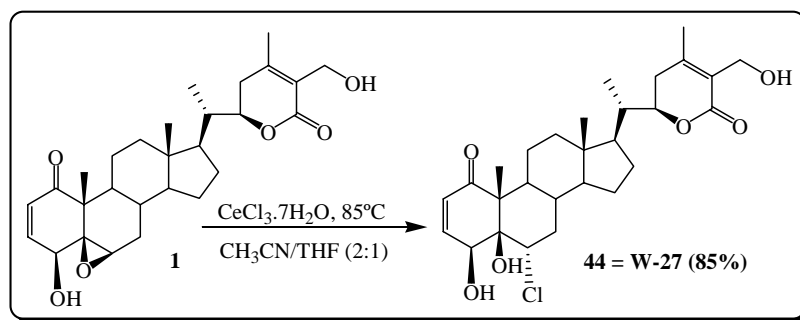
Los derivados **41**, **42** y **43** presentaron como características principales en sus espectros de RMN de ^1H y ^{13}C , la desaparición de las señales correspondientes al doble enlace de la enona y la aparición de señales para un carbono unido a nitrógeno en C-3 y un metileno en C-2, así como las señales correspondientes a los sustituyentes de cada amina adicionada.

Tabla 6. Datos más relevantes de RMN de ^1H y ^{13}C de los productos **1**, **41**, **42** y **43**

Com	H-2 δ_{H}	C-2 δ_{C}	H-3 δ_{H}	C-3 δ_{C}	H-4 δ_{H}	C-4 δ_{C}
1	6.21 (d, $J=10.0$ Hz)	132.3 d	6.94 (dd, $J=5.8, 10.0$ Hz)	141.9 d	3.76 (d, $J=5.8$ Hz)	69.9 d
41	3.11 (dd, $J=5.7, 14.4$ Hz) 2.29 (dd, $J=5.5, 14.4$ Hz)	40.6 t	3.24 (dd, $J=5.7, 9.9$ Hz)	56.9 d	3.39 (d, $J=4.4$)	75.6 d
42	3.15 (dd, $J=5.3, 14.4$ Hz) 2.36 (dd, $J=5.3, 14.4$ Hz)	40.2 t	3.31 (dd, $J=5.5, 9.8$ Hz)	56.3 d	3.41 (d, $J=4.2$ Hz)	75.6 d
43	2.73 (m)	37.5 t	3.39 (m)	58.7 d	3.70 (sa)	74.0 d

5.2.1.3. Apertura del epóxido C5-C6 de la withaferina A (**1**)

A una disolución de cloruro de cerio en acetonitrilo/THF (2:1) se le adicionó 2 equivalentes del compuesto **1** y se dejó agitar a reflujo a $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 18 horas, obteniéndose como único producto de reacción el derivado **44** con buen rendimiento (85%).



Los datos espectroscópicos de RMN ^1H y ^{13}C del derivado **44** coincidieron con los del producto que hemos denominado **W-27**²¹ aislado de forma natural, presentando como principal característica el desplazamiento de los protones H-4 a δ 5.05 (1H, t, $J=2.0$ Hz) y H-6 a δ 4.40 (1H, m) en el espectro de RMN ^1H con respecto al producto de partida.

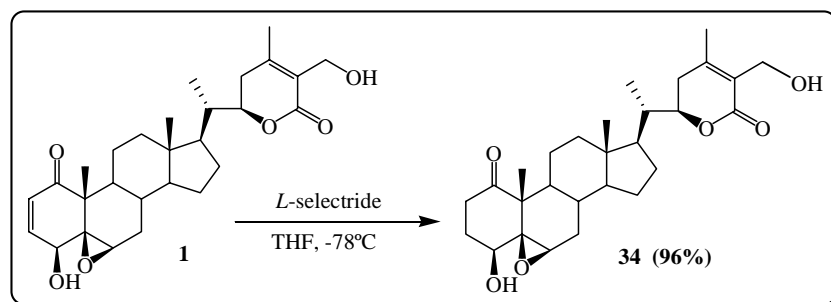
5.2.1.4. Transformaciones de la cetona en C-1

Con el objetivo de ver cual es la implicación de la cetona en C-1 en la actividad biológica de la withaferina A, se llevaron a cabo varios intentos de reducción de la misma al correspondiente alcohol y la formación de la oxima.

5.2.1.4.1. Reacciones de reducción de la withaferina A

5.2.1.4.1.1. Reducción de 1 con *L*-selectride

La reacción de **1** con *L*-selectride²² en las condiciones que se describen en el esquema, rindió como único producto de reacción el derivado **34**, coincidente con el obtenido en la reacción de hidrogenación con $\text{Pd}(\text{OH})_2$ y en el que se produjo la reducción del doble enlace en las posiciones C2-C3.

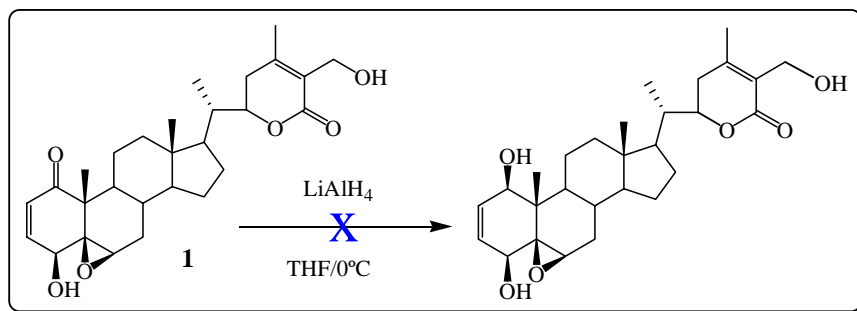


²¹ González, A. G.; Bretón, J. L.; Trujillo, J. M. *An. Quím.* **1974**; 70, 69.

²² Pouzar V; Slavikova T; Cerny I. *Steroids.* **1998**, 63, 454.

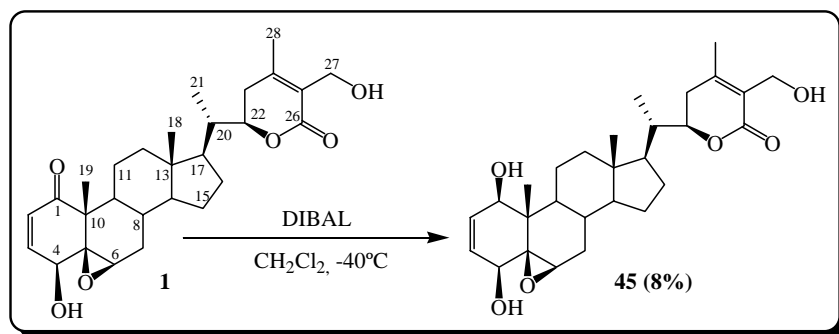
5.2.1.4.1.2. Reducción de 1 con hidruro de aluminio y litio

La reacción de **1** en THF y a 0 °C con hidruro de aluminio y litio (LiAlH₄)²³ dio como resultado la total descomposición del producto de partida, sin llegar a aislarse ningún producto puro.



5.2.1.4.1.3. Reducción de 1 con hidruro de diisobutilaluminio

A una disolución del compuesto **1** en CH₂Cl₂ a -40 °C, le añadimos 1.5 equivalentes de hidruro de diisobutilaluminio (DIBAL) y se agitó durante 2 horas, obteniéndose como producto de reacción el compuesto **45** con un bajo rendimiento (8%). Con el objetivo de aumentar dicho rendimiento, repetimos la reacción en las mismas condiciones pero a temperatura ambiente, obteniéndose incluso así el mismo rendimiento.



El producto **45** mostró en su espectro de RMN ¹H una señal adicional a δ 4.15 (1H, d, *J* = 4.2 Hz, H-1), así como el desplazamiento a campos más bajos de H-4 a δ 3.62 (1H, d, *J* = 5.0 Hz) al compararlo con el espectro de **1**. Ambos protones mostraron correlación con los protones vinílicos H-2 y H-3 en un experimento COSY. En el

²³ Kim, Eunjeong; Ma, Eunsook. *Steroids*. 2007, 72, 360.

espectro de RMN ^{13}C se observó la desaparición del carbono carbonílico C-1 y la aparición de un carbono unido a oxígeno a δ 73.1 (d, C-1). Su estructura fue confirmada mediante experimentos bidimensionales, destacando la correlación entre H-1 y H-9 α , observada en un experimento ROESY, lo que nos permitió establecer la disposición β del hidroxilo sobre C-1.

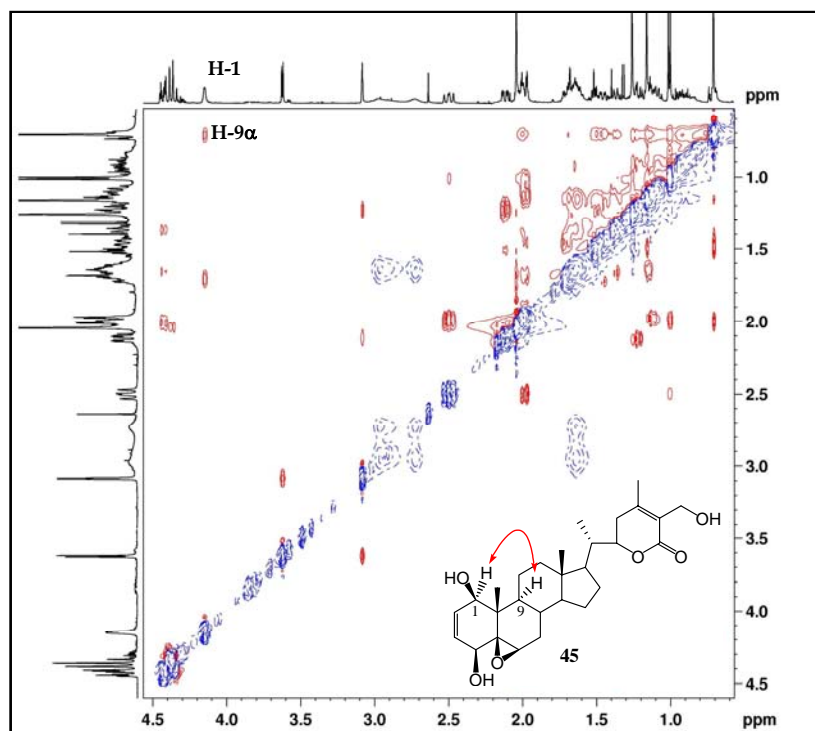
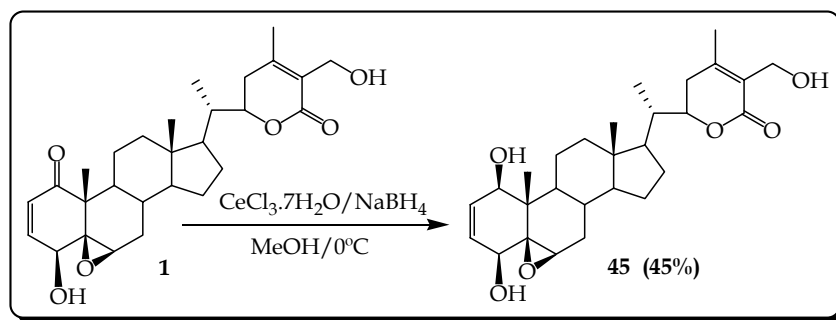


Figura 5.2.6. Ampliación del experimento ROESY del compuesto 45.

5.2.1.4.1.4. Reducción de 1 en condiciones de Luche

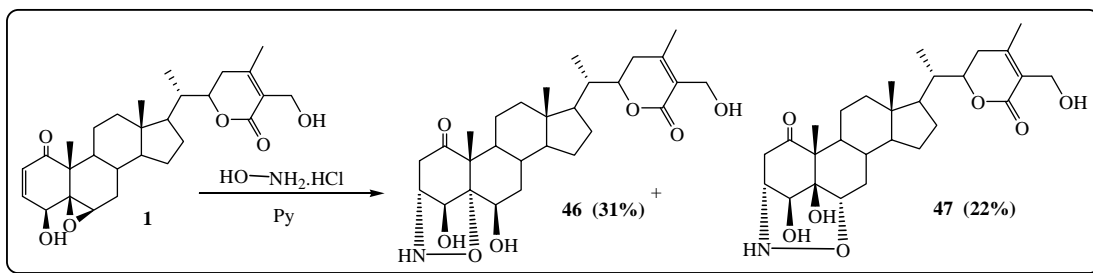
A una disolución de 1 equivalente de withaferina A en metanol se le adicionó 1 equivalente de cloruro de cerio heptahidratado y se enfrió a 0 °C. Posteriormente, se añadió 1.5 equivalentes de borohidruro sódico (NaBH_4)²⁴ y se dejó reaccionar durante 45 minutos, obteniéndose así un derivado (45), cuyos datos espectroscópicos coincidieron con los del compuesto obtenido por reducción de 1 con DIBAL.

²⁴ Jung, M.E.; Piizzi, G. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 2572.



5.2.1.4.2. Formación de la oxima de la withaferina A con hidroxilamina.

Al hacer reaccionar 20 mg de withaferina A (0.04 mmol, 1 equi) con 5 mg de hidrocloreto de la hidroxilamina ($\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$) (0.06 mmol, 1.5 equi) en 1 ml de piridina, bajo atmósfera de argón y a temperatura ambiente durante 2.5 días, obtuvimos los compuestos ciclados **46** y **47**, productos de la adición nucleofílica al epóxido C5-C6 de **1** y la posterior adición conjugada en el carbono C-3.



Las estructuras de los compuestos **46** y **47** fueron establecidas en base a sus datos espectroscópicos y comparación con los del producto de partida **1**. El derivado **46** presentó como características principales en sus espectros de RMN la desaparición de las señales asignables al doble enlace de la enona y el epóxido y la presencia en su espectro de RMN ^{13}C de señales correspondientes a un carbono metilénico a $39.9 \delta_{\text{C}}$ y un carbono metínico a $59.6 \delta_{\text{C}}$, asignadas a C-2 y a C-3, respectivamente. Así mismo, se observó el desplazamiento a campos más bajos de los carbonos C-1 ($213.6 \delta_{\text{C}}$), C-4 ($82.6 \delta_{\text{C}}$), C-5 ($79.1 \delta_{\text{C}}$) y C-6 ($74.4 \delta_{\text{C}}$).

Su espectro de masas (ESI/MS-AR) mostró un ión molecular de $526 m/z$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, que corresponde a una fórmula molecular para el compuesto **46** de $\text{C}_{28}\text{H}_{41}\text{NO}_7$, indicando la presencia en la molécula de un átomo de nitrógeno.

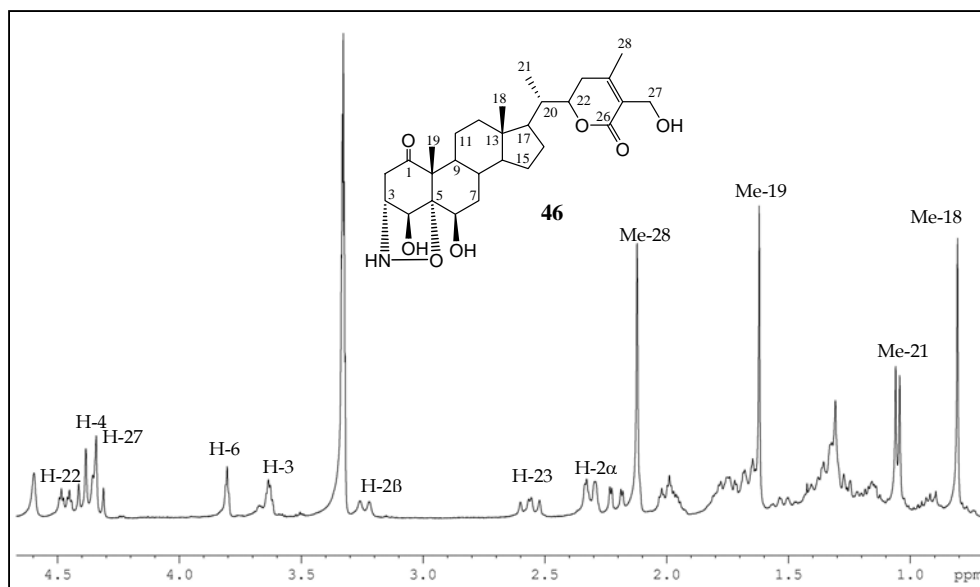


Figura 5.2.7. Espectro de RMN ^1H del compuesto **46**.

La regiosustitución en la molécula fue determinada tras un cuidadoso análisis del experimento HMBC, en el que se observaron correlaciones de H-2/C-1, C-3, C-4, C-10; de H-4/C-2, C-6, C-10; de H-6/C-4, C-5, C-8, C-10 y del Me-19/C-1, C-5, C-9, C-10. La estereoquímica relativa en los carbonos C-3, C-5 y C-6 fue confirmada mediante un experimento ROESY y modelización molecular²⁵, donde se observó correlación del Me-19 (1.62 δ_{H}) con H-2 β (3.24 δ_{H}) y de éste último con H-3 (3.63 δ_{H}); así como correlación entre H-4 α (4.36 δ_{H}) y H-6 (3.80 δ_{H}). Ello nos permitió establecer la disposición de los sustituyentes sobre C-3 y C-5 como α y la del grupo hidroxilo como β .

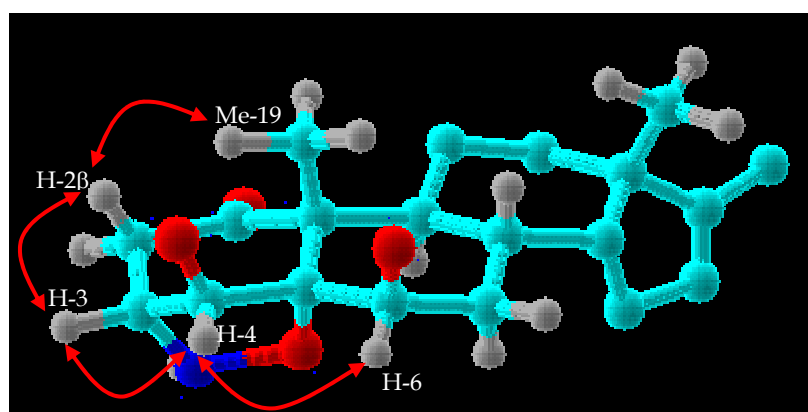


Figura 5.2.8. Correlaciones observadas en el experimento ROESY de **46**.

²⁵ PC Model from Serena Software, P. O. Box. 3076, Bloomington, IN 47402-3076.

El derivado **47** presentó como principales diferencias con el compuesto **46** en su espectro de RMN ^1H el desplazamiento a campos más altos del protón H-4 a $3.81 \delta_{\text{H}}$ ($d, J = 4.1 \text{ Hz}$) y en su espectro de RMN ^{13}C se observó la misma tendencia de los carbonos C-4 ($75.2 \delta_{\text{C}}$) y C-5 ($72.9 \delta_{\text{C}}$) que en el caso de **46**, mientras que el carbono C-6 ($82.4 \delta_{\text{C}}$) se desplazó a campos más bajos.

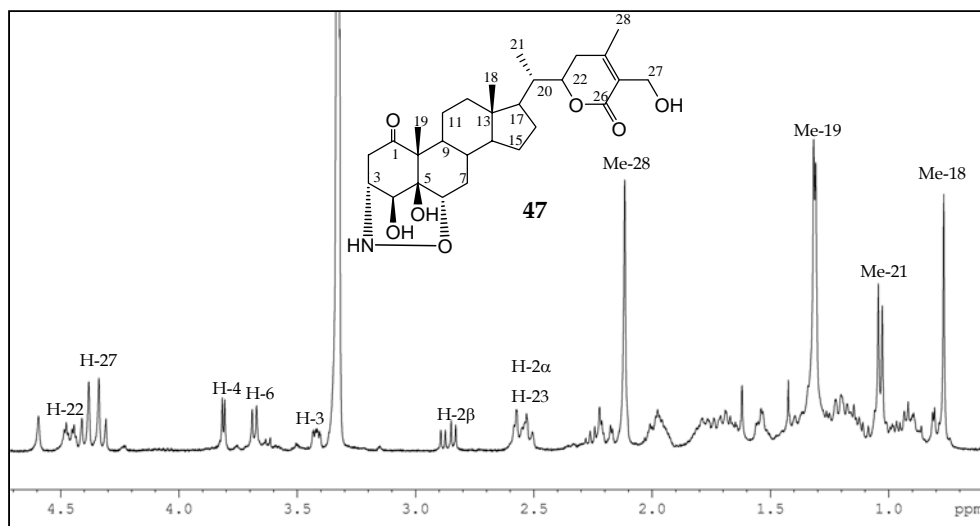


Figura 5.2.9. Espectro de RMN ^1H del compuesto **47**.

Su espectro de masas (ESI/MS-AR) mostró un ión molecular de $526 m/z$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ al igual que el compuesto **46**, lo que indica que los derivados **46** y **47** son isómeros estructurales.

En un experimento bidimensional heteronuclear HMBC se observó como correlaciones más significantes, las de los protones H-2/C-1, C-3, C-4, C-10; H-3/C-1, C-4, C-5; H-4/C-2, C-6, C-10; H-6/C-4, C-7, C-8, C-10 y del Me-19/C-1, C-5, C-9, C-10. Estas correlaciones sugieren que el heterociclo introducido en **47** se encuentra entre los carbonos C3-C6, en lugar de en las posiciones C3-C5 como en el compuesto **46**. La disposición relativa de los grupos funcionales sobre los carbonos C-3, C-4, C-5 y C-6 fue determinada mediante el estudio de las constantes de acoplamiento, modelización molecular²⁵ y un experimento ROESY. Así, se observaron efectos ROE de H-3 ($3.42 \delta_{\text{H}}$) con H-2 ($2.56, 2.86 \delta_{\text{H}}$) y H-4 ($3.81 \delta_{\text{H}}$), indicando que H-3 se encuentra en disposición β ecuatorial. Las correlaciones observadas entre H-8 β y H-7 β y de este último con H-6, indican que el grupo hidroxilo sobre C-6 debe estar en disposición α .

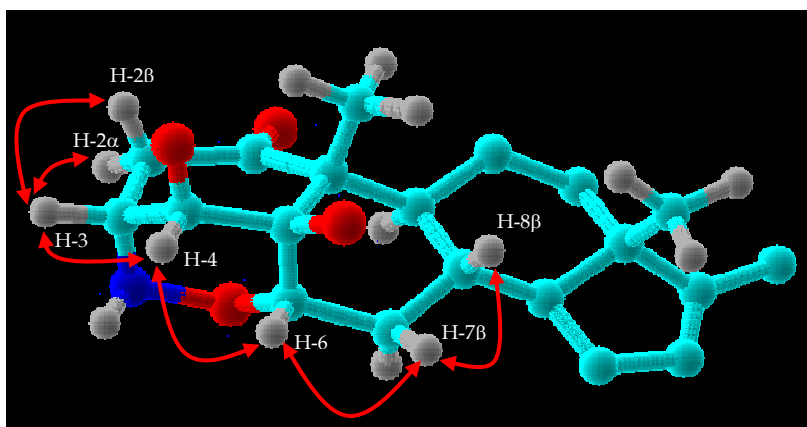


Figura 5.2.10. Correlaciones observadas en el ROESY de **47**.

5.2.1.5. Contracción del anillo A de la withaferina A

Es conocido el efecto que produce sobre la actividad biológica la contracción o expansión de los anillos en una molécula bioactiva. Un ejemplo de la influencia del tamaño del anillo en la actividad lo constituyen los análogos del enalapril, sustancia usada en clínica como hipotensor, donde la actividad inhibidora (CI_{50} Concentración de producto que inhibe el 50% de la enzima) del análogo sobre la enzima sintetizadora de angiotensina es función del tamaño del anillo. Por ello, consideramos ésta como una estrategia en la obtención de análogos de la withaferina A (**1**) más activos o menos tóxicos.

	n	CI_{50} (μM)
	1	19
	2	1.7
	3	0.02
	4	0.005
	5	0.008

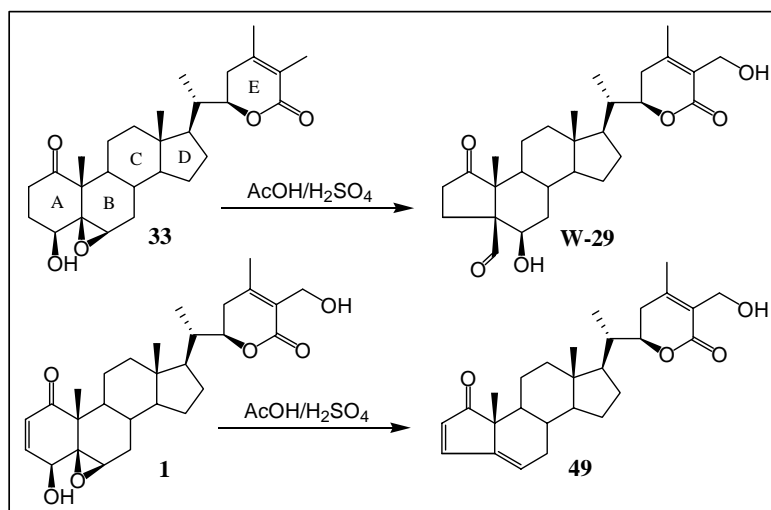
Figura 5.2.11. Actividad hipotensora de análogos de enalapril en función del tamaño del ciclo.

5.2.1.5.1. Contracción del anillo A de **1** con Dowex 50WX8-200

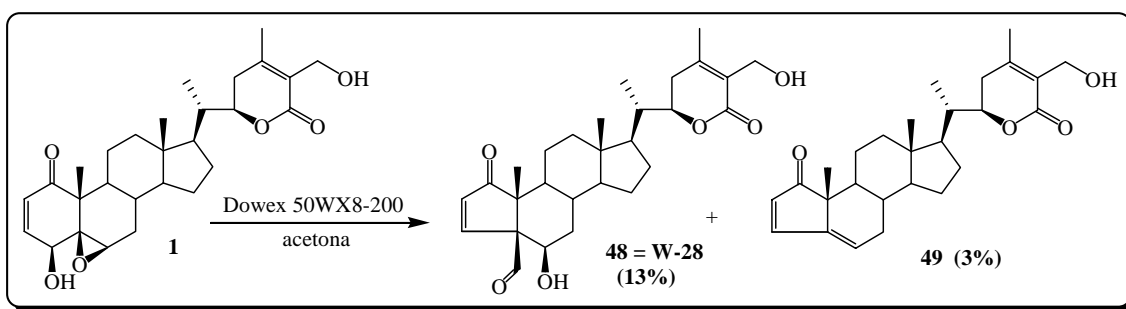
En 1966, Lavie y col.²⁶ llevaron a cabo la contracción del anillo A del 27-deoxi-2,3-dihidrowithaferina A y de la withaferina A, usando una mezcla de AcOH/H₂SO₄,

²⁶ Lavie, D.; Kashrnan, Y.; Glotter, E.; Danieli N. *J. Chem. Soc.* **1966**, 1757.

obteniendo los compuestos que se muestran en el esquema, análogos que no fueron ensayados por su actividad biológica.



Con el objetivo de obtener estos derivados, se añadieron 15 mg de **1** a una suspensión de 130 mg de la resina ácida Dowex 50WX8-200 en acetona y se agitó a temperatura ambiente durante 48 horas. Se obtuvieron como productos de reacción los derivados **48**, no descrito anteriormente y **49**, análogo descrito por Lavie en 1966, ambos con muy bajos rendimientos. Con el fin de aumentar el rendimiento, se repitió la reacción, pero usando en este caso el doble de cantidad de resina Dowex y se dejó la reacción transcurrir durante cinco días, sin que con ello pudiéramos aumentar el rendimiento de los derivados obtenidos.



Podemos proponer como mecanismo de formación de los derivados contraídos en el anillo A el que se muestra en la figura 5.2.12. En primer lugar, se produciría un reagrupamiento en el anillo A de **1** dando el compuesto **48**. Descarboxilación de éste genera el enol correspondiente en C1-C2 y en medio ácido daría el derivado **49** con

cetona α,β -insaturada y doble enlace en las posiciones C5-C6, al producirse la eliminación del grupo hidroxilo en C-6.

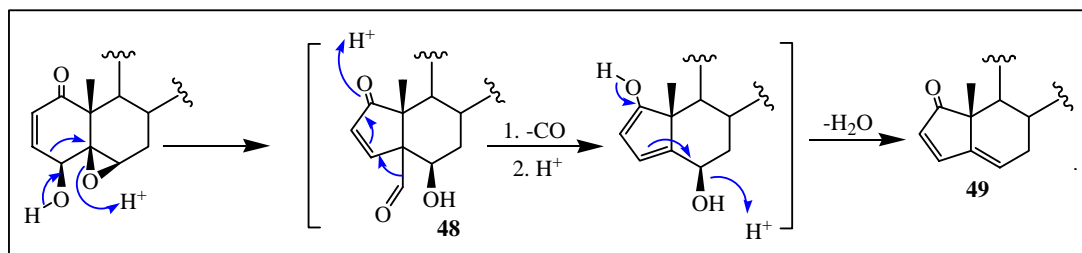


Figura 5.2.12. Mecanismo de reacción propuesto para la formación de los derivados **48** y **49**

Los datos espectroscópicos de RMN del derivado **48** coincidieron con los del producto natural que denominamos **W-28**, aislado de *Withania aristata* y que no ha sido descrito con anterioridad en la bibliografía química.

El producto **49**, como ya hemos dicho, fue sintetizado en 1966²⁶, sin embargo no se dan todos los datos de RMN de ^1H y ^{13}C de este derivado, por lo que se presentan en la parte experimental de esta Memoria. El derivado **49** mostró en su espectro de RMN ^1H señales asignables a tres protones vinílicos, dos de ellos como dobletes, correspondientes a H-2 a 5.98 δ (1H, d, $J = 5.7$ Hz) y H-3 a 7.62 δ (1H, d, $J = 5.7$ Hz) y uno como triplete a 5.81 δ (1H, t, $J = 3.9$ Hz, H-6). Su espectro de RMN ^{13}C mostró señales para 27 carbonos, 6 correspondientes a carbonos vinílicos, dos más que en la withaferina A. La estructura de los anillos A y B en la molécula fue determinada tras un cuidadoso análisis del experimento HMBC, donde se observaron correlaciones de C-1 (211.4 δ_c) y C-5 (147.3 δ_c) con H-2, H-3 y Me-19.

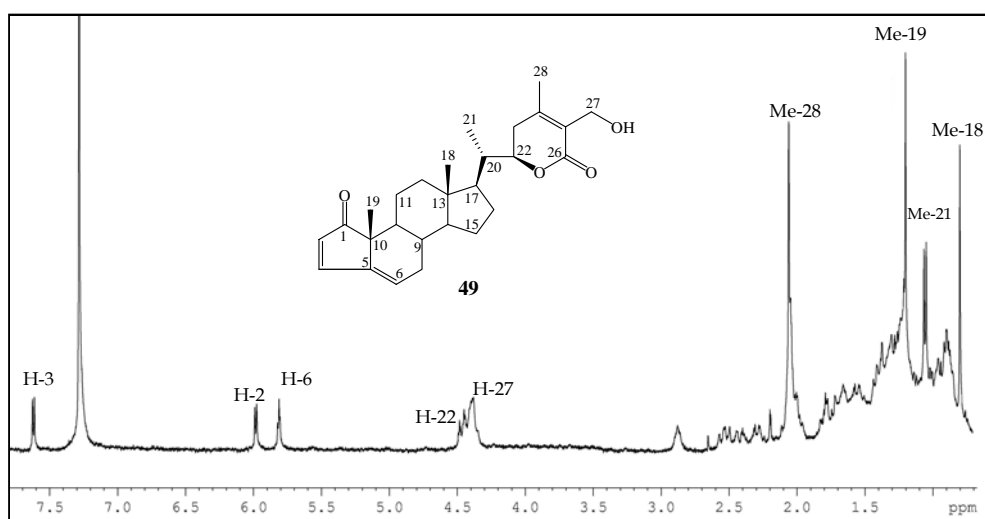


Figura 5.2.13. Espectro de RMN ^1H del compuesto **49**.

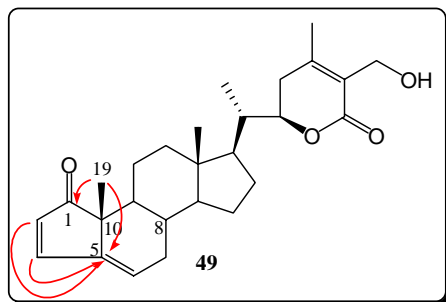
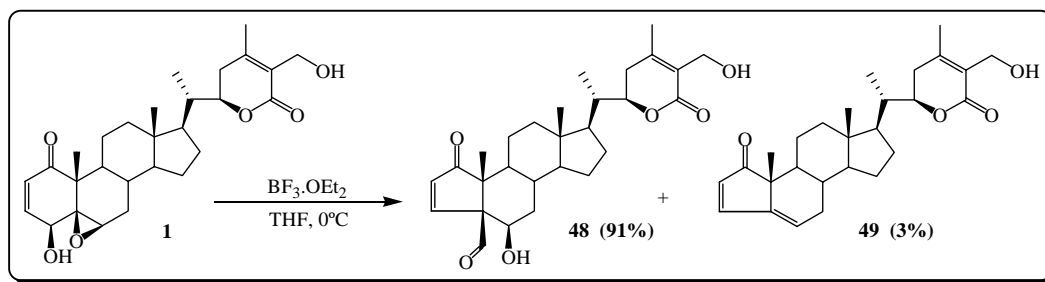


Figura 5.2.14. Correlaciones más significativas observadas en el experimento HMBC de **49**

5.2.1.5.1.2. Contracción del anillo A de 1 con el ácido de Lewis BF_3OEt_2

Con el objetivo de obtener los derivados contraídos en el anillo A anteriores en mayor cantidad, llevamos a cabo la reacción de la withaferina A disuelta en THF con el trifluoruro de boro eterato (BF_3OEt_2) a temperatura ambiente y bajo atmósfera de argón durante 2.5 horas. Se obtuvieron como productos los mismos derivados que en la reacción anterior, **48** y **49**, pero ahora con un alto rendimiento de **48**.

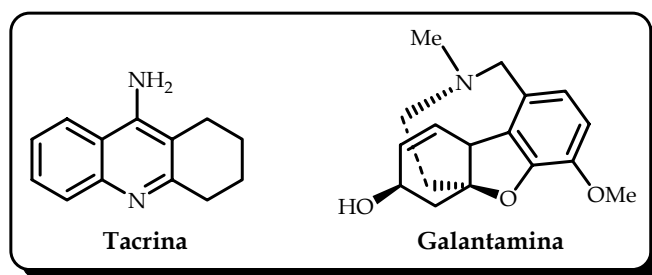


5.2.1.6. Formación de dímeros de la withaferina A

Es bien conocido que la formación de moléculas híbridas, idénticas o no idénticas, puede potenciar la acción de una molécula independiente frente a una actividad biológica. Por ejemplo, dímeros de tacrina²⁷ o galanthamina²⁸ han mostrado mayor actividad inhibidora de la enzima acetilcolinesterasa, implicada en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, que los correspondientes alcaloides libres. Nos propusimos por ello, con idea de potenciar la actividad de la withaferina A, preparar dímeros de este *cabeza de serie*.

²⁷ Pang, Y.; Quiram, P.; Jelacic, T.; Hong, F.; Brimijoin, S. J. *Biol. Chem.* **1996**, 271, 23646.

²⁸ Mary, A.; Renko, D.; Guillou, C.; Thal, C. *Biol. Med. Chem.* **1998**, 6, 1835.



5.2.1.6.1. Formación de dímeros de la withaferina A por metátesis

Como primera estrategia, decidimos preparar dímeros por metátesis, usando los reactivos de Grubbs, a través del alcohol alílico en C-27 de la withaferina A, siguiendo un método semejante al usado en el 2007 por C. Jiménez y *col.* en la preparación de dímeros a hidroximinoesteroides²⁹. El proceso se resume en el siguiente esquema de reacción.

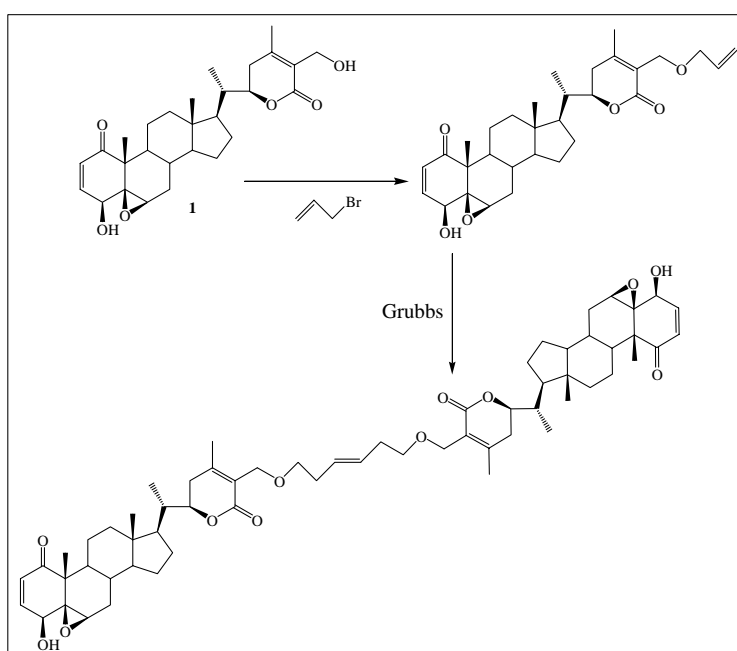
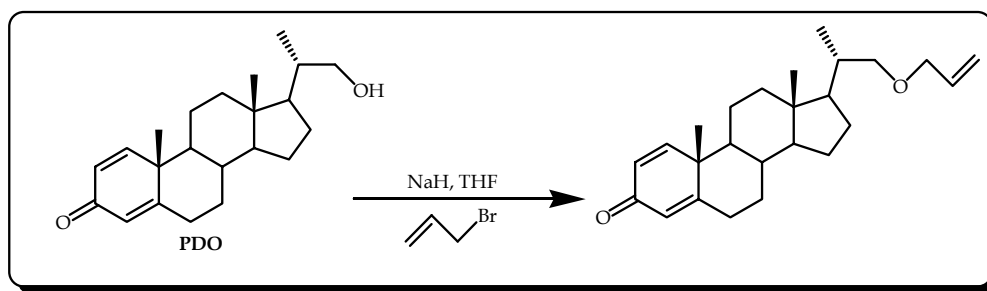


Figura 5.2.15. Esquema de reacción para la obtención de dímeros idénticos de withaferina A

El primer paso, consistiría por lo tanto en la preparación del éter alílico de la withaferina A. Con el objetivo de optimizar las condiciones de reacción, usamos inicialmente como modelo la 20-(hidroximetil)-pregna-1,4-dien-3-ona (PDO), compuesto comercial, que posee una cetona α,β -insaturada y un hidroxilo primario, al igual que nuestro *cabeza de serie*, withaferina A.

²⁹ Rega, M.; Jiménez, C.; Rodríguez, J. *Steroids*. **2007**, 72, 729.



Con el fin de optimizar la preparación del éter alílico, se llevó a cabo la reacción usando diferentes condiciones, con variaciones en el número de equivalentes de los reactivos, la temperatura y el tiempo de reacción. El proceso experimental consistió en añadir a una disolución de hidruro sódico (NaH) en THF, a 0 °C y bajo atmósfera de argón el sustrato (1 eq de PDO). La mezcla de reacción se agitó durante 10 minutos y se dejó reaccionar durante 30 minutos. A continuación, se añadió el bromuro de alilo y se dejó la reacción en las condiciones especificadas en la tabla. El mayor rendimiento en la obtención del correspondiente éter alílico de PDO, se obtuvo usando 6 equivalentes de hidruro sódico y bromuro de alilo a reflujo.

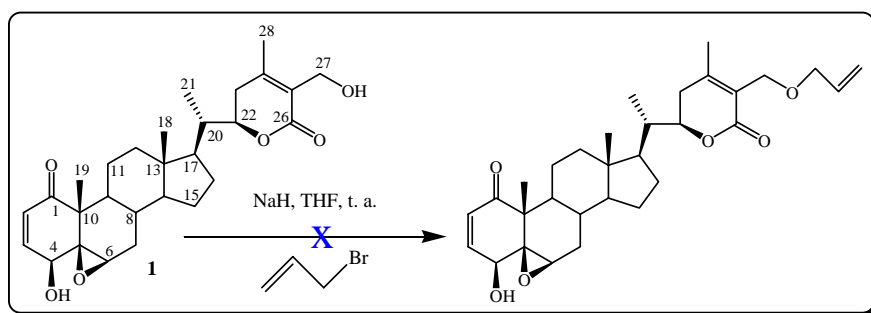
Tabla 7. Condiciones de reacción llevadas a cabo para optimizar la reacción con 1 eq de PDO

N° de equivalentes				
NaH	<chem>CC=CBr</chem>	Temp. (°C)	Tiempo (h)	Rend. (%)
3	1	25	24	33
10	10	25	24	90
6	6	70	15	94

Una vez optimizadas las condiciones de reacción, decidimos llevarla a cabo con la withaferina A, sin proteger el alcohol secundario en C-4, ya que la experiencia obtenida en la preparación de ésteres, que describimos en el apartado 5.2.1.1.2., nos indicaba que podríamos obtener el éter en posición C-27 con un rendimiento aceptable y evitar así cuatro pasos de reacción, ya que el proceso para proteger el alcohol secundario y obtener posteriormente el éter alílico requeriría de cinco etapas:


1. Protección del alcohol primario.
2. Protección del alcohol secundario.
3. Desprotección del alcohol primario.
4. Formación del éter.
5. Desprotección del alcohol secundario.

Se intentó la obtención del éter alílico de la withaferina A, usando las condiciones de reacción de la segunda entrada (tabla 7) ya que son más suaves (25 °C) y se obtiene también un excelente rendimiento (90%). Sin embargo, no se obtuvo el éter alílico esperado.

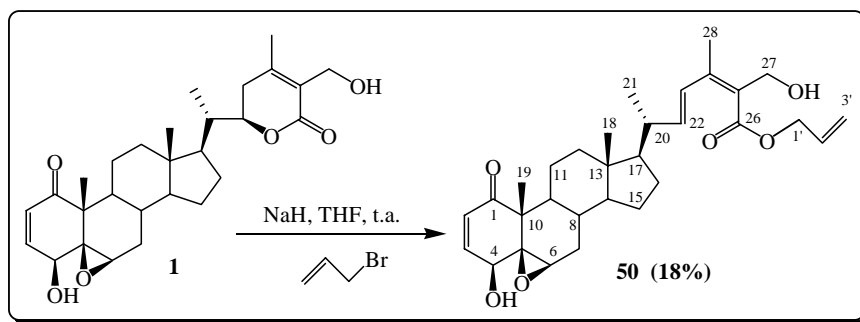


Al variar las condiciones de reacción, tanto en número de equivalentes de los reactivos como en temperatura, disolvente y catalizador, tal y como se recoge en la siguiente tabla, tampoco obtuvimos el compuesto esperado.

Tabla 8. Condiciones de reacción llevadas a cabo con 1 eq de withaferina A (1)

Nº de equivalentes							
Entrada	NaH		Disolv	T (°C)	t (h)	Cataliz.	Rend (%)
1	10	10	THF	25	24		0
2	6	6	THF	70	15		0
3	10	10	THF	25	24	Bu ₄ NI	Mezcla
4	1.5	1.5	THF	25	15	Bu ₄ NI	Mezcla
5	10	10	DMF	25	20		Mezcla
6	1.5	4	DMF	0	20		Mezcla

Así, tanto en las entradas 3 y 4, condiciones en las que se usó como catalizador yoduro de tetrabutilamonio (Bu₄NI), como en las entradas 5 y 6, en las que se usó como disolvente dimetilformamida (DMF), se produjo la descomposición del producto de partida en mezclas complejas imposibles de separar. Con las condiciones de reacción especificadas en las entradas 1 y 2, no se formó el éter alílico de 1, pero se obtuvo como único producto de reacción el derivado 50, producto de la apertura de la lactona con un bajo rendimiento.



Podemos proponer como mecanismo para la formación del derivado **50** el que se presenta en el siguiente esquema. La etapa inicial consistiría en la eliminación de uno de los H-23, en posición α al doble enlace tetrasustituido de la lactona, generando el enolato **a**; regeneración del carboxilo produciría la apertura de la lactona, dando lugar al intermedio **b**, el cual se alquila con bromuro de alilo rindiendo el éster alílico **50**.

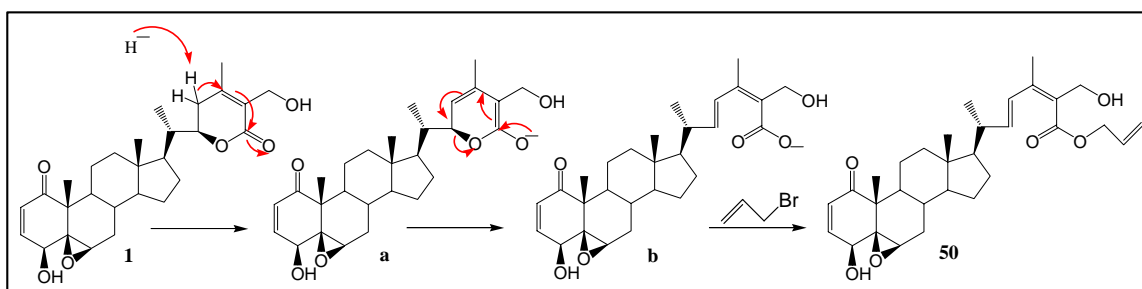


Figura 5.2.16. Propuesta de formación del derivado **50**

El derivado **50** mostró como característica principal en su espectro de RMN ^1H , señales de un sistema ABM a $5.29 \delta_{\text{H}}$ (1H, dd, $J= 1.2, 10.4$ Hz, H-3'), $5.39 \delta_{\text{H}}$ (1H, dd, $J= 1.2, 17.2$ Hz, H-3') y $6.01 \delta_{\text{H}}$ (1H, m, H-2'), correspondiente a los tres protones vinílicos del grupo alilo y señales asignadas a los dos protones metilénicos de éste mismo grupo a $4.73 \delta_{\text{H}}$ (2H, dt, $J= 1.2, 5.7$ Hz, H-1'). También se observaron señales correspondientes a los dos protones del doble enlace disustituido adicional a $5.93 \delta_{\text{H}}$ (1H, dd, $J= 8.9, 15.6$ Hz, H-22) y $6.96 \delta_{\text{H}}$ (1H, d, $J= 15.6$ Hz, H-23). Las características estructurales de la cadena lateral sobre C-20 se establecieron mediante las correlaciones observadas en los experimentos 2D de RMN. Así, en el experimento COSY se observó correlación de H-20 con Me-21 y H-22, y de este último con H-23. En el experimento HMBC se observaron las siguientes correlaciones: H-27/C24, C25, C26; Me-28 y H-23/C-24, C25; H-22/C24; Me-21/C-22; H-1'/C26, C-2', C-3'. Estos datos nos confirman la estructura

del derivado **50** como (22*E*,24*Z*)-5 β ,6 β -epoxi-4 β ,27-dihidroxi-1-oxo-ergosta-2,22,24-trien-26-oato de alilo.

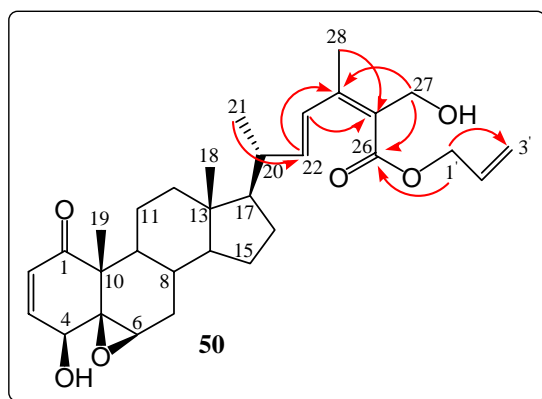
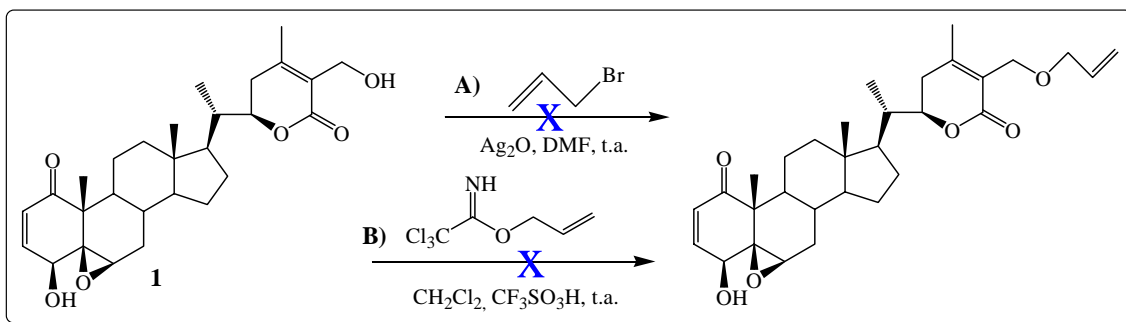


Figura 5.2.17. Correlaciones más significativas observadas en el experimento HMBC de **50**

En otro intento de obtener el éter alílico de **1** (A), se hizo reaccionar un equivalente de **1** en dimetilformamida (DMF) con dos equivalentes de Ag₂O y dos equivalentes de bromuro de alilo^{30,31}. La mezcla de reacción se mantuvo durante 24 horas, bajo atmósfera de argón y a temperatura ambiente, recuperándose totalmente el producto de partida. Lo mismo ocurrió cuando repetimos la reacción pero calentando a reflujo de 80 °C.



Con el mismo objetivo que en los casos anteriores, se intentó la reacción de withaferina A (**1**) en diclorometano a 0 °C, con dos equivalentes de la tricloroacetamida del alcohol alílico y una cantidad catalítica de ácido trifílico durante 1 hora (B)³². A continuación, llevamos a temperatura ambiente y dejamos reaccionar durante 7 horas, recuperándose, al igual que en el caso anterior el producto de partida.

³⁰ Krger, J.; Hoffmann R.W. *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 7499.

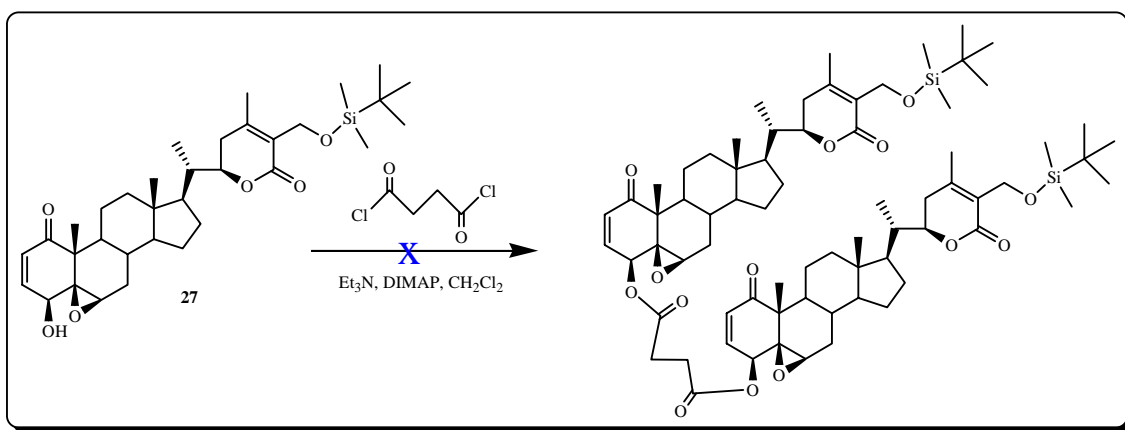
³¹ Quintard, D.; Bertrand, P.; Bachmann, C.; Gesson, J.P. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 4762.

³² Hanessian, S.; Yang, G.; Rondeau, J.; Neumann, U.; Betschart, C.; Tintelnot-Blomley, M. *J. Med. Chem.* **2006**, 49(15), 4544.

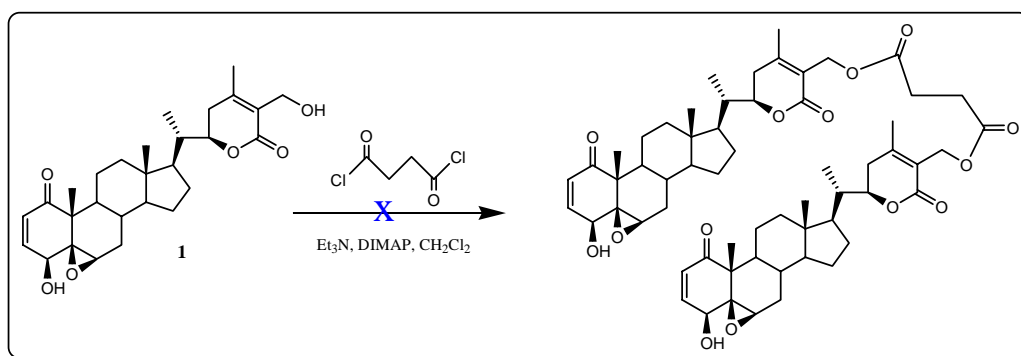
5.2.1.6.2. Formación de dímeros de la withaferina A vía diésteres

Dado que la formación del dímero de withaferina A por metátesis no dio los resultados esperados, nos propusimos preparar estructuras diméricas vía diéster.

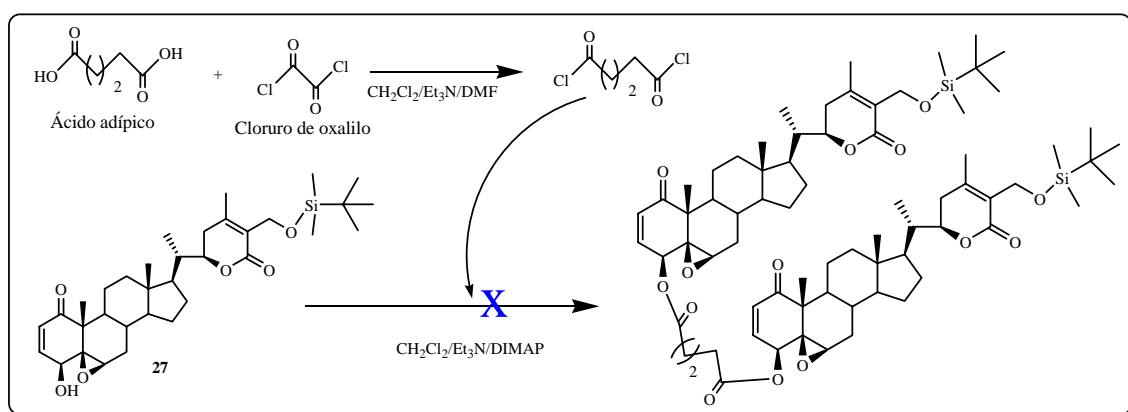
Para ello, se intentó la reacción del derivado **27**, obtenido al proteger el alcohol primario en C-27 de **1** en forma de sililéter. Con ello, pretendíamos formar el dímero a través del hidroxilo secundario sobre el C-4 para, posteriormente, desproteger el alcohol primario. La reacción se realizó de manera similar a las acilaciones descritas en el apartado 5.2.1.1.2. Así, se hizo reaccionar el derivado **27** con 0.5 equivalentes de dicloruro succinilo, en presencia de trietilamina (Et_3N) y una cantidad catalítica de dimetilaminopiridina (DIMAP), a temperatura ambiente y bajo atmósfera de argón, durante 24 horas. Transcurrido éste tiempo, se recuperó el producto de partida.



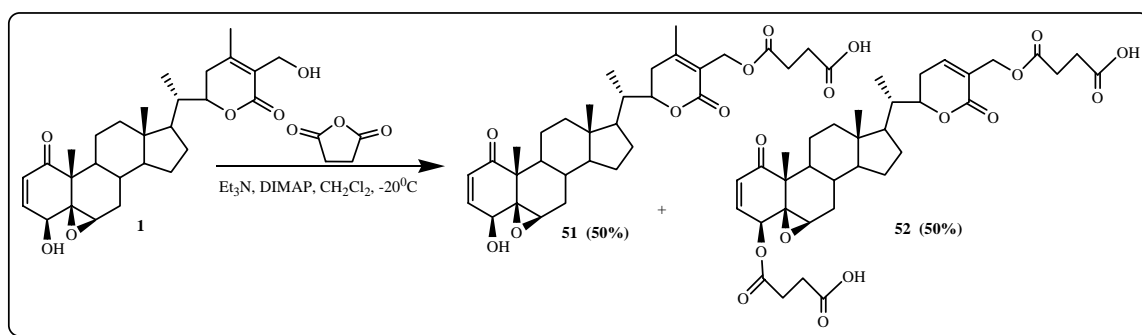
Pensamos que la reacción no iba debido al impedimento estérico del hidroxilo sobre C-4, por lo que decidimos llevar a cabo la reacción pero con la withaferina A (**1**) sin proteger en C-27. La reacción se llevó a cabo en las mismas condiciones que la anterior, obteniéndose, de igual forma, el producto de partida tras 3 días de reacción.



Se intentó de nuevo la reacción de dimerización a partir del derivado protegido **27**, pero en este caso usando cloruro adípico generado *in situ*. Para ello, se hizo reaccionar 1 equivalente de ácido adípico con 4 equivalentes de cloruro de oxalilo en diclorometano y tres gotas de DMF, durante 5 horas. Transcurrido éste tiempo, se eliminó el disolvente a vacío y se redisolvió la mezcla de reacción en diclorometano. Posteriormente, se añadió 0.5 equivalentes de la disolución anterior a otra de withaferina A en diclorometano, trietilamina y DIMAP. Tras 24 horas de reacción y al igual que en los casos anteriores, se recuperó el producto de partida.

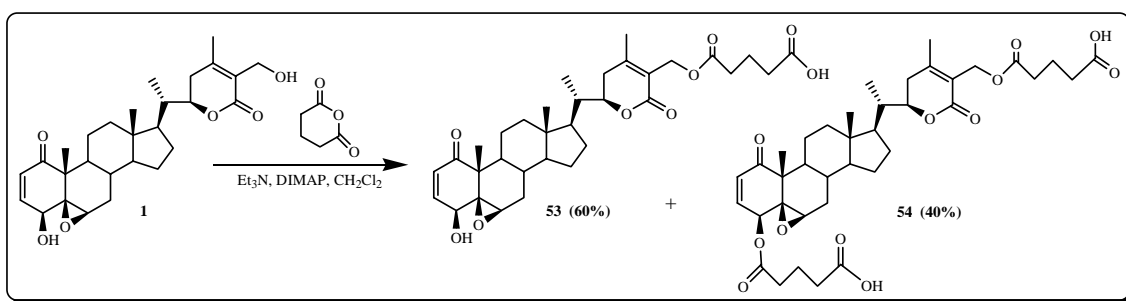


Debido a que la reacción con los dicloruros de ácidos no funcionó, decidimos llevar a cabo la reacción usando anhídridos y dicitohexilcarbaimida (DCC) como agente acoplante. Dada la diferencia de reactividad de los alcoholes primario y secundario, decidimos hacer reaccionar 1 equivalente de anhídrido succínico en diclorometano a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ con 1 equivalente de withaferina A, en presencia de trietilamina y DIMAP. El espectro de RMN ^1H del crudo de reacción indicó que teníamos una mezcla del derivado monoesterificado en C-27 (**51**) y del diesterificado en C-27 y C-4 (**52**) de aproximadamente el 50%.

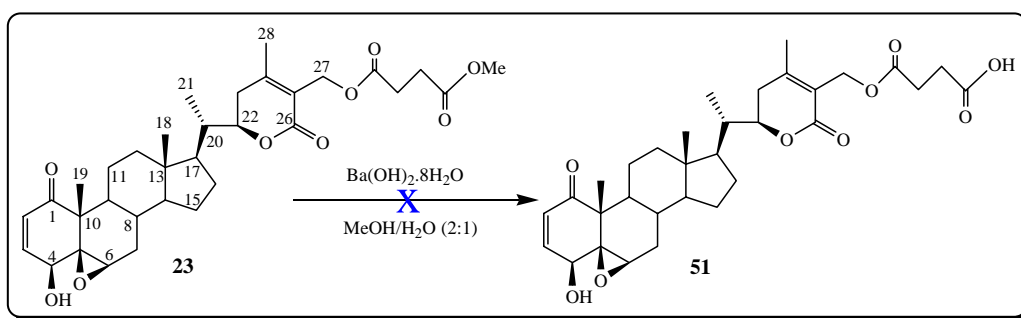


Tras varios intentos de separación de ambos derivados por cromatografía en columna nos fue imposible separar la mezcla de estos ácidos debido a su alta polaridad. Al no poder separarlos, decidimos llevar a cabo la dimerización por acoplamiento con DCC de dicha mezcla con la withaferina A, sin que se produjera el dímero deseado.

Lo mismo ocurrió al tratar **1** con anhídrido glutárico, ya que el crudo de reacción mostraba por RMN ^1H , una mezcla de aproximadamente un 60% de **53** y del 40% de **54**. Al purificar la mezcla por cromatografía líquida de alta presión (HPLC), usando como fase móvil acetonitrilo/agua, sólo obtuvimos 1 mg del derivado **53**.

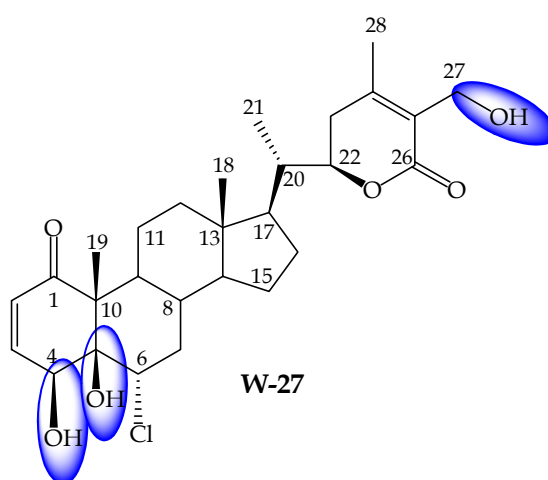


Como último intento de obtención del dímero de **1**, nos propusimos formar el derivado ácido **51** a partir del éster metílico **23** y acoplarle en una siguiente etapa la withaferina A con DCC. Se llevó a cabo la reacción del derivado **23** con hidróxido de bario en metanol/agua, a reflujo de $45\text{ }^\circ\text{C}$ durante 5 días, tras los cuales obtuvimos la descomposición del producto de partida.



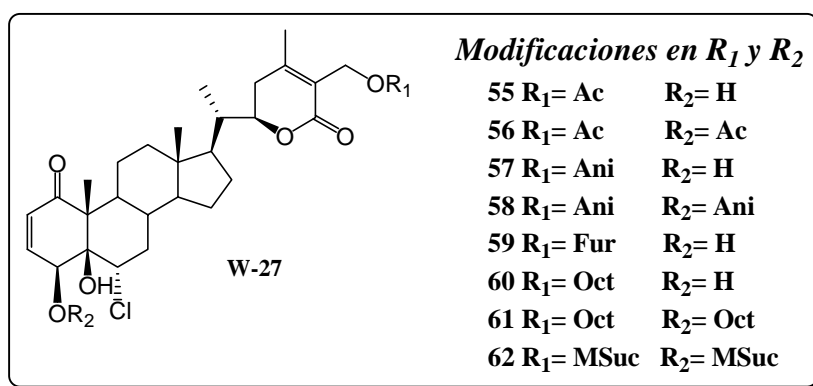
5.2.2. Transformaciones del 6 α -cloro-5 β -hidroxiwithaferina A (W-27)

Aunque la cantidad aislada de **W-27** fue menor a la del compuesto anterior, withaferina A, nos permitió realizar algunas modificaciones. La estructura del compuesto **W-27** presenta tres grupos hidroxilos con diferencias estéricas y de reactividad, ya que posee en su estructura, un alcohol primario en C-27, un alcohol secundario en C-4 y uno terciario en el carbono C-5. Así, con el fin de saber cual es el papel que juegan los grupos hidroxilos en la actividad de esta molécula, se llevaron a cabo las modificaciones estructurales que se indican a continuación.



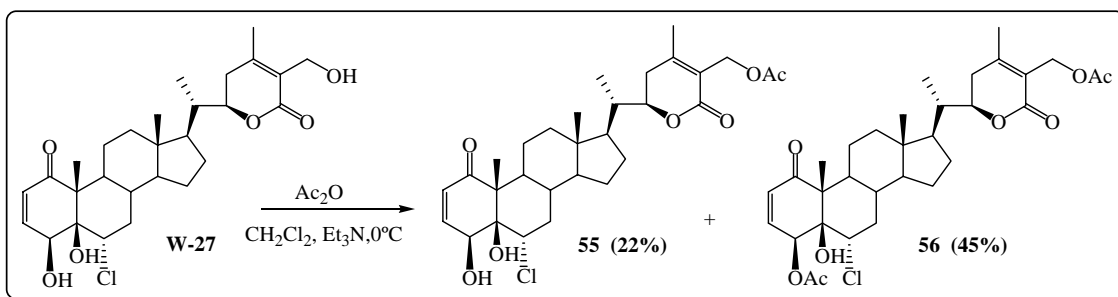
5.2.2.1 Reacciones de acilación

De manera similar a lo expuesto para withaferina A, se realizaron reacciones de acilación con diversos agentes acilantes, con el objetivo de introducir grupos con diferentes propiedades estereoelectrónicas y lipofílicas.



5.2.2.1.1. *Reacción de acetilación*

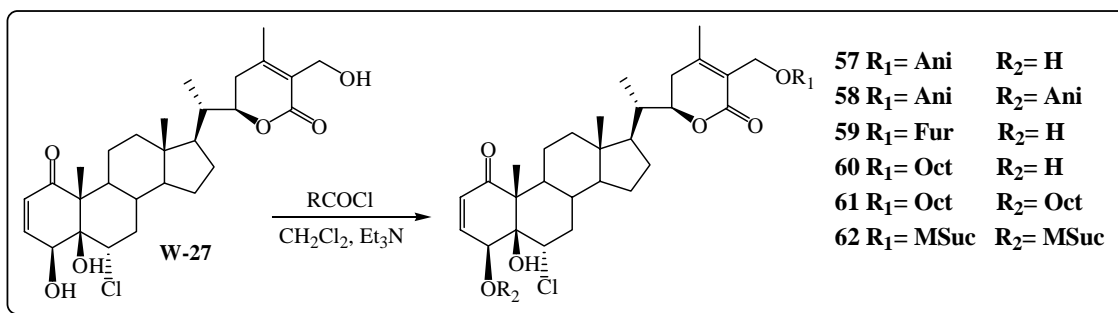
Al hacer reaccionar el compuesto natural **W-27** con anhídrido acético en presencia de trietilamina se obtuvieron los derivados **55** y **56**.



El producto **55** presentó como característica principal en su espectro de RMN ^1H el desplazamiento de la señal de los hidrógenos H-27 a campos más bajos, con respecto al producto de partida (4.34 y 4.39 δ en **W-27**, 4.89 y 4.93 δ en **55**), así como la presencia de la señal correspondiente al metilo del grupo acetato a 2.07 δ . Los datos espectroscópicos del derivado **56** mostraron además, el desplazamiento del protón H-4 a campos más bajos (5.06 δ en **55**, 6.28 δ en **56**) y la presencia adicional de un metilo de grupo acetato a 2.17 δ . Sus estructuras fueron confirmadas mediante experimentos bidimensionales y espectrometría de masas.

5.2.2.1.2. *Acilación con cloruros de ácidos*

Se utilizaron cuatro cloruros de ácido para las reacciones de acilación de **W-27**, variando así sus propiedades estéricas y electrónicas: cloruro de anisoilo, cloruro de octanoilo, cloruro de furoilo y cloruro de 4-O-metilsuccinato.



Así, los derivados **57-62** se obtuvieron por tratamiento del compuesto **W-27** con los distintos cloruros de ácidos mencionados, usando diferentes condiciones de

reacción, según la reactividad del cloruro de ácido. Se obtuvieron así, los diferentes mono ésteres sobre el carbono C-27 cuando la reacción fue regioselectiva ó en los carbonos C-4 y C-27, cuando la reacción no se pudo controlar.

Tabla 9. Condiciones de reacción y % de los productos obtenidos.

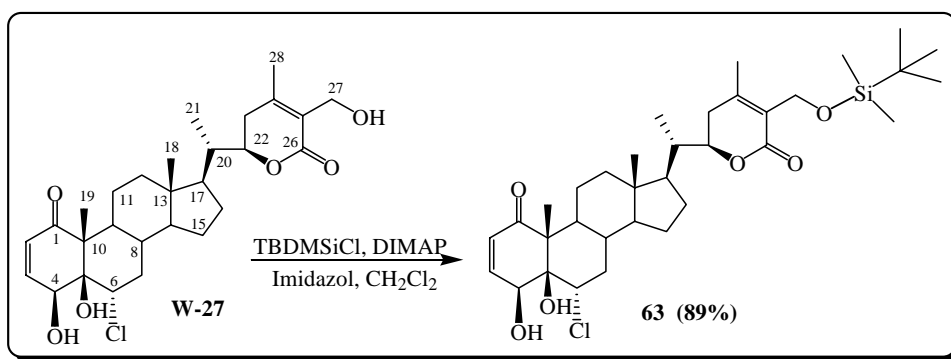
Cloruro de ácido	Condiciones	Acilación en C-27	Acilación en C-4 y C-27
Ani-Cl	Et ₃ N, 0 °C, 24 h	n.r.	
	Et ₃ N, DIMAP, t.a., 2.5 h	57 (40%)	58 (55%)
Fur-Cl	Et ₃ N, 0 °C, 3 h	59 (72%)	
Oct-cl	Et ₃ N, 0 °C, 4 h	60 (16%)	61 (49%)
MSuc-Cl	Et ₃ N, 0 °C, 5 h		62 (70%)

n.r. No reaccionó

Sus estructuras se determinaron basándose en sus datos espectroscópicos y espectrometría de masas, según se detalla en la parte experimental de esta Memoria.

5.2.2.2. Preparación del éter de silicio con TBDMSiCl

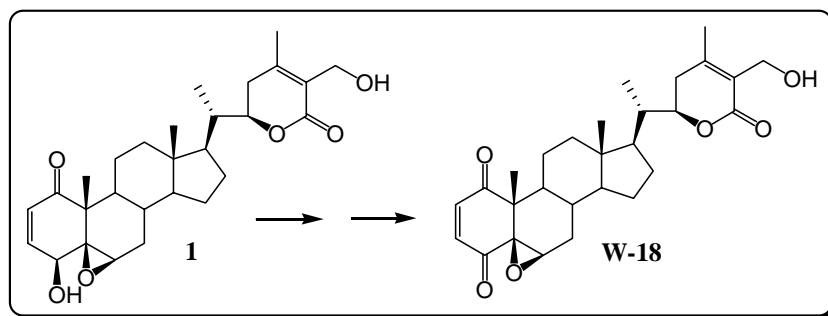
A una disolución de 1 equivalente de **W-27** en diclorometano, se le añadió 1 equivalente de imidazol, otro de DIMAP y 1.5 equivalentes de cloruro de *tert*-butil-dimetil silicio (TBDMSiCl). La reacción se dejó agitar a temperatura ambiente bajo atmósfera de N₂ durante 2.5 horas, obteniéndose como producto final el derivado **63**.



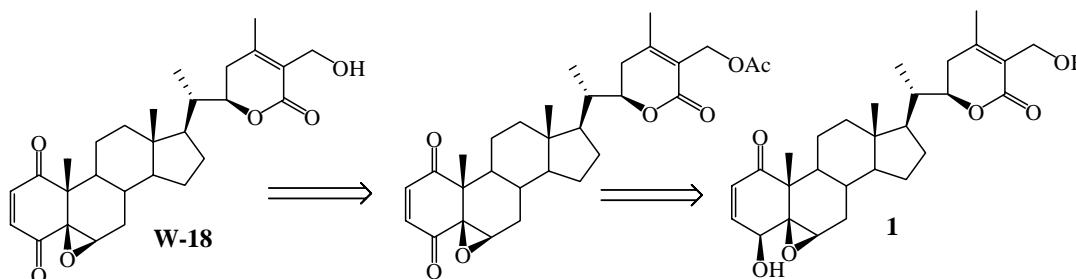
La estructura del derivado **63** se determinó mediante el estudio de sus datos espectroscópicos, observándose en su espectro de RMN de ¹H dos singuletes a 0.08 δ (6H) y 0.88 δ (9H), correspondientes a los metilos del grupo silano, así como el desplazamiento de los protones H-27 a campos más bajos (4.88 δ_H).

5.2.3. Preparación del compuesto natural W-18

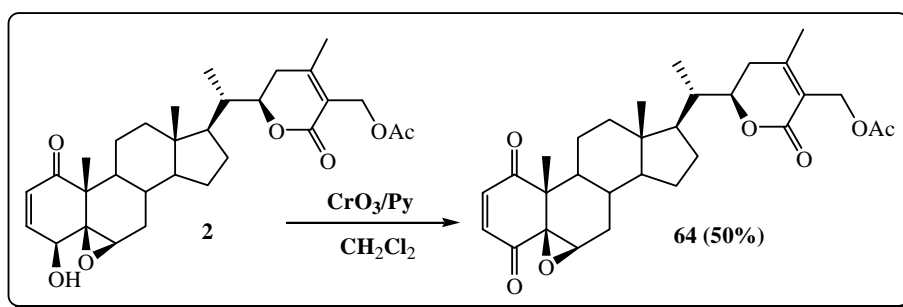
Con el fin de obtener mayor cantidad del producto **W-18**, aislado de hojas de *W. aristata* y evaluar su potencial biológico, se intentó su síntesis usando como compuesto de partida la withaferina A.



En una primera aproximación sintética de **W-18** a partir de **1**, se propuso acetilar regioselectivamente el alcohol primario sobre C-27, oxidar con reactivo de Collins (CrO_3 en piridina) el alcohol secundario sobre C-4 y por último, desproteger el alcohol en C-27 con bicarbonato sódico.

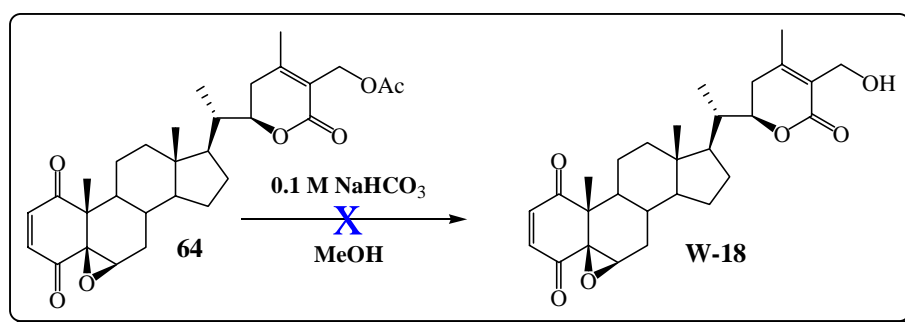


Así, se hizo reaccionar el derivado **2**, derivado acetilado en C-27 de la withaferina A, disuelto en diclorometano y bajo atmósfera de N_2 , con reactivo de Collins durante 6 horas, obteniéndose como único producto el derivado oxidado **64**.

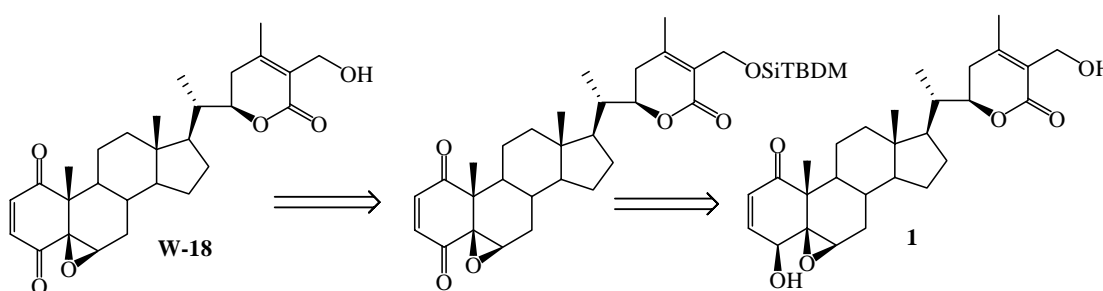


Los espectros de RMN ^1H y ^{13}C del compuesto **64** presentaron como principales diferencias con respecto al producto de partida **2**, la desaparición de la señal asignada a H-4, el desplazamiento a campos más bajos de H-2 ($6.86 \delta_{\text{H}}$) y la presencia de un nuevo carbono cuaternario a $193.6 \delta_{\text{C}}$, correspondiente a C-4. La oxidación de C-4 fue confirmada con un experimento HMBC, al observar correlación entre el carbono C-4 y los protones H-2 y H-6.

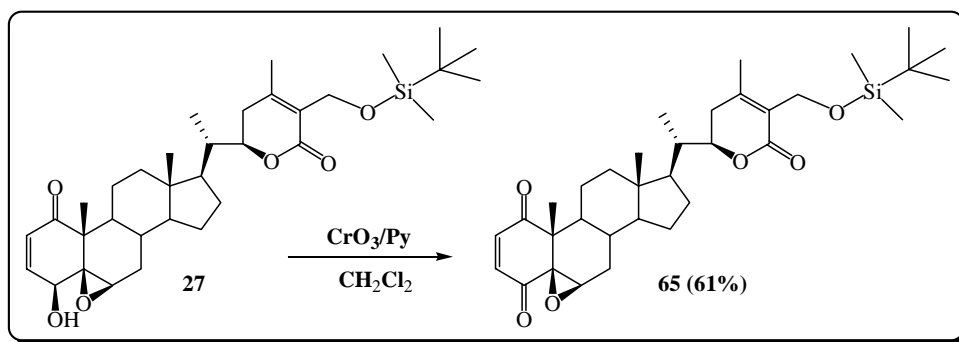
Como último paso se planteó la desprotección del alcohol primario en C-27, por tratamiento del derivado **64** disuelto en metanol con una disolución acuosa de bicarbonato sódico (0.1 M) durante 24 horas. Sin embargo, se produjo la total descomposición del producto de partida.



Dado que la desprotección del grupo acetato no se produjo de forma exitosa, se intentó una segunda estrategia, usando como grupo protector un éter de silicio.

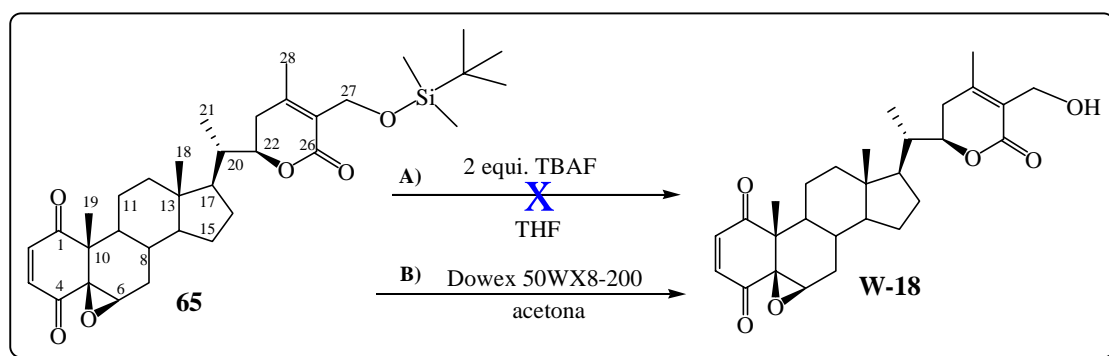


Para ello, se llevó a cabo la reacción de oxidación del derivado **27**, obtenido anteriormente a partir de la withaferina A, con reactivo de Collins, dando como producto de reacción el derivado **65**.



Al igual que en el caso anterior, las principales diferencias en los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C del derivado **65** con el producto de partida fueron la desaparición de la señal correspondiente a H-4, el desplazamiento a campos más bajos de H-2 ($6.83 \delta_{\text{H}}$, 1H, d, $J = 10.5 \text{ Hz}$), así como la presencia del carbono cuaternario C-4 a $193.8 \delta_{\text{C}}$. La estructura fue así mismo confirmada mediante experimentos bidimensionales, tanto homo como heteronucleares.

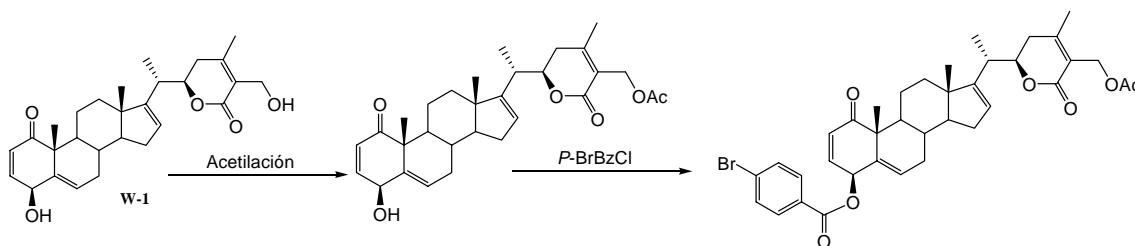
Como último paso, se llevó a cabo la desprotección del sustituyentes sobre C-27, para lo cual, se trató el derivado **65** con 2 equivalentes de fluoruro de tetrabutilamonio (TBAF) en THF y bajo atmósfera de argón (A), produciéndose como resultado la descomposición del producto de partida.



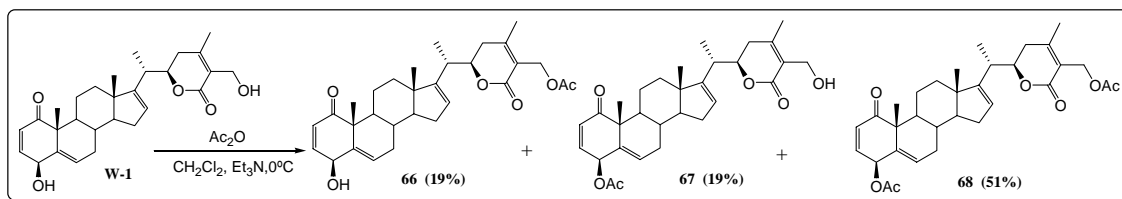
En otro intento de eliminar el grupo protector en el alcohol primario, se realizó la reacción de **65** con una suspensión de la resina iónica Dowex 50WX8-200 en acetona anhidra y bajo atmósfera de nitrógeno, obteniéndose un producto cuyos datos espectroscópicos coincidieron con los datos del producto natural **W-18**.

5.2.4. Preparación de derivados de W-1 para dicroísmo circular.

Con el objetivo de conocer la configuración absoluta en C-4 y C-22 de los derivados con doble enlace en las posiciones C5-C6 por dicroísmo circular, se procedió a introducir un grupo cromóforo sobre C-4, protegiendo previamente el alcohol primario como se muestra en el esquema.



Previamente y con el objetivo de proteger el alcohol primario en C-27, al compuesto **W-1** disuelto en diclorometano y bajo atmósfera de N₂ a 0 °C, se le añadió trietilamina y anhídrido acético y se dejó reaccionar durante 2.5 h dando lugar a una mezcla de tres derivados acetilados, **66**, **67** y **68**.

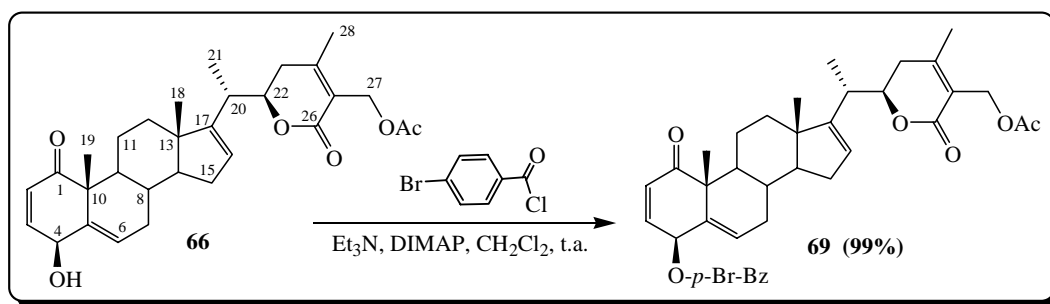


El compuesto **66** presentó como principal diferencia en su espectro de RMN ¹H con el compuesto de partida **W-1**, la presencia de una señal correspondiente a un metilo de grupo acetato a 2.08 δ (3H, s) y el desplazamiento de los protones H-27 a campos más bajos. El espectro de carbono mostró señales características de un grupo acetato [22.8 δ (c), 170.9 δ (s)].

La estructura del producto **67** fue establecida también basándonos en sus datos espectroscópicos, observándose como principal diferencia con el producto de partida en el espectro de RMN ¹H, el desplazamiento de la señal de H-4 en 1.2 ppm a campos más bajos, pasando de 4.61 δ (1H, d, J= 4.4 Hz) en **W-1** a 5.81 δ (1H, d, J= 4.7 Hz) en **67**. Así mismo, se observaron las señales correspondientes a un grupo acetato a 2.11 δ_H (3H, s), [21.4 δ_C (c) y 170.6 δ_C (s)].

El espectro de RMN ^1H del compuesto **68** mostró señales para metilos de dos grupos acetatos, así como el desplazamiento a campos más bajos de los protones asignados a H-4 y H-27 con respecto a **W-1**. Estos datos fueron confirmados en su espectro de RMN ^{13}C , que presentó señales asignables a dos grupos acetatos a OAc-27 [21.8 δ (c), 170.9 δ (s)] y OAc-4 [21.7 δ (c), 170.2 δ (s)].

Una vez protegido el alcohol sobre C-27 (**66**), Se procedió a introducir el nuevo grupo cromóforo en el hidroxilo secundario sobre C-4. Para ello, se escogió como grupo cromóforo el *p*-bromobenzoato y se procedió a esterificar el compuesto **66**, usando como reactivo el cloruro de *p*-bromobenzoilo en las condiciones que se muestran en la figura. Se obtuvo así el derivado **69** con rendimiento cuantitativo.



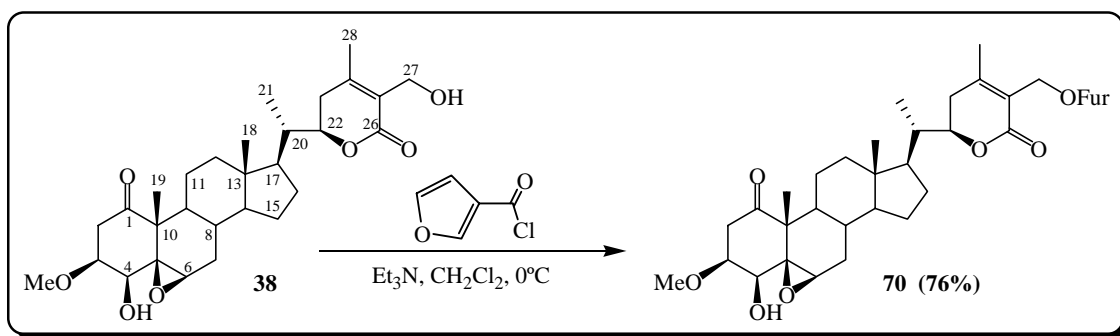
El derivado **69** presentó señales en su espectro de RMN ^1H a 7.61 δ (2H, d, $J=8.3$ Hz) y 7.90 δ (2H, d, $J=8.3$ Hz), asignadas a un grupo *p*-bromobenzoato, así como el desplazamiento del protón H-4 a campos más bajos (6.07 δ , 1H, d, $J=4.8$ Hz). Estos datos fueron confirmados en su espectro de RMN de ^{13}C , que presentó señales a δ 128.4 (s), 128.9 (s), 131.2 (2 x d), 131.8 (2 x d), 165.1 (s).

5.2.5. Otras reacciones

Se recogen en este apartado, reacciones llevadas a cabo con derivados u otras withanolidas, aisladas de *W. aristata*.

5.2.5.1 Esterificación de 38 con cloruro de furoilo

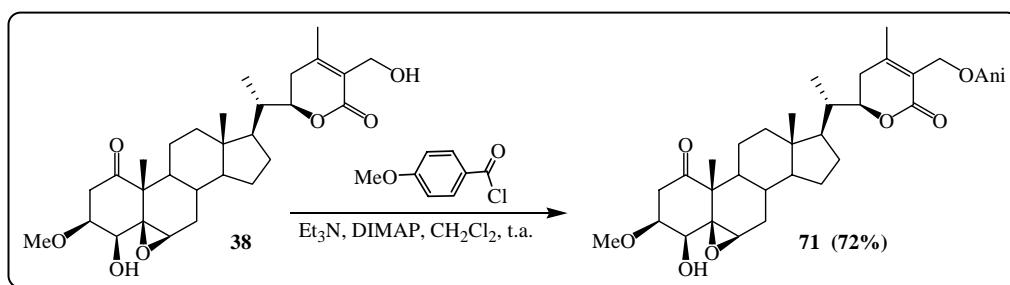
Se llevó a cabo la acilación de **38** con cloruro de furoilo en presencia de trietilamina a 0 $^\circ\text{C}$ y bajo atmósfera de nitrógeno, rindiendo el derivado **70**.



Su estructura fue establecida basándose en sus datos espectroscópicos y comparación con los del producto de partida, presentando como señales más características, en su espectro de RMN ^1H , las correspondientes a un grupo furoato (FurO) a δ_{C} 111.6 (d), 118.1 (d), 144.1 (s), 146.2 (d) y 158.4 (s), así como el desplazamiento de los protones H-27 a campos más bajos (5.13, 5.16 δ_{H}).

5.2.5.2 Esterificación de 38 con cloruro de anisilo.

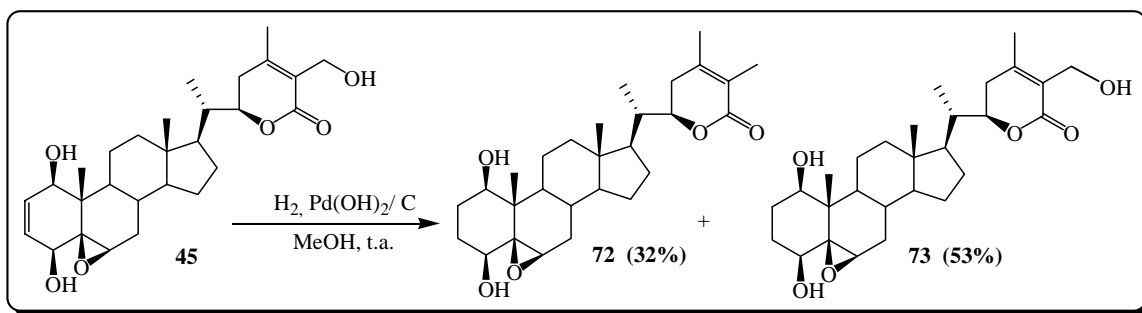
Se hizo reaccionar **38**, disuelto en diclorometano y a temperatura ambiente, con cloruro de anisilo y una cantidad catalítica de DIMAP, dando como único producto el derivado **71**.



El análisis de los datos espectroscópicos del producto **71** mostró señales en la región aromática del espectro de RMN ^1H correspondientes a un grupo *p*-metoxibenzoato a 3.87 δ (3H, s), 6.91 δ (2H, d, $J = 8.6$ Hz) y 7.99 δ (2H, d, $J = 8.6$ Hz). Estos datos fueron confirmados en su experimento de RMN ^{13}C , [δ_{C} 55.2 (c), 113.3 (2 x d), 122.2 (s), 131.6 (2 x d), 163.2 (s) y 166.0 (s)] y experimentos bidimensionales.

5.2.5.3 Hidrogenación catalítica del derivado 45

Con el fin de disponer de un mayor número de compuestos con el que llevar a cabo el estudio de relación estructura-actividad, se llevó a cabo la hidrogenación de **45** con hidróxido de paladio en atmósfera de hidrógeno, obteniéndose los derivados **72** y **73**.

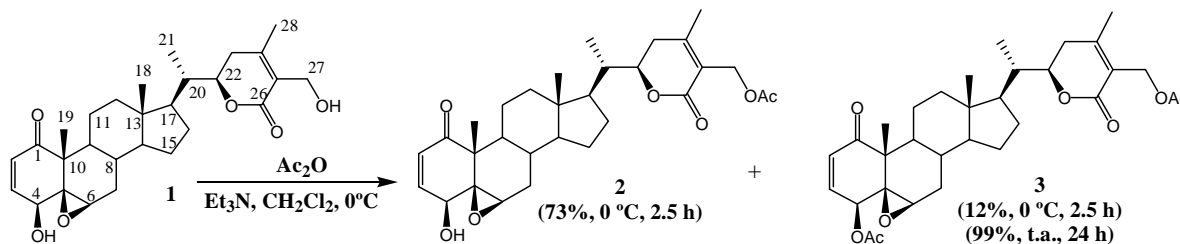


Los derivados **72** y **73** presentaron como principal diferencia en sus espectros de RMN de ^1H y ^{13}C con respecto al producto de partida, la desaparición de las señales asignadas al doble enlace C2-C3. Además, en los espectros de **72** se observó la desaparición de las señales correspondientes al alcohol primario sobre C-27 y la presencia de un metilo. Las estructuras de los derivados fueron confirmadas mediante experimentos bidimensionales homo y heteronucleares.

Tabla 10. Datos de RMN de ^1H de H-2, H-3 y H-27 en los productos **45**, **72** y **73**

Producto	H-2 (δ_{H})	H-3 (δ_{H})	H-27 (δ_{H})
45	6.20 (1H, dd, $J=4.2, 9.7$ Hz)	6.16 (1H, dd, $J=5.0, 9.7$ Hz)	4.35, 4.39 (2H, d_{AB} , $J=12.6$ Hz)
72	1.98 (1H, m) 1.66 (1H, m)	1.98 (1H, m) 1.88 (1H, m)	1.91 (3H, s)
73	1.98 (1H, m) 1.66 (1H, m)	1.98 (1H, m) 1.89 (1H, m)	4.36, 4.41 (2H, d_{AB} , $J=12.5$ Hz)

• Acetilación de 1 (withaferina A)



A una disolución de 40.0 mg de **1** (0.085 mmoles, 1 eq) en 2 ml de CH₂Cl₂ seco, bajo atmosfera de N₂, se le adicionó 0.15 ml de Et₃N (1.07 mmoles, 12.6 eq) y 0.1 ml de Ac₂O (1.05 mmoles, 12.4 eq). La reacción se agitó a 0 °C durante 2.5 h. Transcurrido este tiempo, se concentró a vacío y el crudo de reacción fue purificado por cromatografía en placa de gel de sílice de capa fina (CH₂Cl₂/acetona, 9:1), obteniéndose 32 mg de **2** (R= 73%) y 3 mg de **3** (R= 12%) como sólidos amorfos. Al llevar a cabo la reacción de 20.0 mg de **1** (0.043 mmoles, 1 eq) a temperatura ambiente durante 24 h se obtuvo 24 mg de **3** (R= 99%) como un sólido amorfo.

27-O-Acetilwithaferina A (**2**)

[α]_D²⁵: + 63.4 (c 0.50, CHCl₃)

IR γ_{max} (película): 3748, 1701, 1691, 1558, 1540, 1458, 1397, 1256, 1066, 838 cm⁻¹.

UV (EtOH) λ_{max} (log ε): 215 (4.4) nm.

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ: 0.70 (3H, s, Me18); 0.95 (1H, m, H14); 1.00 (3H, d, J= 6.6 Hz, Me21); 1.02 (1H, m, H9); 1.10 (1H, m, H17); 1.13 (1H, m, H12); 1.18 (1H, m, H15); 1.29 (1H, m, H7α); 1.38 (1H, m, H16); 1.41 (3H, s, Me19); 1.48 (1H, m, H11); 1.53 (1H, m, H8); 1.65 (1H, m, H15); 1.70 (1H, m, H16); 1.83 (1H, m, H11); 2.00 (2H, m, H-12, H20); 2.01 (1H, m, H23α); 2.08 (3H, s, Me28); 2.15 (1H, m, H7β); 2.53 (1H, m, H23β); 3.24 (1H, sa, H6); 3.76 (1H, d, J= 5.9 Hz, H4); 4.41 (1H, dt, J= 3.3, 13.2 Hz, H22); 4.88, 4.92 (2H, d_{AB}, J= 11.9 Hz, H27); 6.21 (1H, d, J= 9.9 Hz, H2); 6.95 (1H, dd, J= 5.9, 9.9 Hz, H3); OAc [2.06 (3H, s)].

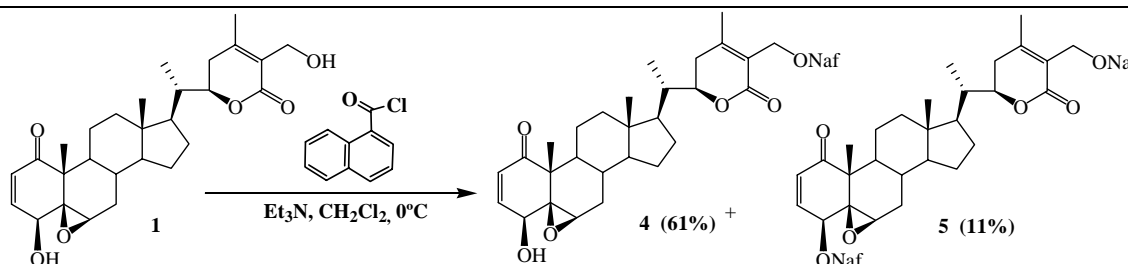
RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ: 11.4 (c, C18); 13.1 (c, C21); 17.2 (c, C19); 20.4 (c, C28); 21.9 (t, C11); 24.0 (t, C15); 27.0 (t, C16); 29.5 (d, C8); 29.8 (t, C23); 30.9 (t, C7); 38.5 (d, C20); 39.1 (t, C12); 42.3 (s, C13); 43.9 (d, C9); 47.4 (s, C10); 51.7 (d, C17); 55.8 (d, C14); 57.8 (t, C27); 62.3 (d, C6); 63.6 (s, C5); 69.6 (d, C4); 78.0 (d, C22); 121.6 (s, C25); 132.1 (d, C2); 141.7 (d, C3); 156.8 (s, C24); 165.2 (s, C26); 202.1 (s, C1); OAc [20.7 (c); 170.7 (s)].

EM (IE) m/z (%): 512 [M⁺] (7), 452 (9), 416 (7), 389 (21), 329 (24), 311 (25), 283 (7), 239 (23), 183 (25), 161 (19), 124 (100), 95 (80), 67 (44).

EMAR m/z: Observado 512.2775 (calculado para C₃₀H₄₀O₇ [M⁺]: 512.2774).

4,27-Di-O-acetilwithaferina A (3)	
[α]²⁵_D:	+ 100.6 (c 0.48, CHCl ₃)
IR γ_{\max} (película):	2929, 1700, 1692, 1541, 1460, 1396, 1254, 1068, 838, cm ⁻¹ .
UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ):	214 (4.2) nm.
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ:	0.69 (3H, s, Me18); 0.95 (1H, m, H14); 0.99 (3H, d, J= 6.7 Hz, Me21); 1.00 (1H, m, H9); 1.09 (1H, m, H17); 1.10 (1H, m, H12); 1.15 (1H, m, H15); 1.31 (1H, m, H7 α); 1.38 (1H, m, H16); 1.39 (3H, s, Me19); 1.45 (1H, m, H11); 1.55 (1H, m, H8); 1.65 (1H, m, H15); 1.70 (1H, m, H16); 1.83 (1H, m, H11); 1.97 (1H, m, H12); 1.98 (1H, m, H23 α); 2.00 (1H, m, H20); 2.07 (3H, s, Me28); 2.17 (1H, m, H27 β); 2.50 (1H, m, H23 β); 3.21 (1H, sa, H6); 4.40 (1H, dt, J= 3.3, 13.1 Hz, H22); 4.65 (1H, d, J= 6.0 Hz, H4); 4.85, 4.90 (2H, d _{AB} , J= 12.1 Hz, H27); 6.25 (1H, d, J= 9.8 Hz, H2); 7.03 (1H, dd, J= 6.0, 9.8 Hz, H3); OAc [2.05 (6H, s)].
RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ:	11.3 (c, C18); 13.1 (c, C21); 15.5 (c, C19); 20.4 (c, C28); 21.0 (t, C11); 24.0 (t, C15); 27.1 (t, C16); 29.3 (d, C8); 29.9 (t, C23); 30.8 (t, C7); 38.5 (d, C20); 38.9 (t, C12); 42.3 (s, C13); 43.9 (d, C9); 47.9 (s, C10); 51.7 (d, C17); 55.8 (d, C14); 57.8 (t, C27); 60.0 (d, C6); 60.8 (s, C5); 71.9 (d, C4); 77.9 (d, C22); 121.7 (s, C25); 133.7 (d, C2); 139.6 (d, C3); 156.7 (s, C24); 165.1 (s, C26); 201.0 (s, C1); OAc-27 [20.7 (c); 170.7 (s)]; OAc-4 [20.6 (c); 169.9 (s)].
ESIMS m/z (%):	577 [M+Na] ⁺ (100).
ESI/MS-AR m/z:	Observado 577.2779 (calculado para C ₃₂ H ₄₂ O ₈ Na [M+Na] ⁺ : 577.2777).

• Esterificación de **1** con cloruro de 1-naftoilo



A una disolución de 15.0 mg de **1** (0.032 mmoles, 1 eq) en 2.0 ml de CH_2Cl_2 seco se le adicionó 0.1 ml de trietilamina (0.64 mmoles, 20 eq) y 0.05 ml de cloruro de naftoilo (0.32 mmoles, 10 eq). La reacción se agitó a 0 °C bajo atmósfera de N_2 durante 3 horas. Transcurrido este tiempo, se eliminó el disolvente a vacío y el crudo de reacción se purificó por columna cromatografica de gel de sílice, usando como eluyente un gradiente de polaridad (del 0% al 20%) de CH_2Cl_2 /acetona, obteniéndose 12.2 mg de **4** (R= 61%) y 3 mg de **5** (R= 11%) como sólidos amorfos.

27-O-Naftilwithaferina A (4)

$[\alpha]_D^{25}$: + 57.1 (c 0.52, CHCl_3).

IR γ_{max} (película): 3452, 2925, 2867, 1711, 1457, 1398, 1241, 1132, 1033, 966, 755 cm^{-1} .

UV (EtOH) λ_{max} (log ϵ): 216 (4.5); 236 (4.2); 297 (3.6) nm.

RMN ^1H (CDCl₃, 400 MHz) δ : 0.73 (3H, s, Me18); 0.97 (1H, m, H14); 1.04 (3H, d, J = 6.6 Hz, Me21); 1.05 (1H, m, H9); 1.12 (1H, m, H17); 1.16 (1H, m, H12); 1.19 (1H, m, H15); 1.28 (1H, m, H7 α); 1.41 (1H, m, H16); 1.43 (3H, s, Me19); 1.50 (1H, m, H11); 1.55 (1H, m, H8); 1.65 (1H, m, H15); 1.70 (1H, m, H16); 1.86 (1H, m, H11); 2.00 (1H, m, H12); 2.05 (1H, m, H20); 2.06 (1H, m, H23 α); 2.17 (1H, m, H7 β); 2.20 (3H, s, Me28); 2.58 (1H, m, H23 β); 3.25 (1H, sa, H6); 3.78 (1H, d, J = 5.8 Hz, H4); 4.46 (1H, dt, J = 3.3, 13.1 Hz, H22); 5.24, 5.27 (2H, d_{AB}, J = 12.5 Hz, H27); 6.22 (1H, d, J = 10.0 Hz, H2); 6.95 (1H, dd, J = 5.8, 10.0 Hz, H3); ONaf [7.50 (1H, t, J = 7.2 Hz); 7.55 (1H, ddd, J = 1.2, 7.5 Hz); 7.63 (1H, ddd, J = 1.2, 7.6 Hz); 7.90 (1H, d, J = 7.5 Hz); 8.03 (1H, d, J = 7.2 Hz); 8.18 (1H, dd, J = 1.2, 7.6 Hz); 8.91 (1H, d, J = 7.6 Hz)].

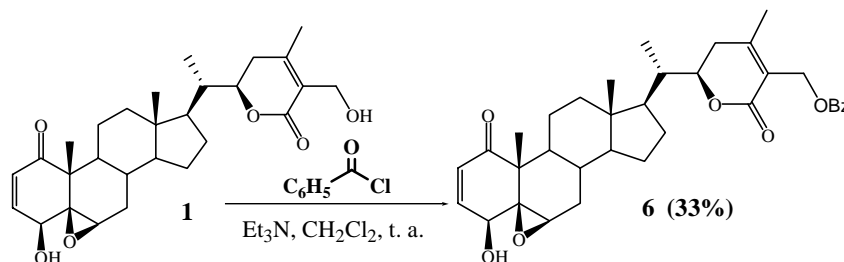
RMN ^{13}C (CDCl₃, 100 MHz) δ : 11.4 (c, C18); 13.1 (c, C21); 17.2 (c, C19); 20.6 (c, C28); 21.9 (t, C11); 24.0 (t, C15); 27.1 (t, C16); 29.5 (d, C8); 29.9 (t, C23); 30.9 (t, C7); 38.6 (d, C20); 39.1 (t, C12); 42.4 (s, C13); 43.9 (d, C9); 47.4 (s, C10); 51.7 (d, C17); 55.8 (d, C14); 58.4 (t, C27); 62.3 (d, C6); 63.6 (s, C5); 69.7 (d, C4); 78.0 (d, C22); 121.8 (s, C25); 132.1 (d, C2); 141.7 (d, C3); 157.0 (s, C24); 165.2 (s, C26); 202.1 (s, C1); ONaf [124.3 (d); 125.5 (d); 126.0 (d); 126.7 (s); 127.6 (d); 128.3 (d); 130.2 (d); 131.1 (s); 133.2 (d); 133.5 (s); 167.2 (s)].

EM (IE) m/z (%): 624 [M^+] (1), 606 (2), 452 (1), 434 (2), 389 (21), 329 (10), 311 (12), 241 (3), 215 (2), 172 (100), 155 (88), 131 (7), 127 (54), 105 (19), 95 (7).

EMAR m/z : Observado 624.3058 (calculado para $\text{C}_{39}\text{H}_{44}\text{O}_7$ [M^+]: 624.3087).

4,27-Di-O-naftilwithaferina A (5)	
[α]²⁵_D:	+ 92.6 (c 0.22, CHCl ₃).
IR γ_{\max} (película):	2923, 2863, 1712, 1454, 1395, 1237, 1129, 1030, 1010, 959, 750 cm ⁻¹ .
UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ):	215 (4.4); 230 (4.1); 297 (3.4) nm.
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ:	0.74 (3H, s, Me18); 0.98 (1H, m, H9); 0.99 (1H, m, H14); 1.03 (3H, d, J= 6.7 Hz, Me21); 1.11 (1H, m, H12); 1.12 (1H, m, H17); 1.21 (1H, m, H15); 1.38 (1H, m, H7 α); 1.42 (1H, m, H16); 1.50 (3H, s, Me19); 1.51 (1H, m, H11); 1.63 (1H, m, H8); 1.68 (1H, m, H15); 1.71 (1H, m, H16); 1.73 (1H, m, H11); 1.99 (1H, m, H12); 2.06 (1H, m, H20); 2.07 (1H, m, H23 α); 2.20 (3H, s, Me28); 2.25 (1H, m, H7 β); 2.59 (1H, m, H23 β); 3.38 (1H, sa, H6); 4.47 (1H, dt, J= 3.3, 13.0 Hz, H22); 5.04 (1H, d, J= 6.0 Hz, H4); 5.25, 5.28 (2H, d _{AB} , J= 12.0 Hz, H27); 6.37 (1H, d, J= 10.0 Hz, H2); 7.27 (1H, dd, J= 6.0, 10.0 Hz, H3); ONaf-27 [7.51 (1H, t, J= 7.8 Hz); 7.56 (1H, t, J= 8.3 Hz); 7.62 (1H, t, J= 8.5 Hz); 7.90 (1H, d, J= 8.3 Hz); 8.04 (1H, d, J= 8.5 Hz); 8.19 (1H, d, J= 7.3 Hz); 8.92 (1H, d, J= 8.5 Hz)]; ONaf-4 [7.50 (1H, t, J= 7.8 Hz); 7.55 (1H, t, J= 7.3 Hz); 7.62 (1H, t, J= 8.5 Hz); 7.90 (1H, d, J= 8.3 Hz); 8.05 (1H, d, J= 8.3 Hz); 8.15 (1H, d, J= 7.8 Hz); 8.83 (1H, d, J= 8.5 Hz)].
RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ:	11.4 (c, C18); 13.2 (c, C21); 15.6 (c, C19); 20.6 (c, C28); 21.2 (t, C11); 24.0 (t, C15); 27.1 (t, C16); 29.9 (t, C23); 30.1 (d, C8); 30.9 (t, C7); 38.7 (d, C20); 39.1 (t, C12); 42.5 (s, C13); 44.0 (d, C9); 48.0 (s, C10); 51.7 (d, C17); 55.9 (d, C14); 58.4 (t, C27); 60.3 (d, C6); 61.2 (s, C5); 72.5 (d, C4); 78.0 (d, C22); 122.0 (s, C25); 133.9 (d, C2); 139.8 (d, C3); 157.0 (s, C24); 165.3 (s, C26); 201.0 (s, C1); ONaf-27 [124.5 (d); 125.6 (d); 126.2 (d); 126.8 (s); 127.8 (d); 128.5 (d); 130.4 (d); 131.1 (s); 133.4 (d); 133.8 (s); 167.3 (s)]; ONaf-4 [124.5 (d); 125.8 (d); 126.3 (d); 126.9 (s); 127.9 (d); 128.6 (d); 130.5 (d); 131.1 (s); 133.8 (s); 134.1 (s); 167.3 (s)].
ESIMS m/z (%):	801 [M+Na] ⁺ (100).
ESI/MS-AR m/z:	Observado 801.3414 (calculado para C ₅₀ H ₅₀ O ₈ Na [M+Na] ⁺ : 801.3403).

• Benzoilación de **1**



La benzoilación de 14.0 mg de **1** (0.03 mmoles, 1 eq) se llevó a cabo con 3 μ l de cloruro de benzoilo (0.02 mmoles, 0.7 eq), a temperatura ambiente y durante 24 horas, siguiendo la metodología descrita para la obtención de **4**. Se obtuvo así el producto **6** (5.5 mg, R= 33%) como un sólido amorfo.

27-O-Benzilwithaferina A (6)

$[\alpha]_{25}^D$: + 50.1 (c 0.55, CHCl₃)

IR γ_{\max} (película): 3459, 2942, 2870, 1713, 1453, 1400, 1318, 1272, 1110, 754 cm⁻¹.

UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ): 225 (4.3); 280 (2.9) nm.

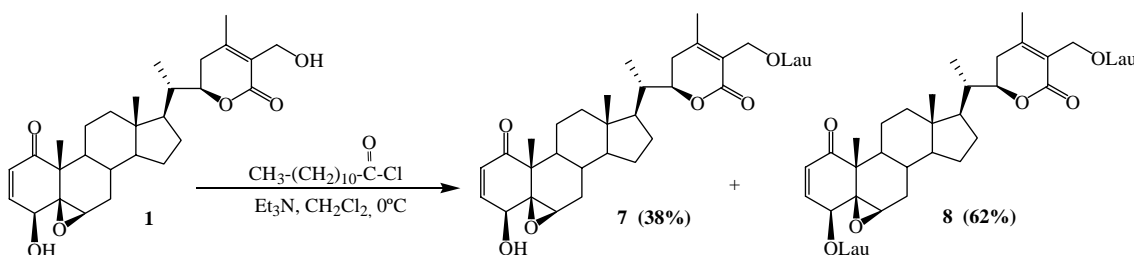
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ : 0.73 (3H, s, Me18); 0.96 (1H, m, H14); 1.04 (3H, d, J = 6.7 Hz, Me21); 1.04 (1H, m, H9); 1.11 (1H, m, H17); 1.15 (1H, m, H12); 1.18 (1H, m, H15); 1.30 (1H, m, H7 α); 1.40 (1H, m, H16); 1.44 (3H, s, Me19); 1.46 (1H, m, H11); 1.53 (1H, m, H8); 1.65 (1H, m, H15); 1.69 (1H, m, H16); 1.83 (1H, m, H11); 1.97 (1H, m, H12); 2.04 (1H, m, H20); 2.05 (1H, m, H23 α); 2.16 (3H, s, Me28); 2.17 (1H, m, H7 β); 2.56 (1H, m, H23 β); 3.26 (1H, sa, H6); 3.79 (1H, d, J = 5.8 Hz, H4); 4.45 (1H, dt, J = 3.4, 13.2 Hz, H22); 5.18 (2H, sa, H27); 6.23 (1H, d, J = 10.0 Hz, H2); 6.95 (1H, dd, J = 5.8, 10.0 Hz, H3); OBz [7.44 (2H, t, J = 7.6 Hz); 7.57 (1H, t, J = 7.6 Hz); 8.05 (2H, d, J = 7.6 Hz)].

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ : 11.4 (c, C18); 13.1 (c, C21); 17.2 (c, C19); 20.5 (c, C28); 21.9 (t, C11); 24.0 (t, C15); 27.1 (t, C16); 29.5 (d, C8); 29.9 (t, C23); 30.9 (t, C7); 38.6 (d, C20); 39.1 (t, C12); 42.4 (s, C13); 43.9 (d, C9); 47.4 (s, C10); 51.7 (d, C17); 55.8 (d, C14); 58.2 (t, C27); 62.3 (d, C6); 63.6 (s, C5); 69.7 (d, C4); 78.0 (d, C22); 121.8 (s, C25); 132.1 (d, C2); 141.7 (d, C3); 156.9 (s, C24); 165.1 (s, C26); 202.1 (s, C1); OBz [128.1 (2 x d); 129.5 (2 x d); 129.8 (s); 132.8 (d); 166.2 (s)].

EM (IE) m/z (%): 574 [M⁺] (1), 451 (4), 434 (4), 389 (21), 329 (10), 311 (16), 267 (4), 245 (6), 187 (4), 161 (6), 131 (16), 124 (50), 105 (100), 95 (20), 77 (34).

EMAR m/z : Observado 574.2916 (calculado para C₃₅H₄₂O₇ [M⁺]: 574.2931).

• Esterificación de 1 con cloruro de laurilo



Tratamiento de 13.0 mg de 1 (0.03 mmoles, 1 eq) con 15 µl de cloruro de lauroilo (0.07 mmoles, 2.3 eq) a 0 °C durante y 1.5 horas, siguiendo la metodología descrita para la obtención de 4, rindió 7.5 mg de 7 (R= 38%) y 15.6 mg de 8 (R= 62%) como sólidos amorfos.

27-O-Lauroilwithaferina A (7)

[α]_D²⁵: + 56.2 (c 0.75, CHCl₃).

IR γ_{max} (película): 3434, 2924, 2854, 1713, 1461, 1379, 1267, 1037, 1066, 967 cm⁻¹.

UV (EtOH) λ_{max} (log ε): 217 (4.1); 283 (2.7) nm.

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ: 0.70 (3H, s, Me18); 0.97 (1H, m, H14); 1.00 (3H, d, J= 6.7 Hz, Me21); 1.05 (1H, m, H9); 1.11 (1H, m, H17); 1.15 (1H, m, H12); 1.19 (1H, m, H15); 1.40 (1H, m, H16); 1.41 (3H, s, Me19); 1.50 (1H, m, H11); 1.54 (1H, m, H8); 1.68 (1H, m, H15); 1.70 (2H, m, H7α, H16); 1.87 (1H, m, H11); 1.98 (1H, m, H12); 2.03 (1H, m, H20); 2.04 (1H, m, H23α); 2.06 (3H, s, Me28); 2.18 (1H, m, H7β); 2.55 (1H, m, H23β); 3.24 (1H, sa, H6); 3.76 (1H, d, J= 5.9 Hz, H4); 4.40 (1H, dt, J= 3.1, 10.3 Hz, H22); 4.86, 4.90 (2H, d_{AB}, J= 13.0 Hz, H27); 6.20 (1H, d, J= 10.0 Hz, H2); 6.93 (1H, dd, J= 5.9, 10.0 Hz, H3); OLauryl [0.87 (3H, t, J= 6.3 Hz); 1.27 (14H, m); 1.31 (2H, m); 1.62 (2H, m); 2.29 (2H, t, J= 7.5 Hz)].

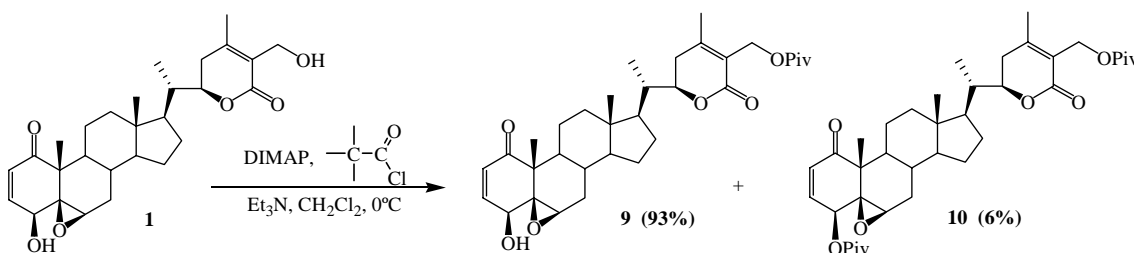
RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ: 11.6 (c, C18); 13.3 (c, C21); 17.4 (c, C19); 20.6 (c, C28); 22.2 (t, C11); 24.2 (t, C15); 27.3 (t, C16); 29.4 (d, C8); 29.8 (t, C23); 31.1 (t, C7); 38.8 (d, C20); 39.3 (t, C12); 42.6 (s, C13); 44.1 (d, C9); 47.7 (s, C10); 52.0 (d, C17); 56.1 (d, C14); 57.8 (t, C27); 62.6 (d, C6); 63.9 (s, C5); 69.9 (d, C4); 78.2 (d, C22); 122.0 (s, C25); 132.3 (d, C2); 141.9 (d, C3); 156.7 (s, C24); 165.3 (s, C26); 202.3 (s, C1); OLauryl [14.1 (c); 22.7 (t); 24.9 (t); 29.2 (t); 29.6 (6 x t); 34.2 (t); 173.7 (s)].

ESIMS m/z (%): 675 [M+Na]⁺ (100).

ESI/MS-AR m/z: Observado 675.4255 (calculado para C₄₀H₆₀O₇Na [M+Na]⁺: 675.4237).

4,27-Di-O-lauroilwithaferina A (8)	
$[\alpha]_D^{25}$:	+ 81.2 (<i>c</i> 1.56, CHCl ₃).
IR γ_{\max} (película):	2925, 2854, 1736, 1462, 1378, 1233, 1159, 1066, 960, 723 cm ⁻¹ .
UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ):	217 (4.2) nm.
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ:	0.72 (3H, s, Me18); 0.88 (1H, m, H9); 0.95 (1H, m, H14); 1.02 (3H, d, <i>J</i> = 6.6 Hz, Me21); 1.07 (1H, m, H12); 1.10 (1H, m, H17); 1.18 (1H, m, H15); 1.40 (1H, m, H16); 1.42 (3H, s, Me19); 1.50 (2H, m, H8, H11); 1.69 (1H, m, H15); 1.71 (2H, m, H7 α , H16); 1.72 (1H, m, H11); 1.98 (1H, m, H12); 2.03 (2H, m, H20, H23 α); 2.08 (3H, s, Me28); 2.20 (1H, m, H7 β); 2.53 (1H, m, H23 β); 3.23 (1H, sa, H6); 4.41 (1H, dt, <i>J</i> = 3.3, 13.2 Hz, H22); 4.69 (1H, d, <i>J</i> = 6.1 Hz, H4); 4.88, 4.92 (2H, d _{AB} , <i>J</i> = 12.0 Hz, H27); 6.26 (1H, d, <i>J</i> = 9.8 Hz, H2); 7.05 (1H, dd, <i>J</i> = 6.1, 9.8 Hz, H3); OLau-27 [0.90 (3H, t, <i>J</i> = 6.3 Hz); 1.27 (14H, m); 1.30 (2H, m); 1.62 (2H, m); 2.31 (2H, t, <i>J</i> = 7.6 Hz)]; OLau-4 [0.90 (3H, t, <i>J</i> = 6.3 Hz); 1.27 (14H, m); 1.30 (2H, m); 1.62 (2H, m); 2.31 (2H, t, <i>J</i> = 7.6 Hz)].
RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ:	11.5 (c, C18); 13.3 (c, C21); 15.7 (c, C19); 20.6 (c, C28); 21.3 (t, C11); 24.2 (t, C15); 27.3 (t, C16); 29.5 (d, C8); 30.1 (t, C23); 31.1 (t, C7); 38.7 (d, C20); 39.2 (t, C12); 42.6 (s, C13); 44.2 (d, C9); 48.1 (s, C10); 51.9 (d, C17); 56.1 (d, C14); 57.8 (t, C27); 60.2 (d, C6); 61.0 (s, C5); 71.9 (d, C4); 78.1 (d, C22); 122.1 (s, C25); 133.7 (d, C2); 139.9 (d, C3); 156.7 (s, C24); 165.2 (s, C26); 201.3 (s, C1); OLau-27 [14.1 (c); 22.7 (t); 24.9 (t); 29.2 (t); 29.6 (6 x t); 34.2 (t); 173.7 (s)]; OLau-4 [14.1 (c); 22.7 (t); 24.8 (t); 29.1 (t); 29.6 (6 x t); 34.1 (t); 173.1 (s)].
ESIMS <i>m/z</i> (%):	857 [M+Na] ⁺ (100).
ESI/MS-AR <i>m/z</i>:	Observado 857.5934 (calculado para C ₅₂ H ₈₂ O ₈ Na [M+Na] ⁺ : 857.5907).

• Esterificación de 1 con cloruro de pivaloilo



A una disolución de 15.0 mg de **1** (0.03 mmoles, 1 eq) en 2.0 ml de CH₂Cl₂ seco y a 0 °C, se le adicionó 0.05 ml de Et₃N (0.32 mmoles, 10 eq), una cantidad catalítica de DIMAP y 15 µl de cloruro de pivaloilo (0.12 mmoles, 4 eq). La reacción se agitó bajo atmosfera de N₂ y a 0 °C durante 1 hora, tras lo cual se eliminó el disolvente. El residuo fue purificado por columna de gel de sílice, usando como eluyente un gradiente de polaridad (del 0% al 20%) de CH₂Cl₂/acetona, obteniéndose 16.6 mg de **9** (R= 93%) y 1.2 mg de **10** (R= 6%) como sólidos amorfos.

27-O-Pivaloilwithaferina A (9)

[α]²⁵_D: + 75.9 (c 0.71, CHCl₃).

IR γ_{max} (película): 3466, 2932, 2871, 1713, 1460, 1397, 1282, 1153, 1034, 754 cm⁻¹.

UV (EtOH) λ_{max} (log ε): 214 (4.3) nm.

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ: 0.72 (3H, s, Me18); 0.96 (1H, m, H14); 1.02 (3H, d, J= 6.5 Hz, Me21); 1.03 (1H, m, H9); 1.10 (1H, m, H17); 1.13 (1H, m, H12); 1.19 (1H, m, H15); 1.30 (1H, m, H7α); 1.40 (1H, m, H16); 1.43 (3H, s, Me19); 1.47 (1H, m, H11); 1.52 (1H, m, H8); 1.65 (1H, m, H15); 1.68 (1H, m, H16); 1.85 (1H, m, H11); 1.96 (1H, m, H12); 2.03 (2H, m, H20, H23α); 2.07 (3H, s, Me28); 2.17 (1H, m, H7β); 2.53 (1H, m, H23β); 3.25 (1H, sa, H6); 3.78 (1H, d, J= 5.9 Hz, H4); 4.39 (1H, da, J= 13.0 Hz, H22); 4.86, 4.90 (2H, d_{AB}, J= 12.5 Hz, H27); 6.22 (1H, d, J= 10.0 Hz, H2); 6.95 (1H, dd, J= 5.9, 10.0 Hz, H3); OPiv [1.20 (9H, s)].

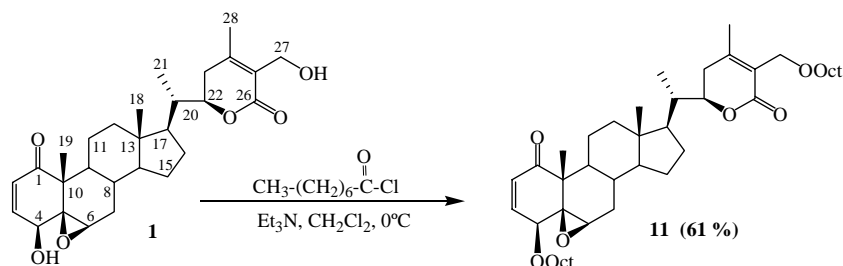
RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ: 11.6 (c, C18); 13.3 (c, C21); 17.4 (c, C19); 20.5 (c, C28); 22.1 (t, C11); 24.2 (t, C15); 27.3 (t, C16); 29.8 (t, C23); 30.1 (d, C8); 31.2 (t, C7); 38.8 (d, C20); 39.3 (t, C12); 42.6 (s, C13); 44.1 (d, C9); 47.7 (s, C10); 52.0 (d, C17); 56.1 (d, C14); 58.1 (t, C27); 62.5 (d, C6); 63.8 (s, C5); 69.9 (d, C4); 78.2 (d, C22); 122.1 (s, C25); 132.2 (d, C2); 141.9 (d, C3); 156.5 (s, C24); 165.1 (s, C26); 202.3 (s, C1); OPiv [27.1 (3 x c); 38.8 (s); 178.4 (s)].

EM (IE) m/z (%): 554 [M⁺] (5), 536 (5), 452 (6), 434 (7), 416 (5), 329 (9), 311 (13), 299 (6), 241 (6), 225 (16), 175 (11), 161 (12), 141 (13), 124 (53), 107 (16), 95 (49), 57 (100).

EMAR m/z: Observado 554.3263 (calculado para C₃₃H₄₆O₇ [M⁺]: 554.3244).

4,27-Di-O-pivaloilwithaferina A (10)	
[α]²⁵_D:	+ 117.2 (c 0.64, CHCl ₃).
IR γ_{\max} (película):	2970, 2872, 1727, 1461, 1396, 1280, 1151, 1032, 960, 756 cm ⁻¹ .
UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ)	215 (4.3) nm.
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ:	0.72 (3H, s, Me18); 0.91 (1H, m, H9); 0.95 (1H, m, H14); 1.02 (3H, d, J= 6.6 Hz, Me21); 1.08 (1H, m, H12); 1.09 (1H, m, H17); 1.19 (1H, m, H15); 1.30 (1H, m, H7 α); 1.40 (1H, m, H16); 1.44 (3H, s, Me19); 1.49 (1H, m, H11); 1.52 (1H, m, H8); 1.66 (1H, m, H15); 1.70 (1H, m, H16); 1.72 (1H, m, H11); 1.97 (1H, m, H12); 2.01 (1H, m, H20); 2.03 (1H, m, H23 α); 2.07 (3H, s, Me28); 2.18 (1H, m, H7 β); 2.52 (1H, m, H23 β); 3.23 (1H, sa, H6); 4.39 (1H, da, J= 13.0 Hz, H22); 4.66 (1H, d, J= 6.0 Hz, H4); 4.86, 4.90 (2H, d _{AB} , J= 12.3 Hz, H27); 6.25 (1H, d, J= 9.8 Hz, H2); 7.04 (1H, dd, J= 6.0, 9.8 Hz, H3); 2 x OPiv [1.20 (18H, s)].
RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ:	11.5 (c, C18); 13.3 (c, C21); 15.7 (c, C19); 20.5 (c, C28); 21.4 (t, C11); 24.2 (t, C15); 27.3 (t, C16); 29.6 (d, C8); 30.1 (t, C23); 31.1 (t, C7); 38.7 (d, C20); 39.2 (t, C12); 42.6 (s, C13); 44.2 (d, C9); 48.1 (s, C10); 51.9 (d, C17); 56.1 (d, C14); 58.1 (t, C27); 60.2 (d, C6); 61.1 (s, C5); 71.9 (d, C4); 78.2 (d, C22); 122.2 (s, C25); 133.6 (d, C2); 140.1 (d, C3); 156.4 (s, C24); 165.2 (s, C26); 201.3 (s, C1); OPiv-27 [27.1 (3 x c); 38.7 (s); 178.4 (s)]; OPiv-4 [27.0 (3 x c); 38.7 (s); 177.6 (s)].
EM (IE) m/z (%):	638 [M ⁺] (0.2), 537 (2), 431 (17), 416 (3), 311 (10), 293 (4), 241 (3), 225 (7), 175 (5), 161 (7), 141 (6), 131 (16), 124 (15), 107 (8), 95 (21), 57 (100).
EMAR m/z:	Observado 638.3819 (calculado para C ₃₈ H ₅₄ O ₈ [M ⁺]: 638.3819).

• Esterificación de **1** con cloruro de octanoilo



La esterificación de 12.0 mg de **1** (0.025 mmoles, 1 eq) con 50 μ l de cloruro de octanoilo (0.29 mmoles, 11 eq), se llevó a cabo durante 2.0 horas siguiendo la metodología descrita para la obtención de **4**, lo que rindió 9.1 mg de **11** (R= 61%) como un sólido amorfo.

4,27-Di-O-octanoilwithaferina A (11)

$[\alpha]_D^{25}$: + 124.9 (c 0.53, CHCl₃).

IR γ_{\max} (película): 2931, 2860, 1739, 1464, 1382, 1254, 1164, 1112, 1047, 966 cm⁻¹.

UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ): 218 (4.4) nm.

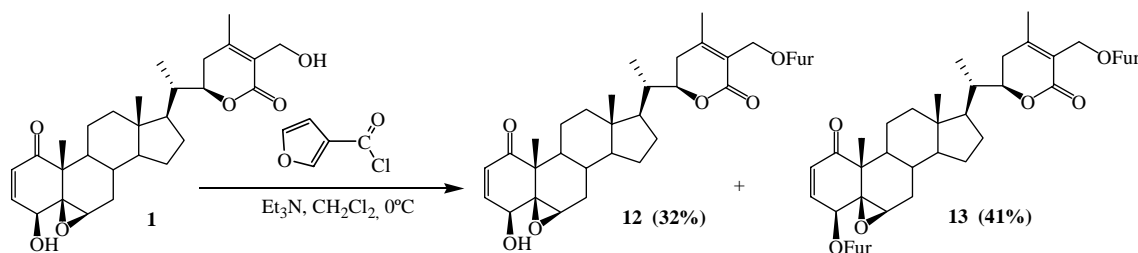
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ : 0.72 (3H, s, Me18); 0.89 (1H, m, H9); 0.94 (1H, m, H14); 1.01 (3H, d, J= 6.6 Hz, Me21); 1.08 (1H, m, H12); 1.10 (1H, m, H17); 1.31 (1H, m, H7 α); 1.40 (1H, m, H16); 1.42 (3H, s, Me19); 1.50 (1H, m, H8); 1.51 (1H, m, H11); 1.64 (2H, m, H15); 1.69 (1H, m, H16); 1.74 (1H, m, H11); 1.97 (1H, m, H12); 2.02 (1H, m, H20); 2.08 (3H, s, Me28); 2.18 (1H, m, H23 α); 2.19 (1H, m, H7 β); 2.53 (1H, m, H23 β); 3.23 (1H, sa, H6); 4.41 (1H, dt, J= 3.3, 12.8 Hz, H22); 4.69 (1H, d, J= 6.0 Hz, H4); 4.88, 4.92 (2H, d_{AB}, J= 12.0 Hz, H27); 6.26 (1H, d, J= 9.8 Hz, H2); 7.05 (1H, dd, J= 6.0, 9.8 Hz, H3); OOct-27 [0.88 (3H, t, J= 5.8 Hz); 1.27 (2H, m); 1.28 (2H, m); 1.29 (4H, m); 1.62 (2H, m); 2.32 (2H, t, J= 7.6 Hz)]; OOct-4 [0.88 (3H, t, J= 5.8 Hz); 1.27 (2H, m); 1.28 (2H, m); 1.29 (4H, m); 1.62 (2H, m); 2.32 (2H, t, J= 7.6 Hz)].

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ : 11.3 (c, C18); 13.1 (c, C21); 15.5 (c, C19); 20.3 (c, C28); 21.1 (t, C11); 24.1 (t, C15); 27.1 (t, C16); 29.3 (d, C8); 29.9 (t, C23); 30.9 (t, C7); 38.5 (d, C20); 39.0 (t, C12); 42.3 (s, C13); 43.9 (d, C9); 47.9 (s, C10); 51.7 (d, C17); 55.8 (d, C14); 57.6 (t, C27); 60.0 (d, C6); 60.8 (s, C5); 71.7 (d, C4); 77.9 (d, C22); 121.9 (s, C25); 133.5 (d, C2); 139.8 (d, C3); 156.5 (s, C24); 165.0 (s, C26); 201.0 (s, C1); OOct-27 [13.8 (c); 22.3 (t); 24.7 (t); 28.6 (t); 28.7 (t); 31.4 (t); 33.9 (t); 173.5 (s)]; OOct-4 [13.8 (c); 22.3 (t); 24.6 (t); 28.7 (t); 28.8 (t); 31.3 (t); 33.8 (t); 172.7 (s)].

ESIMS m/z (%): 745 [M+Na]⁺ (100).

ESI/MS-AR m/z : Observado 745.4669 (calculado para C₄₄H₆₆O₈Na [M+Na]⁺: 745.4655).

• Esterificación de **1** con cloruro de furoilo



Tratamiento de 20.0 mg de **1** (0.042 mmoles, 1 eq) con 12 μ l de cloruro de 3-furoilo (0.092 mmoles, 2.2 eq), siguiendo la metodología descrita para la obtención de **4**, rindió los productos **12** (7.2 mg, R= 32%) y **13** (10.8 mg, R= 41%) como sólidos amorfos.

27-O-Furoilwithaferina A (12)

$[\alpha]_D^{25}$: + 66.0 (c 0.43, CHCl₃)

IR γ_{\max} (película): 3438, 2927, 2857, 1715, 1465, 1400, 1296, 1121, 1040, 761 cm⁻¹.

UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ): 214 (3.8); 250 (3.5); 291 (2.9) nm.

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ : 0.73 (3H, s, Me18); 0.97 (1H, m, H14); 1.03 (3H, d, J= 6.6 Hz, Me21); 1.06 (1H, m, H9); 1.11 (1H, m, H17); 1.15 (1H, m, H12); 1.19 (1H, m, H15); 1.29 (1H, m, H7 α); 1.41 (1H, m, H16); 1.43 (3H, s, Me19); 1.48 (1H, m, H11); 1.54 (1H, m, H8); 1.66 (1H, m, H15); 1.69 (1H, m, H16); 1.84 (1H, m, H11); 1.97 (1H, m, H12); 2.04 (1H, m, H20); 2.05 (1H, m, H23 α); 2.15 (3H, s, Me28); 2.17 (1H, m, H7 β); 2.56 (1H, m, H23 β); 3.26 (1H, sa, H6); 3.78 (1H, d, J= 5.8 Hz, H4); 4.44 (1H, da, J= 13.0 Hz, H22); 5.15 (2H, sa, H27); 6.22 (1H, d, J= 10.0 Hz, H2); 6.95 (1H, dd, J= 5.8, 10.0 Hz, H3); OFur [6.51 (1H, d, J= 1.4 Hz); 7.21 (1H, d, J= 2.8 Hz); 7.59 (1H, s)].

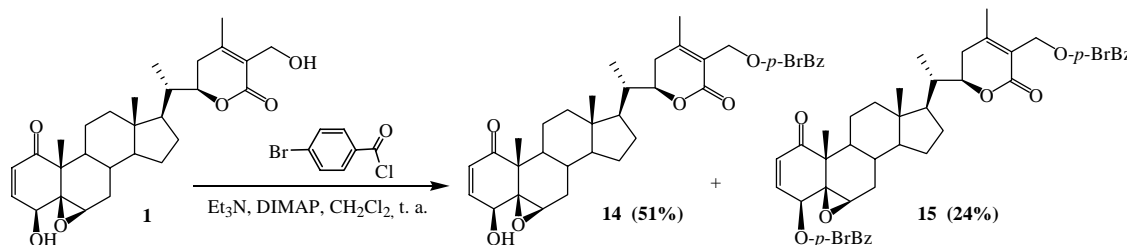
RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ : 11.5 (c, C18); 13.3 (c, C21); 17.5 (c, C19); 20.8 (c, C28); 22.2 (t, C11); 24.2 (t, C15); 27.2 (t, C16); 29.5 (d, C8); 30.3 (t, C23); 31.1 (t, C7); 38.5 (d, C20); 39.3 (t, C12); 42.4 (s, C13); 44.0 (d, C9); 47.4 (s, C10); 52.0 (d, C17); 56.3 (d, C14); 58.3 (t, C27); 62.7 (d, C6); 63.7 (s, C5); 69.8 (d, C4); 78.1 (d, C22); 121.8 (s, C25); 132.5 (d, C2); 142.0 (d, C3); 157.3 (s, C24); 165.2 (s, C26); 202.3 (s, C1); OFur [111.7 (d); 118.2 (d); 144.2 (s); 146.6 (d); 158.5 (s)].

ESIMS m/z (%): 587 [M+Na]⁺ (100).

ESI/MS-AR m/z : Observado 587.2629 (calculado para C₃₃H₄₀O₈Na [M+Na]⁺: 587.2621).

4,27-Di-O-furoilwithaferina A (13)	
[α]_D²⁵:	+ 82.8 (c 0.68, CHCl ₃).
IR γ_{\max} (película):	2926, 2856, 1722, 1578, 1470, 1395, 1293, 1177, 1113, 951, 758 cm ⁻¹ .
UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ):	215 (3.9); 248 (3.5); 290 (3.0) nm.
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ:	0.73 (3H, s, Me18); 0.94 (1H, m, H9); 0.96 (1H, m, H14); 1.03 (3H, d, J= 6.6 Hz, Me21); 1.11 (1H, m, H12); 1.12 (1H, m, H17); 1.19 (1H, m, H15); 1.35 (1H, m, H7 α); 1.41 (1H, m, H16); 1.51 (3H, s, Me19); 1.54 (2H, m, H8, H11); 1.68 (1H, m, H15); 1.70 (1H, m, H16); 1.77 (1H, m, H11); 1.98 (1H, m, H12); 2.04 (1H, m, H22); 2.07 (1H, m, H23 α); 2.15 (3H, s, Me28); 2.22 (1H, m, H7 β); 2.56 (1H, m, H23 β); 3.30 (1H, sa, H6); 4.45 (1H, dt, J= 3.2, 13.2 Hz, H22); 4.92 (1H, d, J= 6.1 Hz, H4); 5.12, 5.17 (2H, d _{AB} , J= 11.5 Hz, H27); 6.32 (1H, d, J= 9.8 Hz, H2); 7.12 (1H, dd, J= 6.1, 9.8 Hz, H3); OFur-27 [6.52 (1H, d, J= 1.4 Hz)]; 7.20 (1H, d, J= 3.4 Hz); 7.59 (1H, s)]; OFur-4 [6.52 (1H, d, J= 1.4 Hz); 7.15 (1H, d, J= 3.7 Hz); 7.60 (1H, s)].
RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ:	11.3 (c, C18); 13.1 (c, C21); 15.5 (c, C19); 20.5 (c, C28); 21.1 (t, C11); 24.0 (t, C15); 27.1 (t, C16); 29.4 (d, C8); 30.1 (t, C23); 30.9 (t, C7); 38.5 (d, C20); 38.9 (t, C12); 42.3 (s, C13); 43.9 (d, C9); 47.9 (s, C10); 51.7 (d, C17); 55.8 (d, C14); 58.1 (t, C27); 60.1 (d, C6); 60.8 (s, C5); 72.2 (d, C4); 77.9 (d, C22); 121.5 (s, C25); 134.1 (d, C2); 139.2 (d, C3); 157.3 (s, C24); 164.9 (s, C26); 200.9 (s, C1); OFur-27 [111.8 (d); 118.6 (d); 144.1 (s); 146.7 (d); 158.3 (s)]; OFur-4 [111.6 (d); 118.1 (d); 143.4 (s); 146.2 (d); 157.4 (s)].
EM (IE) m/z (%):	546 [M- M-C ₅ H ₄ O ₃] ⁺ (1), 434 (2), 311 (26), 293 (10), 241 (2), 218 (12), 187 (4), 143 (64), 131 (12), 124 (153), 111 (34), 95 (100).
EMAR m/z:	Observado 546.2650 (calculado para C ₃₃ H ₃₈ O ₇ [M-C ₅ H ₄ O ₃] ⁺ : 546.2618).

• Esterificación de **1** con cloruro de *p*-bromo-benzoilo



La reacción de 14.0 mg de **1** (0.03 mmoles, 1 eq) con 12.6 mg de cloruro de *p*-bromobenzoilo (0.06 mmoles, 2 eq), a temperatura ambiente durante 4 h, se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita para la obtención de **9**, obteniéndose 10.1 mg de **14** (R= 51%) y 5.7 mg de **15** (R= 24%) como sólidos amorfos.

27-O-(*p*-Bromobenzoil)-withaferina A (14**)**

$[\alpha]_D^{25}$: + 57.4 (c 0.6, CHCl₃)

IR γ_{\max} (película): 3433, 2924, 2855, 1713, 1590, 1459, 1398, 1270, 1104, 1012, 756 cm⁻¹.

UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ): 220 (3.6); 244 (3.8) nm.

RMN ¹H
(CDCl₃, 400 MHz) δ : 0.73 (3H, s, Me18); 0.98 (1H, m, H14); 1.04 (3H, d, *J* = 6.6 Hz, Me21); 1.09 (1H, m, H9); 1.16 (2H, m, H12, H17); 1.31 (1H, m, H7 α); 1.41 (1H, m, H16); 1.44 (3H, s, Me19); 1.55 (1H, m, H8); 1.66 (1H, m, H15); 1.70 (1H, m, H16); 1.85 (1H, m, H11); 1.98 (1H, m, H12); 2.05 (1H, m, H20); 2.08 (1H, m, H23 α); 2.16 (3H, s, Me28); 2.18 (1H, m, H7 β); 2.55 (1H, m, H23 β); 3.26 (1H, sa, H6); 3.79 (1H, d, *J* = 5.8 Hz, H4); 4.45 (1H, dt, *J* = 3.3, 13.1 Hz, H22); 5.16 (2H, sa, H27); 6.23 (1H, d, *J* = 10.0 Hz, H2); 6.95 (1H, dd, *J* = 5.8, 10.0 Hz, H3); *O-p*-BrBz [7.58 (2H, d, *J* = 8.6 Hz); 7.90 (2H, d, *J* = 8.6 Hz)].

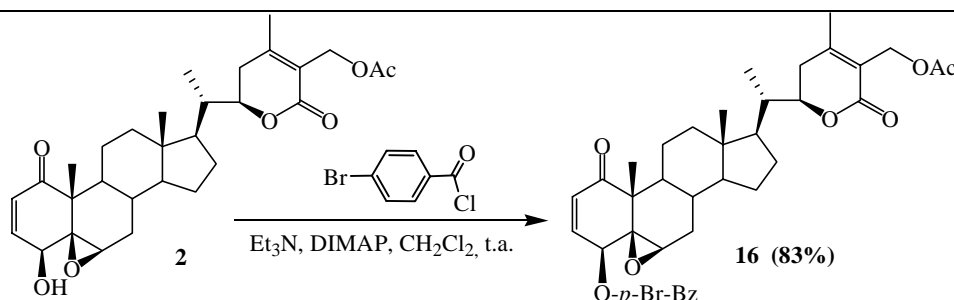
RMN ¹³C
(CDCl₃, 100 MHz) δ : 11.4 (c, C18); 13.1 (c, C21); 17.3 (c, C19); 20.5 (c, C28); 22.0 (t, C11); 24.1 (t, C15); 27.1 (t, C16); 28.6 (d, C8); 30.0 (t, C23); 30.9 (t, C7); 38.6 (d, C20); 39.1 (t, C12); 42.4 (s, C13); 43.9 (d, C9); 47.5 (s, C10); 51.7 (d, C17); 55.8 (d, C14); 58.5 (t, C27); 62.4 (d, C6); 63.6 (s, C5); 69.7 (d, C4); 78.0 (d, C22); 121.7 (s, C25); 132.1 (d, C2); 141.7 (d, C3); 157.2 (s, C24); 165.1 (s, C26); 202.0 (s, C1); *O-p*-BrBz [128.0 (s); 128.8 (s); 131.0 (2 x d); 131.4 (2 x d); 165.6 (s)].

EM (IE) *m/z* (%): 636 [M-H₂O]⁺ (1), 452 (1), 434 (6), 329 (18), 311 (43), 283 (9), 255 (3), 241 (10), 199 (100), 182 (95), 173 (10), 156 (40), 95 (31).

EMAR *m/z*: Observado 636.1909 (calculado para C₃₅H₃₉O₆Br [M-H₂O]⁺: 636.1910).

4,27-Di-O-(<i>p</i>-bromobenzoil)-withaferina A (15)	
[α]_D²⁵:	+ 119.8 (c 0.57, CHCl ₃)
IR γ_{\max} (película):	2925, 2855, 1720, 1589, 1458, 1397, 1267, 1098, 1011, 755 cm ⁻¹ .
UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ):	222 (3.7); 246 (3.9) nm.
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ:	0.74 (3H, s, Me18); 0.96 (1H, m, H9); 0.98 (1H, m, H14); 1.04 (3H, d, J= 6.6 Hz, Me21); 1.10 (1H, m, H12); 1.12 (1H, m, H17); 1.35 (1H, m, H7 α); 1.42 (1H, m, H16); 1.52 (1H, m, H8); 1.52 (3H, s, Me19); 1.70 (1H, m, H15); 1.71 (1H, m, H16); 1.78 (1H, m, H11); 1.98 (1H, m, H12); 2.04 (1H, m, H20); 2.09 (1H, m, H23 α); 2.16 (3H, s, Me28); 2.22 (1H, m, H7 β); 2.59 (1H, m, H23 β); 3.32 (1H, sa, H6); 4.44 (1H, dt, J= 3.2, 13.1 Hz, H22); 4.96 (1H, d, J= 6.0 Hz, H4); 5.16 (2H, sa, H27); 6.33 (1H, d, J= 9.8 Hz, H2); 7.14 (1H, dd, J= 6.0, 9.8 Hz, H3); O- <i>p</i> -BrBz-27 [7.58 (2H, d, J= 8.5 Hz); 7.90 (2H, d, J= 8.5 Hz)]; O- <i>p</i> -BrBz-4 [7.60 (2H, d, J= 8.5 Hz); 7.83 (2H, d, J= 8.4 Hz)].
RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ:	11.4 (c, C18); 13.2 (c, C21); 15.7 (c, C19); 20.5 (c, C28); 21.2 (t, C11); 24.1 (t, C15); 27.1 (t, C16); 29.4 (d, C8); 29.9 (t, C23); 30.9 (t, C7); 38.6 (d, C20); 38.9 (t, C12); 42.4 (s, C13); 43.9 (d, C9); 47.9 (s, C10); 51.7 (d, C17); 55.8 (d, C14); 58.4 (t, C27); 60.2 (d, C6); 60.9 (s, C5); 72.6 (d, C4); 78.0 (d, C22); 121.7 (s, C25); 134.1 (d, C2); 139.3 (d, C3); 157.1 (s, C24); 165.0 (s, C26); 200.9 (s, C1); O- <i>p</i> -BrBz-27 [128.0 (s); 128.7 (s); 131.0 (2 x d); 131.4 (2 x d); 165.6 (s)]; O- <i>p</i> -BrBz-4 [128.0 (s); 128.4 (s); 131.0 (2 x d); 131.7 (2 x d); 164.9 (s)].
EM (IE) m/z (%):	634 [M-(<i>p</i> -Br-OBz)] ⁺ (1), 493 (2), 311 (23), 293 (11), 241 (2), 223 (3), 199 (50), 182 (100), 161 (7), 154 (19), 124 (13), 91 (7).
EMAR m/z:	Observado 634.1973 (calculado para C ₃₅ H ₃₉ O ₆ Br [M-(<i>p</i> -Br-OBz)] ⁺ : 634.1930).

• Esterificación de **2** con cloruro de *p*-bromo-benzoilo



25.0 mg de **2** (0.05 mmoles, 1 eq) se trataron con 12 mg de cloruro de *p*-bromo-benzoilo (0.055 mmoles, 1.1 eq), durante 13 horas y a temperatura ambiente, siguiendo la metodología descrita para la obtención de **9**. La mezcla fue purificada por cromatografía en placa preparativa, usando como fase móvil CH₂Cl₂/acetona al 4%, obteniéndose el producto **16** (27.5 mg, R= 83%) como un sólido amorfo.

27-O-Acetil- 4-O-(*p*-bromobenzoil)-withaferina A (16**)**

$[\alpha]_D^{25}$: + 140.1 (*c* 0.63, CHCl₃)

IR γ_{\max} (película): 2926, 2856, 1717, 1590, 1457, 1397, 1264, 1096, 1013, 755 cm⁻¹.

UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ): 220 (4.3); 244 (4.3) nm.

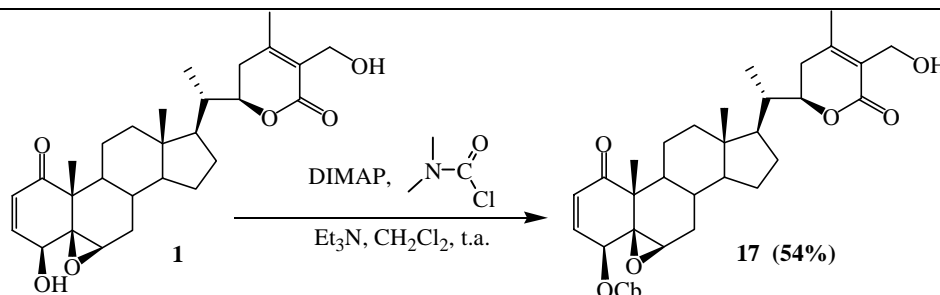
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ : 0.73 (3H, s, Me18); 0.96 (1H, m, H9); 0.97 (1H, m, H14); 1.02 (3H, d, *J*= 6.5 Hz, Me21); 1.10 (1H, m, H12); 1.11 (1H, m, H17); 1.18 (1H, m, H15); 1.36 (1H, m, H7 α); 1.41 (1H, m, H16); 1.50 (1H, m, H11); 1.52 (3H, s, Me19); 1.54 (1H, m, H8); 1.68 (1H, m, H15); 1.71 (1H, m, H16); 1.74 (1H, m, H11); 1.99 (1H, m, H12); 2.03 (1H, m, H23 α); 2.05 (1H, m, H20); 2.09 (3H, s, Me28); 2.22 (1H, m, H7 β); 2.54 (1H, m, H23 β); 3.32 (1H, sa, H6); 4.43 (1H, dt, *J*= 3.3, 12.7 Hz, H22); 4.88, 4.92 (2H, d_{AB}, *J*= 12.4 Hz, H27); 4.96 (1H, d, *J*= 6.2 Hz, H4); 6.33 (1H, d, *J*= 9.8 Hz, H2); 7.15 (1H, dd, *J*= 6.2, 9.8 Hz, H3); OAc-27 [2.08 (3H, s)]; O-*p*-BrBz-4 [7.59 (2H, d, *J*= 8.0 Hz); 7.83 (2H, d, *J*= 8.0 Hz)].

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ : 11.6 (c, C18); 13.3 (c, C21); 15.9 (c, C19); 20.6 (c, C28); 21.4 (t, C11); 24.2 (t, C15); 27.3 (t, C16); 29.6 (d, C8); 30.1 (t, C23); 31.1 (t, C7); 38.8 (d, C20); 39.2 (t, C12); 42.6 (s, C13); 44.2 (d, C9); 48.1 (s, C10); 51.9 (d, C17); 56.1 (d, C14); 58.0 (t, C27); 60.4 (d, C6); 61.3 (s, C5); 72.8 (d, C4); 78.1 (d, C22); 121.9 (s, C25); 134.3 (d, C2); 139.5 (d, C3); 157.1 (s, C24); 165.3 (s, C26); 201.1 (s, C1); OAc-27 [20.9 (c); 170.9 (s)]; O-*p*-BrBz-4 [128.3 (s); 128.9 (s); 131.2 (2 x d); 131.9 (2 x d); 165.3 (s)].

EM (IE) *m/z* (%): 511 [M-*p*-BrBz]⁺ (1), 495 (2), 416 (2), 389 (5), 311 (26), 293 (10), 239 (4), 223 (4), 199 (20), 182 (100), 161 (12), 156 (14), 95 (20).

EMAR *m/z*: Observado 511.1498 (calculado para C₃₀H₃₉O₇ [M-*p*-BrBz]⁺: 511.1484).

• Esterificación de 1 con cloruro de carbamoilo



Se llevó a cabo la esterificación de 14.2 mg de **1** (0.03 mmoles, 1 eq) con 10 μ l de cloruro de carbamoilo (0.093 mmoles, 3.1 eq), a temperatura ambiente y durante 48 horas, siguiendo la metodología descrita para la obtención de **9**, lo que rindió 8.8 mg de **17** (R= 54%) como un sólido amorfo.

4-O-Carbamoilwithaferina A (17)

$[\alpha]_{25}^D$: + 120.0 (c 0.80, CHCl₃).

IR γ_{\max} (película): 3466, 2932, 2871, 1713, 1460, 1397, 1282, 1153, 1034, 965 cm⁻¹.

UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ): 214 (4.3) nm.

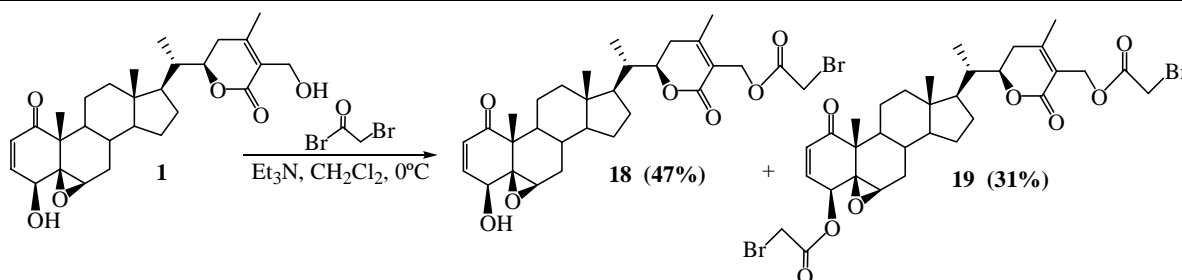
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ : 0.72 (3H, s, Me18); 0.96 (1H, m, H9); 0.98 (1H, m, H14); 1.02 (3H, d, J= 6.6 Hz, Me21); 1.10 (1H, m, H12); 1.12 (1H, m, H17); 1.19 (1H, m, H15); 1.40 (1H, m, H16); 1.41 (3H, s, Me19); 1.51 (1H, m, H8); 1.68 (1H, m, H15); 1.70 (1H, m, H7 α); 1.71 (1H, m, H16); 1.72 (1H, m, H11); 1.98 (1H, m, H12); 2.02 (1H, m, H23 α); 2.03 (1H, m, H20); 2.05 (3H, s, Me28); 2.19 (1H, m, H7 β); 2.51 (1H, m, H23 β); 3.24 (1H, sa, H6); 4.36, 4.42 (2H, d_{AB}, J= 13.3 Hz, H27); 4.44 (1H, dt, J= 3.3, 13.2 Hz, H22); 4.62 (1H, d, J= 6.0 Hz, H4); 6.26 (1H, d, J= 9.8 Hz, H2); 7.11 (1H, dd, J= 6.0, 9.8 Hz, H3); Ocb-4 [2.88 (3H, s); 2.91 (3H, s)].

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ : 11.6 (c, C18); 13.3 (c, C21); 15.5 (c, C19); 20.0 (c, C28); 21.3 (t, C11); 24.2 (t, C15); 27.3 (t, C16); 29.6 (d, C8); 29.8 (t, C23); 31.1 (t, C7); 38.8 (d, C20); 39.2 (t, C12); 42.6 (s, C13); 44.1 (d, C9); 48.0 (s, C10); 51.9 (d, C17); 56.1 (d, C14); 57.5 (t, C27); 60.2 (d, C6); 61.2 (s, C5); 72.7 (d, C4); 78.7 (d, C22); 125.7 (s, C25); 133.4 (d, C2); 141.2 (d, C3); 152.7 (s, C24); 167.0 (s, C26); 201.4 (s, C1); Ocb-4 [36.2 (c); 36.6 (c); 155.6 (s)].

ESIMS m/z (%): 564 [M+Na]⁺ (100).

ESI/MS-AR m/z : Observado 564.2930 (calculado para C₃₁H₄₃NO₇Na [M+Na]⁺: 564.2937).

• Esterificación de **1** con bromuro de 2-Bromoacetilo



La reacción de 20.0 mg de **1** (0.04 mmoles, 1 eq) con 20 μl de bromuro de 2-bromoacetilo (0.25 mmoles, 6.3 eq) durante 4.5 horas y siguiendo la metodología descrita para la obtención de **4**, rindió 11.1 mg de **18** (R= 47%) y 8.9 mg de **19** (R= 31%) como sólidos amorfos.

27-O-(2'-Bromoacetil)-withaferina A (**18**)

$[\alpha]_D^{25}$: + 61.1 (c 0.15, CHCl_3)

IR γ_{max} (película): 3470, 2926, 2851, 1735, 1454, 1399, 1270, 1132, 967, 756 cm^{-1} .

UV (EtOH) λ_{max} (log ϵ): 215 (4.2) nm.

RMN ^1H (CDCl₃, 400 MHz) δ : 0.73 (3H, s, Me18); 0.94 (1H, m, H14); 1.03 (3H, d, J = 6.6 Hz, Me21); 1.04 (1H, m, H9); 1.09 (1H, m, H17); 1.14 (1H, m, H12); 1.17 (1H, m, H15); 1.28 (1H, m, H7 α); 1.38 (1H, m, H16); 1.43 (3H, s, Me19); 1.45 (1H, m, H11); 1.54 (1H, m, H8); 1.66 (1H, m, H15); 1.68 (1H, m, H16); 1.83 (1H, m, H11); 1.96 (1H, m, H12); 2.02 (1H, m, H20); 2.05 (1H, m, H23 α); 2.12 (3H, s, Me28); 2.16 (1H, m, H7 β); 2.55 (1H, m, H23 β); 3.26 (1H, sa, H6); 3.78 (1H, d, J = 6.2 Hz, H4); 4.43 (1H, dt, J = 3.5, 12.7 Hz, H22); 4.99, 5.03 (2H, d_{AB}, J = 11.9 Hz, H27); 6.22 (1H, d, J = 9.8 Hz, H2); 6.95 (1H, dd, J = 6.2, 9.8 Hz, H3); OBrAc [3.86 (2H, s)].

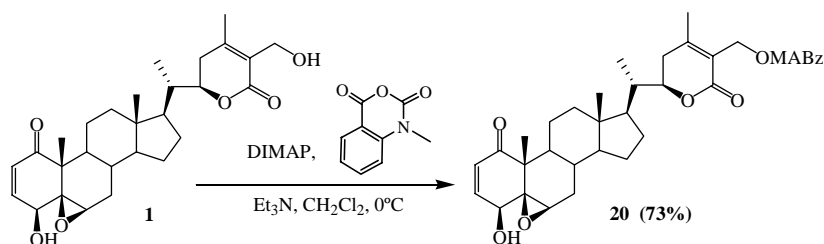
RMN ^{13}C (CDCl₃, 100 MHz) δ : 11.6 (c, C18); 13.3 (c, C21); 17.4 (c, C19); 20.7 (c, C28); 22.2 (t, C11); 24.2 (t, C15); 27.3 (t, C16); 29.8 (d, C8); 30.2 (t, C23); 31.2 (t, C7); 38.8 (d, C20); 39.3 (t, C12); 42.6 (s, C13); 44.1 (d, C9); 47.7 (s, C10); 52.0 (d, C17); 56.1 (d, C14); 59.7 (t, C27); 62.6 (d, C6); 63.8 (s, C5); 69.9 (d, C4); 78.3 (d, C22); 121.3 (s, C25); 132.2 (d, C2); 141.9 (d, C3); 157.9 (s, C24); 165.1 (s, C26); 202.3 (s, C1); OBrAc [25.8 (t); 167.2 (s)].

EM (IE) m/z (%): 590 [M^+] (1), 452 (4), 434 (8), 406 (5), 329 (17), 311 (27), 299(10), 283 (19), 263 (4), 241 (14), 183 (23), 161 (34), 124 (92), 95 (100), 67 (55).

EMAR m/z : Observado 590.1223 (calculado para $\text{C}_{30}\text{H}_{39}\text{O}_7\text{Br}$ [M^+]: 590.1218).

4,27-Di-O-(2'-bromoacetil)-withaferina A (19)	
[α]²⁵_D:	+ 110.5 (c 0.60, CHCl ₃)
IR γ_{\max} (película):	2924, 2854, 1738, 1710, 1459, 1400, 1273, 1137, 962, 755 cm ⁻¹ .
UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ):	214 (3.9) nm.
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ:	0.73 (3H, s, Me18); 0.90 (1H, m, H9); 0.94 (1H, m, H114); 1.02 (3H, d, J= 6.5 Hz, Me21); 1.09 (1H, m, H12); 1.10 (1H, m, H17); 1.18 (1H, m, H15); 1.32 (1H, m, H7 α); 1.40 (1H, m, H16); 1.43 (3H, s, Me19); 1.51 (1H, m, H8); 1.52 (1H, m, H11); 1.68 (1H, m, H15); 1.70 (1H, m, H11); 1.71 (1H, m, H16); 1.97 (1H, m, H12); 2.03 (1H, m, H20); 2.06 (1H, m, H23 α); 2.12 (3H, s, Me28); 2.20 (1H, m, H7 β); 2.54 (1H, m, H23 β); 3.26 (1H, sa, H6); 4.42 (1H, da, J= 13.2 Hz, H22); 4.77 (1H, d, J= 6.7 Hz, H4); 4.99, 5.04 (2H, d _{AB} , J= 12.1 Hz, H27); 6.32 (1H, d, J= 9.9 Hz, H2); 7.04 (1H, dd, J= 6.7, 9.9 Hz, H3); 2 x OBrAc [3.86 (4H, sa)].
RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ:	11.6 (c, C18); 13.3 (c, C21); 15.8 (c, C19); 20.7 (c, C28); 21.4 (t, C11); 24.2 (t, C15); 27.3 (t, C16); 29.5 (d, C8); 30.2 (t, C23); 31.0 (t, C7); 38.7 (d, C20); 39.2 (t, C12); 42.6 (s, C13); 44.1 (d, C9); 48.0 (s, C10); 51.9 (d, C17); 56.0 (d, C14); 59.7 (t, C27); 60.5 (d, C6); 60.8 (s, C5); 73.8 (d, C4); 78.2 (d, C22); 121.3 (s, C25); 134.6 (d, C2); 138.4 (d, C3); 157.8 (s, C24); 165.0 (s, C26); 200.8 (s, C1); OBrAc-27 [25.8 (t); 167.5 (s)]; OBrAc-4 [25.2 (t); 166.4 (s)].
ESIMS m/z (%):	733 [M+Na] ⁺ (52).
ESI/MS-AR m/z:	Observado 733.0988 (calculado para C ₃₂ H ₄₀ O ₈ Br ₂ Na [M+Na] ⁺ : 733.0988).

• Esterificación de **1** con anhídrido *N*-metilisoico



La esterificación de 15.0 mg de **1** (0.032 mmoles, 1 eq) con 9.0 mg de anhídrido *N*-metilisoico (0.048 mmoles, 1.5 eq), se llevó a cabo durante 24 horas a temperatura ambiente siguiendo la metodología descrita para la obtención de **9**. Transcurrido este tiempo, se concentró a vacío y el residuo fue purificado por cromatografía en placa de gel de sílice de capa fina (CH₂Cl₂/acetona, 9:1), obteniéndose 14 mg de **20** (R= 73%) como un sólido amorfo.

27-O-(2'-*N*-Metilaminobenzoil)-withaferina A (20**)**

[α]²⁵_D: + 59.7 (c 1.25, CHCl₃)

IR γ_{max} (película): 3382, 2925, 2868, 1680, 1580, 1518, 1459, 1399, 1237, 1125, 753 cm⁻¹.

UV (EtOH) λ_{max} (log ε): 220 (4.4), 252 (3.9), 352 (3.6) nm.

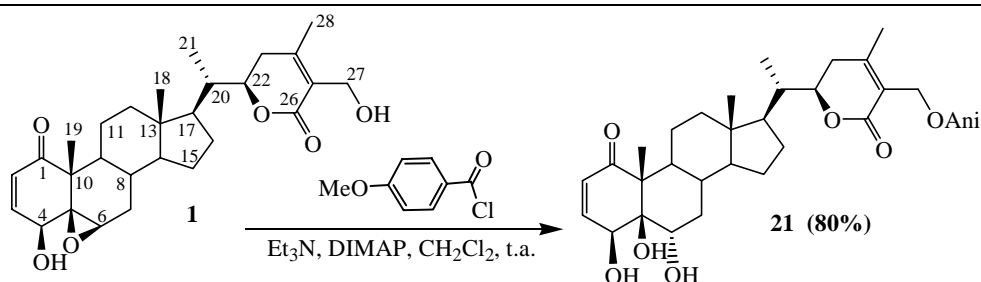
RMN ¹H
(CDCl₃, 400 MHz) δ: 0.73 (3H, s, Me18); 0.95 (1H, m, H14); 1.03 (3H, d, J= 6.3 Hz, Me21); 1.04 (1H, m, H9); 1.10 (1H, m, H17); 1.13 (1H, m, H12); 1.18 (1H, m, H15); 1.29 (1H, m, H7α); 1.43 (3H, s, Me19); 1.40 (1H, m, H16); 1.48 (1H, m, H11); 1.54 (1H, m, H8); 1.65 (1H, m, H15); 1.69 (1H, m, H16); 1.85 (1H, m, H11); 1.98 (1H, m, H12); 2.03 (1H, m, H20); 2.06 (1H, m, H23α); 2.14 (3H, s, Me28); 2.16 (1H, m, H7β); 2.56 (1H, m, H23β); 3.26 (1H, sa, H6); 3.78 (1H, d, J= 5.7 Hz, H4); 4.44 (1H, dt, J= 3.3, 13.1 Hz, H22); 5.07, 5.15 (2H, d_{AB}, J= 11.8 Hz, H27); 6.23 (1H, d, J= 10.1 Hz, H2); 6.95 (1H, dd, J= 5.7, 10.1 Hz, H3); OMABz [2.92 (3H, s, NMe); 6.58 (1H, t, J= 8.0 Hz); 6.67 (1H, d, J= 8.0 Hz); 7.39 (1H, t, J= 8.0 Hz); 7.88 (1H, d, J= 8.0 Hz)].

RMN ¹³C
(CDCl₃, 100 MHz) δ: 11.6 (c, C18); 13.3 (c, C21); 17.4 (c, C19); 20.7 (c, C28); 22.2 (t, C11); 24.2 (t, C15); 27.3 (t, C16); 29.8 (d, C8); 30.1 (t, C23); 31.2 (t, C7); 38.8 (d, C20); 39.3 (t, C12); 42.6 (s, C13); 44.1 (d, C9); 47.7 (s, C10); 52.0 (d, C17); 56.1 (d, C14); 57.6 (t, C27); 62.6 (d, C6); 63.9 (s, C5); 69.9 (d, C4); 78.2 (d, C22); 122.3 (s, C25); 132.3 (d, C2); 141.9 (d, C3); 156.8 (s, C24); 165.4 (s, C26); 202.3 (s, C1); OMABz [29.6 (c); 109.8 (s); 110.7 (d); 114.3 (d); 131.8 (d); 134.7 (d); 152.0 (s); 168.3 (s)].

ESIMS *m/z* (%): 626 [M+Na]⁺ (100).

ESI/MS-AR *m/z*: Observado 626.3099 (calculado para C₃₆H₄₅NO₇Na [M+Na]⁺: 626.3094).

• Esterificación de **1** con cloruro de anisilo



Al tratar 15.0 mg de **1** (0.032 mmoles, 1 eq) con 20 μl de cloruro de anisilo (0.14 mmoles, 4.4 eq), a temperatura ambiente y durante 2.5 horas, siguiendo la metodología descrita para la obtención de **9**, se obtuvieron 20.8 mg de **21** (R= 80%) como un sólido amorfo.

27-O-Anisilwithaferina A (21)

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$: + 29.8 (*c* 0.3, CHCl_3).

IR γ_{max} (película): 3461, 2927, 2864, 1708, 1600, 1459, 1254, 1165, 1098, 1029, 755 cm^{-1} .

UV (EtOH) λ_{max} (log ϵ): 218 (4.2); 255 (3.9) nm.

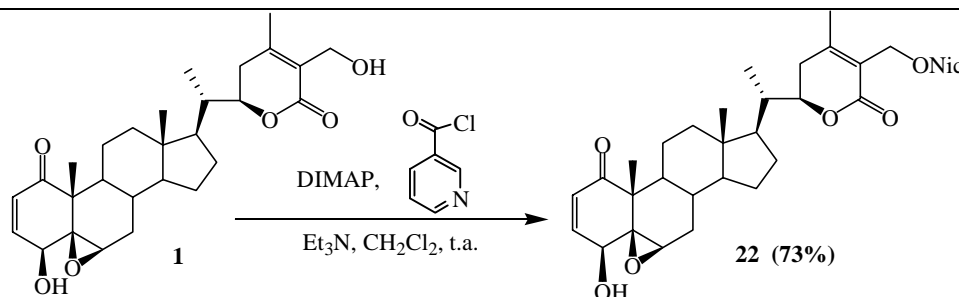
RMN ^1H (CDCl₃, 400 MHz) δ : 0.77 (3H, s, Me18); 1.06 (3H, d, *J*= 6.6 Hz; Me21); 1.18 (1H, m, H17); 1.21 (1H, m, H14); 1.22 (1H, m, H15); 1.28 (1H, m, H7 α); 1.39 (2H, m, H11, H12); 1.40 (1H, m, H16); 1.49 (1H, m, H8); 1.65 (1H, m, H15); 1.70 (3H, s, Me19); 1.71 (1H, m, H16); 1.82 (1H, m, H7 β); 1.89 (1H, m, H9); 2.02 (1H, m, H12); 2.06 (1H, m, H20); 2.08 (1H, m, H23 α); 2.17 (3H, s, Me28); 2.58 (1H, m, H23 β); 4.23 (1H, sa, H6); 4.46 (1H, dt, *J*= 3.3, 12.8, H22); 4.55 (1H, d, *J*= 4.6 Hz, H4); 5.15 (2H, sa, H27); 6.01 (1H, d, *J*= 10.2 Hz, H2); 6.50 (1H, dd, *J*= 4.6, 10.2 Hz, H3); OAni [3.87 (3H, s); 6.92 (2H, d, *J*= 8.2 Hz); 8.00 (2H, d, *J*= 8.2 Hz)].

RMN ^{13}C (CDCl₃, 100 MHz) δ : 12.2 (c, C18); 13.3 (c, C21); 18.9 (c, C19); 20.7 (c, C28); 22.0 (t, C11); 24.1 (t, C15); 27.2 (t, C16); 29.3 (d, C8); 30.2 (t, C23); 30.9 (t, C7); 38.9 (d, C20); 39.7 (t, C12); 42.6 (d, C9); 43.0 (s, C13); 51.3 (s, C10); 52.1 (d, C17); 55.8 (d, C14); 58.2 (t, C27); 61.3 (d, C6); 62.7 (s, C5); 71.3 (d, C4); 78.3 (d, C22); 122.1 (s, C25); 130.7 (d, C2); 136.3 (d, C3); 157.0 (s, C24); 165.4 (s, C26); 201.0 (s, C1); OAni [55.4 (c); 113.5 (2 x d); 122.4 (s); 131.8 (2 x d); 163.4 (s); 166.2 (s)].

ESIMS *m/z* (%): 609 [M-(2 x H₂O)+Na]⁺ (34).

ESI/MS-AR *m/z*: Observado 609.2834 (calculado para C₃₆H₄₂O₇Na [M-(2 x H₂O)+Na]⁺: 609.2828).

• Esterificación de 1 con cloruro de nicotilo



Se llevó a cabo la esterificación de 14.0 mg de **1** (0.030 mmoles, 1 eq) con 5.34 mg de cloruro de nicotilo (NIC) (0.038 mmoles, 1.3 eq), a temperatura ambiente y durante 48 horas. Siguiendo la metodología descrita para la obtención de **9**. Transcurrido este tiempo, se concentró a vacío y el crudo de reacción fue purificado por cromatografía en placa de gel de sílice de capa fina (CH_2Cl_2 /acetona, 9:1), obteniéndose 14 mg de **22** (R= 73%) como un sólido amorfo.

27-O-Nicotiloilwithaferina A (22)

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$: + 49.1 (c 0.6, CHCl_3)

IR γ_{max} (película): 3376, 2929, 1700, 1574, 1514, 1455, 1395, 1233, 1120, 749 cm^{-1} .

UV (EtOH) λ_{max} (log ϵ): 218 (4.4), 252 (3.9).

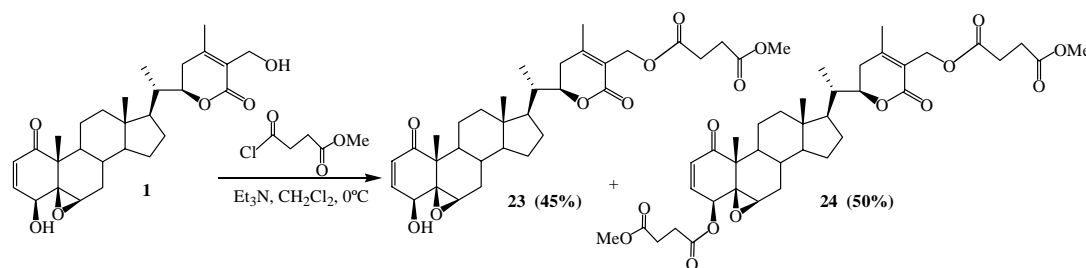
RMN ^1H (CDCl₃, 400 MHz) δ : 0.70 (3H, s, Me18); 0.88 (1H, m, H9); 0.94 (1H, m, H14); 1.01 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, Me21); 1.08 (2H, m, H12, H17); 1.16 (1H, m, H15); 1.39 (1H, m, H16); 1.39 (3H, s, Me19); 1.46 (1H, m, H11); 1.49 (1H, m, H8); 1.65 (1H, m, H15); 1.67 (1H, m, H16); 1.68 (1H, m, H11); 1.70 (1H, m, H7 α); 1.94 (1H, m, H12); 2.02 (1H, m, H20); 2.14 (3H, s, Me28); 2.17 (1H, m, H7 β); 2.21 (1H, m, H23 α); 2.57 (1H, m, H23 β); 3.22 (1H, sa, H6); 4.43 (1H, dt, $J = 3.3, 13.1$ Hz, H22); 4.59 (1H, d, $J = 6.0$ Hz, H4); 5.15, 5.20 (2H, d_{AB}, $J = 12.5$ Hz, H27); 6.24 (1H, d, $J = 9.8$ Hz, H2); 7.09 (1H, dd, $J = 6.0, 9.8$ Hz, H3); ONic [7.38 (1H, dd, $J = 4.8, 7.9$ Hz); 8.29 (1H, dt, $J = 1.7, 7.9$ Hz); 8.77 (1H, dd, $J = 1.7, 4.8$ Hz); 9.20 (1H, d, $J = 1.7$ Hz)].

RMN ^{13}C (CDCl₃, 100 MHz) δ : 11.6 (c, C18); 13.4 (c, C21); 15.6 (c, C19); 20.8 (c, C28); 21.3 (t, C11); 24.3 (t, C15); 27.3 (t, C16); 29.6 (d, C8); 30.2 (t, C23); 31.2 (t, C7); 38.8 (d, C20); 39.2 (t, C12); 42.6 (s, C13); 44.1 (d, C9); 48.0 (s, C10); 51.9 (d, C17); 56.1 (d, C14); 58.9 (t, C27); 60.3 (d, C6); 61.2 (s, C5); 72.7 (d, C4); 78.3 (d, C22); 121.7 (s, C25); 133.5 (d, C2); 141.3 (d, C3); 157.6 (s, C24); 165.2 (s, C26); 201.5 (s, C1); ONic [123.3 (d); 126.0 (s); 137.3 (d); 151.0 (d); 153.5 (d); 165.1 (s)].

ESIMS m/z (%): 600 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (100).

ESI/MS-AR m/z : Observado 600.2939 (calculado para $\text{C}_{34}\text{H}_{43}\text{NO}_7\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 600.2937).

• Esterificación de **1** con cloruro de Metil-4-cloro-4-oxo-butirato



Tratamiento de 50.0 mg de **1** (0.11 mmoles, 1 eq) con 20 μl de metil-4-cloro-4-oxo-butirato (0.16 mmoles, 1.5 eq), durante 30 min y siguiendo la metodología descrita para la obtención de **4**, rindió 28 mg de **23** (R= 45%) y 40 mg de **24** (R= 50%) como sólidos amorfos.

27-O-(4'-O-Metilsuccinatoil)withaferina A (23)

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$: + 45.5 (c 0.29, CHCl_3)

IR γ_{max} (película): 3471, 2923, 2854, 1735, 1443, 1357, 1265, 1158, 1034, 968, 749, 630 cm^{-1} .

UV (EtOH) λ_{max} (log ϵ): 218 (4.2); 285 (2.8) nm.

RMN ^1H (CDCl₃, 400 MHz) δ : 0.69 (3H, s, Me18); 0.96 (1H, m; H14); 0.99 (3H, d, J = 6.6 Hz, Me21); 1.04 (1H, m; H9); 1.10 (1H, m; H17); 1.13 (1H, m; H12); 1.16 (1H, m; H15); 1.28 (1H, m; H7 α); 1.39 (1H, m; H16); 1.40 (3H, s, Me19); 1.48 (1H, m; H11); 1.54 (1H, m; H8); 1.65 (1H, m; H15); 1.66 (1H, m; H16); 1.85 (1H, m; H11); 1.96 (1H, m; H12); 2.03 (1H, m, H20); 2.04 (1H, m; H23 α); 2.06 (3H, s, Me28); 2.16 (1H, m; H7 β); 2.51 (1H, m; H23 β); 3.22 (1H, sa; H6); 3.75 (1H, d, J = 5.8 Hz; H4); 4.40 (1H, dt, J = 3.4, 13.1 Hz; H22); 4.88, 4.93 (2H, d_{AB}, J = 12.2 Hz; H27); 6.19 (1H, d, J = 10.0 Hz; H2); 6.93 (1H, dd, J = 5.8, 10.0 Hz; H3); OMeSuc [2.62 (4H, s); 3.67 (3H, s)].

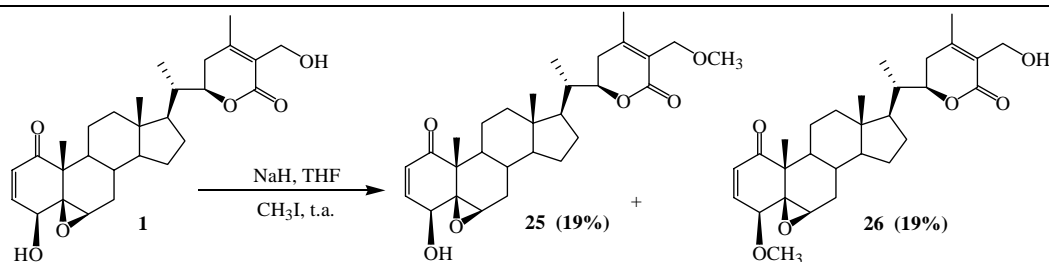
RMN ^{13}C (CDCl₃, 100 MHz) δ : 11.6 (c, C18); 13.3 (c, C21); 17.4 (c, C19); 20.6 (c, C28); 22.1 (t, C11); 24.2 (t, C15); 27.3 (t, C16); 29.8 (d, C8); 30.1 (t, C23); 31.2 (t, C7); 38.8 (d, C20); 39.3 (t, C12); 42.6 (s, C13); 44.1 (d, C9); 47.7 (s, C10); 52.0 (d, C17); 56.1 (d, C14); 58.2 (t, C27); 62.5 (d, C6); 63.8 (s, C5); 69.9 (d, C4); 78.2 (d, C22); 121.8 (s, C25); 132.3 (d, C2); 141.9 (d, C3); 157.1 (d, C24); 165.2 (s, C26); 202.3 (s, C1); OMeSuc [28.9 (t); 29.0 (t); 51.8 (c); 172.1 (s); 172.7 (d)].

ESIMS m/z (%): 607 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (100).

ESI/MS-AR m/z : Observado 607.2886 (calculado para $\text{C}_{33}\text{H}_{44}\text{O}_9\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 607.2883).

4,27-Di-O-(4'-O-metilsuccinatoil)withaferina A (24)	
$[\alpha]_{D}^{25}$:	+ 103.0 (<i>c</i> 0.7, CHCl ₃).
IR γ_{\max} (película):	2925, 2854, 1737, 1684, 1437, 1368, 1157, 994, 772 cm ⁻¹ .
UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ):	218 (4.1); 283 (2.7) nm.
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ:	0.71 (3H, s, Me18); 0.87 (1H, m, H9); 0.92 (1H, m, H14); 1.01 (3H, d, <i>J</i> = 6.6 Hz, Me21); 1.06 (1H, m, H12); 1.07 (1H, m, H17); 1.15 (1H, m, H15); 1.27 (1H, m, H7 α); 1.38 (1H, m, H16); 1.40 (3H, s, Me19); 1.48 (1H, m, H8); 1.49 (1H, m, H11); 1.61 (1H, m, H15); 1.67 (1H, m, H16); 1.72 (1H, m, H11); 1.95 (1H, m, H12); 2.00 (1H, m, H23 α); 2.01 (1H, m, H20); 2.08 (3H, s, Me28); 2.18 (1H, m, H7 β); 2.53 (1H, m, H23 β); 3.23 (1H, sa, H6); 4.42 (1H, dt, <i>J</i> = 3.1, 13.1 Hz, H22); 4.72 (1H, d, <i>J</i> = 6.0 Hz, H4); 4.91, 4.95 (2H, d _{AB} , <i>J</i> = 12.0 Hz, H27); 6.26 (1H, d, <i>J</i> = 9.8 Hz, H2); 7.03 (1H, dd, <i>J</i> = 6.0, 9.8 Hz, H3); 2 x OMSuc [2.64 (6H, m); 2.77 (2H, t, <i>J</i> = 6.0 Hz); 3.67 (3H, s) 3.69 (3H, s); 3.70 (3H, s)].
RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ:	11.3 (c, C18); 13.1 (c, C21); 15.5 (c, C19); 20.4 (c, C28); 21.1 (t, C11); 24.0 (t, C15); 27.1 (t, C16); 29.3 (d, C8); 29.9 (t, C23); 30.9 (t, C7); 38.5 (d, C20); 38.9 (t, C12); 42.3 (s, C13); 43.9 (d, C9); 47.8 (s, C10); 51.7 (d, C17); 55.8 (d, C14); 58.0 (t, C27); 60.1 (d, C6); 60.7 (s, C5); 72.2 (d, C4); 77.9 (d, C22); 121.5 (s, C25); 133.7 (d, C2); 139.3 (d, C3); 156.9 (s, C24); 165.0 (s, C26); 200.8 (s, C1); OMSuc-27 [28.6 (t); 28.8 (t); 51.6 (c); 171.9 (s); 172.5 (s)]; OMSuc-4 [27.4 (t); 36.8 (t); 51.7 (c); 171.1 (s); 172.1 (s)].
ESIMS <i>m/z</i> (%):	721 [M+Na] ⁺ (100).
ESI/MS-AR <i>m/z</i>:	Observado 721.3206 (calculado para C ₃₈ H ₅₀ O ₁₂ Na [M+Na] ⁺ : 721.3200).

• Metilación de la withaferina A (1)



A una suspensión de 27 mg de NaH (1.1 mmol, 10 eq) en 1 ml de THF a 0 °C y bajo atmósfera de argón, se le adicionó 50 mg de withaferina A (0.11 mmol, 1 eq) disueltos en 2 ml de THF a 0 °C vía cánula. Se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 45 min. Posteriormente, se añadieron 70 µl de yoduro de metilo gota a gota y se llevó a reflujo (70 °C) durante 3 h. Transcurrido éste tiempo, se colocó el balón de reacción en un baño de hielo y se añadió 3 ml de H₂O. Se neutralizó con una disolución de HCl al 5% y extrajo 3 veces con CH₂Cl₂. La fase orgánica se secó sobre MgSO₄ anhidro, se filtró y se concentró a vacío. El residuo fue purificado por CPP (CH₂Cl₂/acetona, 9:1), obteniéndose 10.1 mg de **25** (R= 19%) y 10.3 mg de **26** (R= 19%) como sólidos amorfos.

27-O-Metilwithaferina A (25)

[α]²⁵_D: + 64.8 (c 0.23, CHCl₃)

IR γ_{max} (película): 3401, 2924, 2869, 1706, 1456, 1399, 1377, 1267, 1088, 1037, 920, 770 cm⁻¹.

UV (EtOH) λ_{max} (log ε): 217 (3.8); 275 (2.4) nm.

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ: 0.72 (3H, s, Me18); 0.94 (1H, m, H14); 1.01 (3H, d, J= 6.7 Hz, Me21); 1.04 (1H, m, H9); 1.13 (1H, m, H12); 1.14 (1H, m, H17); 1.26 (1H, m, H7α); 1.30 (1H, m, H8); 1.38 (1H, m, H16); 1.43 (3H, s, Me19); 1.55 (1H, m, H11); 1.64 (2H, m, H15); 1.66 (1H, m, H16); 1.85 (1H, m, H11); 1.98 (1H, m, H12); 2.04 (1H, m, H20); 2.05 (1H, m, H23α); 2.09 (3H, s, Me28); 2.17 (1H, m, H7β); 2.53 (1H, m, H23β); 3.26 (1H, sa, H6); 3.40 (3H, s, OMe); 3.78 (1H, d, J= 5.8 Hz, H6); 4.18, 4.31 (2H, d_{AB}, J= 10.6 Hz, H27); 4.43 (1H, dt, J= 3.2, 13.2 Hz, H22); 6.23 (1H, d, J= 10.0 Hz, H2); 6.95 (1H, dd, J= 5.8, 10.0 Hz, H3).

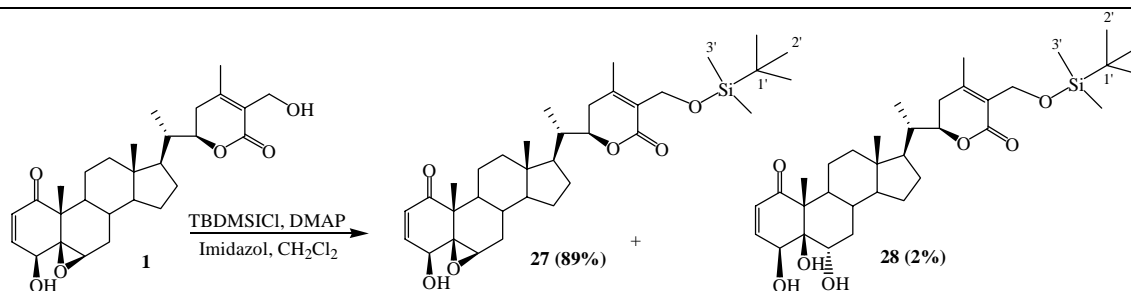
RMN ¹³C (CDCl₃, 100MHz) δ: 11.6 (c, C18); 13.4 (c, C21); 17.5 (c, C19); 20.6 (c, C28); 22.2 (t, C11); 24.3 (t, C15); 27.3 (t, C16); 29.8 (t, C23); 30.0 (d, C8); 31.2 (t, C7); 38.8 (d, C20); 39.4 (t, C12); 42.6 (s, C13); 44.1 (d, C9); 47.7 (s, C10); 52.0 (d, C17); 56.1 (d, C14); 58.6 (c, OMe); 62.7 (d, C6); 63.9 (s, C5); 65.7 (t, C27); 69.9 (d, C4); 78.3 (d, C22); 123.6 (s, C25); 132.3 (d, C2); 141.9 (d, C3); 156.4 (s, C24); 166.0 (s, C26); 202.4 (s, C1).

ESIMS m/z (%): 507 [M+Na]⁺ (100).

ESI/MS-AR m/z: Observado 507.2721 (calculado para C₂₉H₄₀O₆Na [M+Na]⁺: 507.2723).

4-O-Metilwithaferina A (26)	
[α]²⁵_D:	+ 48.9 (c 0.35, CHCl ₃)
IR γ_{\max} (película):	3498, 2924, 2868, 1687, 1456, 1379, 1264, 1129, 1070, 959, 771 cm ⁻¹ .
UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ)	219 (4.2); 281 (2.7) nm.
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ:	0.72 (3H, s, Me18); 0.78 (1H, m, H9); 0.92 (1H, m, H14); 1.01 (3H, d, J = 6.6 Hz, Me21); 1.04 (1H, m, H12); 1.08 (1H, m, H17); 1.17 (1H, m, H15); 1.27 (1H, m, H7 α); 1.40 (1H, m, H16); 1.41 (3H, s, Me19); 1.47 (1H, m, H11); 1.50 (1H, m, H8); 1.65 (1H, m, H15); 1.66 (1H, m, H11); 1.67 (1H, m, H16); 1.95 (1H, m, H12); 2.00 (1H, m, H23 α); 2.03 (1H, m, H20); 2.05 (3H, s, Me28); 2.19 (1H, m, H7 β); 2.51 (1H, m, H23 β); 2.89 (1H, t, J = 6.8 Hz, OH-27); 3.07 (1H, sa, H6); 3.28 (1H, d, J = 6.2 Hz, H4); 3.47 (3H, s, OMe); 4.38, 4.40 (2H, dd _{AB} , J = 6.8, 10.5 Hz, H27); 4.44 (1H, dt, J = 3.5, 13.1 Hz, H22); 6.26 (1H, d, J = 9.8 Hz, H2); 7.03 (1H, dd, J = 6.2, 9.8 Hz, H3).
RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ:	11.5 (c, C18); 13.3 (c, C21); 15.4 (c, C19); 20.0 (c, C28); 21.0 (t, C11); 24.3 (t, C15); 27.3 (t, C16); 29.7 (d, C8); 29.8 (t, C23); 31.2 (t, C7); 38.8 (d, C20); 39.2 (t, C12); 42.6 (s, C13); 44.3 (d, C9); 48.2 (s, C10); 51.9 (d, C17); 56.2 (d, C14); 57.5 (t, C27); 57.9 (d, C6); 58.1 (c, OMe); 63.1 (s, C5); 78.7 (d, C22); 79.0 (d, C4); 125.7 (s, C25); 133.4 (d, C2); 141.4 (d, C3); 152.6 (s, C24); 166.9 (s, C26); 201.4 (s, C1).
ESIMS m/z (%):	507 [M+Na] ⁺ (100).
ESI/MS-AR m/z:	Observado 507.2729 (calculado para C ₂₉ H ₄₀ O ₆ Na [M+Na] ⁺ : 507.2723).

• Formación de derivados *tert*-butildimetilsilil éter de 1



A una disolución de 54.0 mg de **1** (0.12 mmoles, 1 eq) en 10 ml de CH₂Cl₂ se le adicionó 9 mg de imidazol (0.12 mmoles, 1 eq), 14 mg de DIMAP (0.12 mmoles, 1 eq) y 28 mg de cloruro de *tert*-butil-di-metilsilicio (TBDMSiCl) (0.18 mmoles, 1.5 eq). Tras agitar durante 2.5 horas a temperatura ambiente y bajo atmosfera de N₂, se paró la reacción por adición de 5 ml de H₂O y se extrajo 3 veces con CH₂Cl₂. La fase orgánica se secó sobre MgSO₄ anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a vacío. El residuo fue purificado por cromatografía en columna de gel de sílice, usando como fase móvil (CH₂Cl₂/acetona, 9:1), obteniéndose 62 mg de **27** (R= 89%) y 2.0 mg de **28** (R= 2%) como sólidos amorfos.

27-O-(*tert*-Butildimetilsilil)withaferina A (27)

[α]_D²⁵: + 65.2 (c 0.42, CHCl₃)

IR γ_{\max} (película): 3446, 2933, 1735, 1457, 1380, 1234, 1027, 966, 754 cm⁻¹.

UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ): 215 (4.5) nm.

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ : 0.69 (3H, s, Me18); 0.89 (1H, m, H9); 0.92 (1H, m, H14); 0.98 (3H, d, J= 6.6 Hz, Me21); 1.06 (1H, m, H12); 1.08 (1H, m, H17); 1.16 (1H, m, H15); 1.25 (1H, m, H7 α); 1.40 (3H, s, Me19); 1.41 (1H, m, H16); 1.50 (2H, m, H8, H11); 1.64 (1H, m, H15); 1.68 (1H, m, H16); 1.74 (1H, m, H11); 1.97 (2H, m, H12, H23 α); 2.01 (1H, m, H20); 2.05 (3H, s, Me28); 2.16 (1H, m, H7 β); 2.46 (1H, m, H23 β); 2.67 (1H, sa, OH-4); 3.22 (1H, sa, H6); 3.74 (1H, d, J= 5.6 Hz, H4); 4.38 (1H, dt, J= 3.1, 13.0 Hz, H22); 4.38, 4.49 (2H, d_{AB}, J= 11.6 Hz, H27); 6.19 (1H, d, J= 10.0 Hz, H2); 6.93 (1H, dd, J= 5.6, 10.0 Hz, H3); OTBDMSi [0.08 (6H, s); 0.88 (9H, s)].

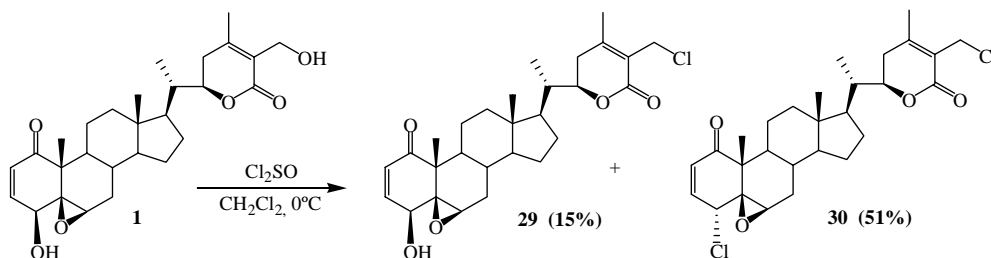
RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ : 11.4 (c, C18); 13.1 (c, C21); 17.2 (c, C19); 20.3 (c, C28); 21.9 (t, C11); 24.0 (t, C15); 27.0 (t, C16); 29.5 (d, C8); 29.8 (t, C23); 30.9 (t, C7); 38.5 (d, C20); 39.1 (t, C12); 42.3 (s, C13); 43.9 (d, C9); 47.4 (s, C10); 51.8 (d, C17); 55.8 (d, C14); 56.9 (t, C27); 62.3 (d, C6); 63.6 (s, C5); 69.7 (d, C4); 77.9 (d, C22); 125.7 (s, C25); 132.1 (d, C2); 141.7 (d, C3); 154.3 (s, C24); 165.6 (s, C26); 202.1 (s, C1); OTBDMSi [-5.5 (2 x c); 18.1 (s); 25.7 (3 x c)].

EM (IE) m/z (%): 584 [M⁺] (1), 527(100), 509(25), 493 (5), 359 (1), 293 (2), 281 (6), 227 (23), 197 (16), 169 (7), 131 (10), 95 (12), 75 (47).

EMAR m/z : Observado 584.3511 (calculado para C₃₄H₅₂O₆Si [M⁺]: 584.3533).

27-O-(tert-Butildimetilsilil)-5β,6α-dihidroxiwithaferina A (28)	
[α]²⁵_D:	+ 42.1 (c 0.43, CHCl ₃)
IR γ_{\max} (película):	2927, 1734, 1698, 1689, 1458, 1397, 1258, 1065, 837, 668 cm ⁻¹ .
UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ):	212 (4.3) nm.
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ:	0.76 (3H, s, Me18); 0.90 (1H, m, H11); 1.01 (3H, d, J= 6.4 Hz, Me21); 1.10 (1H, m, H12); 1.12 (1H, m, H17); 1.23 (1H, m, H15); 1.28 (1H, m, H14); 1.32 (1H, m, H9); 1.33 (1H, m, H11); 1.41 (1H, m, H16); 1.62 (1H, m, H8); 1.65 (3H, s, Me19); 1.68 (1H, m, H15); 1.70 (1H, m, H7 α); 1.72 (1H, m, H16); 1.95 (1H, m, H12); 1.96 (1H, m, H20); 2.08 (3H, s, Me28); 2.17 (1H, m, H7 β); 2.54 (1H, m, H23 β); 4.14 (1H, s, H6); 4.37 (1H, m, H22); 4.40, 4.52 (2H, d _{AB} , J= 11.7 Hz, H27); 4.73 (1H, d, J= 4.1 Hz, H4); 5.97 (1H, d, J= 10.0 Hz, H2); 6.56 (1H, dd, J= 4.1, 10.0 Hz, H3); OTBDMSi [0.10 (6H, s); 0.90 (9H, s)].
RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ:	12.0 (c, C18); 13.1 (c, C21); 17.8 (c, C19); 20.3 (c, C28); 22.7 (t, C11); 23.9 (t, C15); 27.0 (t, C16); 29.5 (d, C8); 29.8 (t, C23); 29.9 (t, C7); 38.6 (d, C20); 39.6 (t, C12); 42.9 (s, C13); 43.3 (d, C9); 51.7 (d, C17); 51.9 (s, C10); 55.2 (d, C14); 56.9 (t, C27); 74.9 (d, C6); 75.2 (d, C4); 75.5 (s, C5); 78.0 (d, C22); 125.7 (s, C25); 128.5 (d, C2); 138.4 (d, C3); 154.5 (s, C24); 165.5 (s, C26); 200.9 (s, C1); OTBDMSi [-5.5 (2 x c); 18.1 (s); 25.7 (3 x c)].
EM (IE) m/z (%):	527 [M-C ₄ H ₉ -H ₂ O] ⁺ (100), 493 (3), 359 (3), 299 (3), 279 (6), 227 (52), 199 (11), 171 (16), 149 (29), 95 (43), 75 (76).
EMAR m/z:	Observado 527.2827 (calculado para C ₃₀ H ₄₃ O ₆ Si [M-C ₄ H ₉ -H ₂ O] ⁺ : 527.2829).

• Cloración de la withaferina A



A una disolución de 20 mg de **1** (0.04 mmol, 1 eq) en 3 ml de CH_2Cl_2 a 0°C y bajo atmósfera de argón, se le añadió 6 μl de cloruro de tionilo (0.06 mmol, 1.5 eq) y se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. Transcurrido éste tiempo, el crudo de reacción se virtió sobre una mezcla agua/hielo y se extrajo 3 veces con 10 ml de CHCl_3 . La fase orgánica se lavó con una disolución de HCl al 5% y con una disolución saturada de NaCl y se secó sobre MgSO_4 anhidro. Posteriormente, se filtró y se eliminó el disolvente a vacío. El residuo fue purificado por CC de gel de sílice (CH_2Cl_2 :acetona, 9.5:0.5), obteniéndose 3 mg de **29** (R= 15%) y 10 mg de **30** (R= 51%) como sólidos amorfos.

27-Clorowithaferina A (**29**)

$[\alpha]_D^{25}$: + 73.0 (*c* 1.02, CHCl_3)

IR γ_{max} (película): 3443, 2924, 2853, 1708, 1455, 1395, 1267, 1191, 1034, 965, 754 cm^{-1} .

UV (EtOH) λ_{max} (log ϵ): 217 (4.0) nm.

RMN ^1H (CDCl₃, 400 MHz) δ : 0.71 (3H, s, Me18); 0.94 (1H, m, H14); 1.01 (3H, d, *J*= 6.7 Hz, Me21); 1.02 (1H, m, H9); 1.08 (1H, m, H17); 1.12 (1H, m, H12); 1.16 (1H, m, H15); 1.26 (1H, m, H7 α); 1.38 (1H, m, H16); 1.42 (3H, s, Me19); 1.47 (1H, m, H11); 1.52 (1H, m, H8); 1.65 (1H, m, H15); 1.68 (1H, m, H16); 1.85 (1H, m, H11); 1.96 (1H, m, H12); 2.01 (1H, m, H20); 2.04 (1H, m, H23 α); 2.11 (3H, s, Me28); 2.15 (1H, m, H7 β); 2.54 (1H, m, H23 β); 3.24 (1H, sa, H6); 3.77 (1H, dd, *J*= 2.2, 5.9 Hz, H4); 4.34, 4.44 (2H, d_{AM}, *J*= 11.3 Hz, H27); 4.41 (1H, dt, *J*= 3.5, 13.2 Hz, H22); 6.21 (1H, d, *J*= 10.0 Hz, H2); 6.94 (1H, dd, *J*= 5.9, 10.0 Hz, H3).

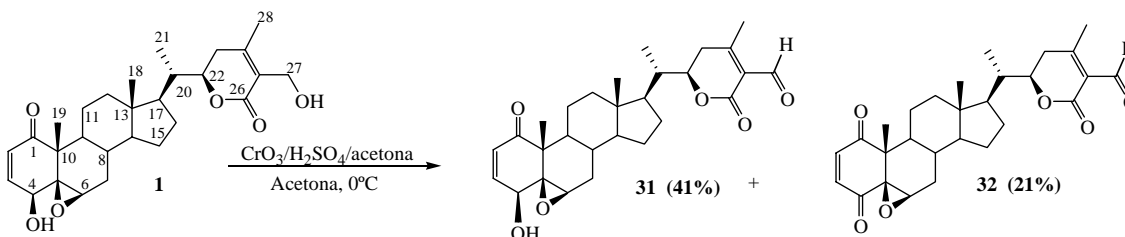
RMN ^{13}C (CDCl₃, 100 MHz) δ : 11.6 (c, C18); 13.3 (c, C21); 17.5 (c, C19); 20.5 (c, C28); 22.2 (t, C11); 24.3 (t, C15); 27.3 (t, C16); 29.8 (d, C8); 30.1 (t, C23); 31.2 (t, C7); 37.1 (t, C27); 38.8 (d, C20); 39.3 (t, C12); 42.6 (s, C13); 44.1 (d, C9); 47.7 (s, C10); 52.0 (d, C17); 56.1 (d, C14); 62.6 (d, C6); 63.8 (s, C5); 69.9 (d, C4); 78.3 (d, C22); 124.0 (s, C25); 132.3 (d, C2); 141.9 (d, C3); 156.2 (s, C24); 164.7 (s, C26); 202.3 (s, C1).

ESIMS *m/z* (%): 511 [M+Na]⁺ (100).

ESI/MS-AR *m/z*: Observado 511.2224 (calculado para $\text{C}_{28}\text{H}_{37}\text{O}_5\text{ClNa}$ [M+Na]⁺: 511.2227).

4,27-Diclorowithaferina A (30)	
$[\alpha]_{25}^D$:	+ 73.5 (c 0.30, CHCl ₃)
IR γ_{\max} (película):	2923, 2853, 1710, 1459, 1377, 1290, 1132, 793 cm ⁻¹ .
UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ):	225 (4.0) nm.
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ:	0.71 (3H, s, Me18); 0.89 (1H, m, H9); 0.92 (1H, m, H14); 1.00 (3H, d, J= 6.7 Hz, Me21); 1.05 (1H, m, H12); 1.07 (1H, m, H17); 1.15 (1H, m, H15); 1.30 (1H, m, H7 α); 1.38 (1H, m, H16); 1.48 (1H, m, H11); 1.49 (3H, s, Me19); 1.51 (1H, m, H8); 1.64 (1H, m, H15); 1.66 (1H, m, H11); 1.68 (1H, m, H16); 1.96 (1H, m, H12); 2.02 (1H, m, H20); 2.03 (1H, m, H23 α); 2.11 (3H, s, Me28); 2.20 (1H, m, H7 β); 2.53 (1H, m, H23 β); 3.28 (1H, sa, H6); 4.05 (1H, d, J= 6.3 Hz, H4); 4.34, 4.44 (2H, d _{AM} , J= 11.0 Hz, H27); 4.40 (1H, dt, J= 3.5, 13.3 Hz, H22); 6.24 (1H, d, J= 10.0 Hz, H2); 6.98 (1H, dd, J= 6.3, 10.0 Hz, H3).
RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ:	11.5 (c, C18); 13.3 (c, C21); 15.9 (c, C19); 20.5 (c, C28); 21.0 (t, C11); 24.2 (t, C15); 27.3 (t, C16); 29.5 (d, C8); 30.1 (t, C23); 31.6 (t, C7); 37.1 (t, C27); 38.8 (d, C20); 39.1 (t, C12); 42.6 (s, C13); 44.2 (d, C9); 49.0 (s, C10); 51.9 (d, C17); 56.2 (d, C14); 58.1 (d, C4); 61.7 (s, C5); 63.9 (d, C6); 78.2 (d, C22); 124.1 (s, C25); 132.5 (d, C2); 140.7 (d, C3); 156.1 (s, C24); 164.7 (s, C26); 200.3 (s, C1).
ESIMS m/z (%):	529 [M+Na] ⁺ (100).
ESI/MS-AR m/z:	Observado 529.1874 (calculado para C ₂₈ H ₃₆ O ₄ Cl ₂ Na [M+Na] ⁺ : 529.1888).

• Oxidación de **1** con reactivo de Jones



A una disolución de 50.0 mg de **1** (0.11 mmoles) en 2 ml de acetona, a 0°C y bajo atmósfera de N_2 , se le adicionó 5 gotas de reactivo de Jones ($\text{CrO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4/\text{acetona}$). La mezcla se dejó agitar durante 2.5 horas. Se paró la reacción con 2-propanol, se neutralizó con una disolución de NaHCO_3 al 10% y se extrajo 3 veces con acetato de etilo. La fase orgánica se secó sobre MgSO_4 anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a vacío. El residuo fue purificado por CPP ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{acetona}$, 9.5:0.5), obteniéndose 21 mg de **31** (R= 41%) y 11 mg de **32** (R= 21%) como sólidos amorfos.

25-Demetil-5 β ,6 β -epoxi-25-formil-4 β -hidroxi-1-oxo-witha-2,4-dienolida (31**)**

$[\alpha]_D^{25}$: + 33.9 (*c* 0.90, CHCl_3).

IR γ_{max} (película): 3432, 2946, 2861, 1456, 1392, 1311, 1235, 1046, 918, 822, 755 cm^{-1} .

UV (EtOH) λ_{max} (log ϵ): 215 (4.4) nm.

RMN ^1H (CDCl₃, 400 MHz) δ : 0.71 (3H, s, Me18); 0.97 (1H, m, H14); 1.02 (3H, d, *J* = 6.5 Hz, Me21); 1.03 (1H, m, H9); 1.12 (1H, m, H17); 1.15 (1H, m, H12); 1.16 (1H, m, H15); 1.31 (1H, m, H7 α); 1.38 (1H, m, H16); 1.41 (3H, s, Me19); 1.48 (1H, m, H11); 1.52 (1H, m, H8); 1.65 (1H, m, H15); 1.67 (1H, m, H16); 1.68 (1H, m, H11); 1.95 (1H, m, H12); 2.04 (1H, m, H20); 2.11 (1H, m, H7 β); 2.18 (1H, m, H23 α); 2.43 (3H, s, Me28); 2.66 (1H, m, H23 β); 3.24 (1H, s, H6); 3.76 (1H, d, *J* = 5.7 Hz, H4); 4.42 (1H, dt, *J* = 3.5, 13.1 Hz, H22); 6.20 (1H, d, *J* = 9.9 Hz, H2); 6.94 (1H, dd, *J* = 5.7, 9.9 Hz, H3); 10.20 (1H, s, H27).

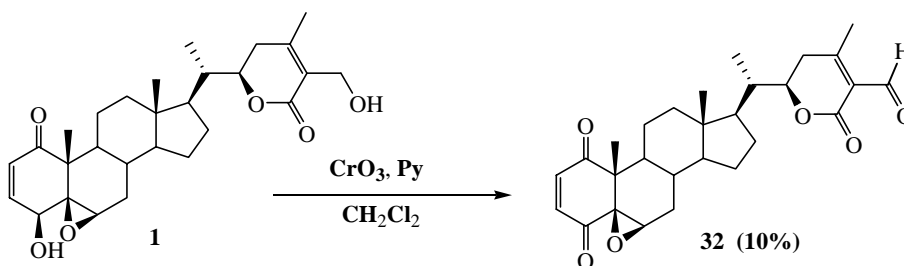
RMN ^{13}C (CDCl₃, 100 MHz) δ : 11.4 (*c*, C18); 13.0 (*c*, C21); 17.2 (*c*, C19); 21.7 (*c*, C28); 22.0 (*t*, C11); 24.1 (*t*, C15); 27.0 (*t*, C16); 29.5 (*d*, C8); 30.9 (*t*, C7); 32.2 (*t*, C23); 38.4 (*d*, C20); 39.1 (*t*, C12); 42.4 (*s*, C13); 43.9 (*d*, C9); 47.4 (*s*, C10); 51.7 (*d*, C17); 55.8 (*d*, C14); 62.3 (*d*, C6); 63.6 (*s*, C5); 69.7 (*d*, C4); 78.0 (*d*, C22); 123.7 (*s*, C25); 132.1 (*d*, C2); 141.8 (*d*, C3); 164.7 (*s*, C24); 168.3 (*s*, C26); 190.7 (*d*, C27); 202.2 (*s*, C1).

EM (IE) *m/z* (%): 468 [M^+] (1), 438 (2), 424 (1), 328 (1), 311 (3), 299 (16), 283 (5), 265 (2), 241 (5), 197 (4), 175 (9), 149 (28), 124 (83), 95 (100).

EMAR *m/z*: Observado 468.2494 (calculado para $\text{C}_{28}\text{H}_{36}\text{O}_6$ [M^+]: 468.2512).

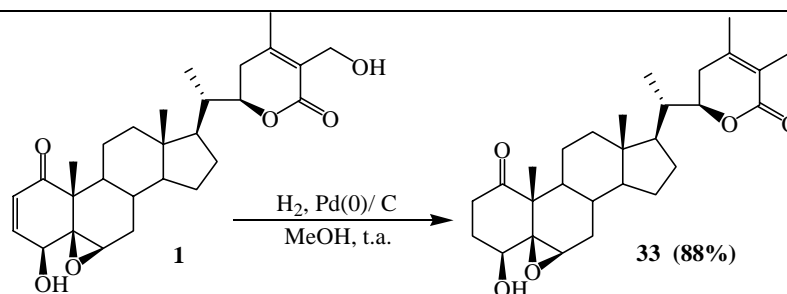
25-Demetil-5β,6β-epoxi-25-formil-1,4-dioxo-witha-2,4-dienolida (32)	
$[\alpha]_D^{25}$:	+ 54.6 (c 0.56, CHCl ₃).
IR γ_{\max} (película):	2922, 2853, 1689, 1611, 1557, 1378, 1268, 1059, 755 cm ⁻¹ .
UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ):	224 (3.7) nm.
RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) δ :	0.76 (3H, s, Me18); 1.03 (1H, m, H14); 1.06 (3H, d, <i>J</i> = 6.6 Hz, Me21); 1.15 (1H, m, H17); 1.19 (1H, m, H15); 1.29 (1H, m, H12); 1.36 (1H, m, H7 α); 1.40 (1H, m, H16); 1.41 (3H, s, Me19); 1.47 (1H, m, H11); 1.48 (1H, m, H9); 1.64 (1H, m, H8); 1.68 (1H, m, H16); 1.69 (1H, m, H15); 2.00 (1H, m, H12); 2.03 (1H, m, H11); 2.08 (1H, m, H20); 2.17 (1H, m, H7 β); 2.21 (1H, m, H23 α); 2.46 (3H, s, Me28); 2.69 (1H, m, H23 β); 3.46 (1H, s, H6); 4.45 (1H, dt, <i>J</i> = 3.2, 13.1 Hz, H22); 6.89 (2H, sa, H2, H3); 10.2 (1H, s, H27).
RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 100 MHz) δ :	11.6 (c, C18); 13.0 (c, C21); 19.0 (c, C19); 21.7 (c, C28); 23.2 (t, C11); 24.1 (t, C15); 27.0 (t, C16); 29.4 (d, C8); 30.3 (t, C7); 32.3 (t, C23); 38.4 (d, C20); 39.2 (t, C12); 42.5 (s, C13); 43.5 (d, C9); 49.6 (s, C10); 51.7 (d, C17); 55.4 (d, C14); 63.3 (d, C6); 63.7 (s, C5); 77.9 (d, C22); 123.7 (s, C25); 139.1 (d, C3); 141.4 (d, C2); 164.7 (s, C24); 168.1 (s, C26); 190.5 (d, C27); 193.6 (s, C4); 202.1 (s, C1).
ESIMS <i>m/z</i> (%):	489 [M+Na] ⁺ (100).
ESI/MS-AR <i>m/z</i> :	Observado 489.2250 (calculado para C ₂₈ H ₃₄ O ₆ Na [M+Na] ⁺ : 489.2253).

- Oxidación de 1 con reactivo de Collins



A una disolución de 20.0 mg de 1 (0.042 mmoles) en 1.5 ml de CH₂Cl₂ bajo atmósfera de N₂, le añadimos 2 ml de una disolución de 250 mg de CrO₃ (2.5 mmoles) en 0.4 ml de piridina y 6 ml de CH₂Cl₂. La mezcla se agitó durante 15 horas, se filtró sobre celita y se eliminó el disolvente a presión reducida. El crudo de reacción fue purificado por CPP de gel de sílice (CH₂Cl₂/Acetona, 9:1), obteniéndose 2 mg de 32 (R= 10%) como un sólido amorfo.

- Hidrogenación con paladio sobre carbono al 10% de 1.



A una disolución de 23.0 mg de **1** (0.05 mmoles, 1 eq) en 2 ml de MeOH se le añadió 10 mg de Pd(0)/C bajo atmósfera de argón (pasamos una corriente de argón durante 10 minutos). Posteriormente, se mantuvo la agitación bajo atmósfera de hidrógeno (1 atm) a temperatura ambiente durante 3 horas. Pasado este tiempo, la mezcla se filtró sobre celita y se eliminó el disolvente a presión reducida. El crudo de reacción fue purificado por CC de gel de sílice, usando como fase móvil CH₂Cl₂/acetona (9:1), obteniéndose 20 mg de **33** (R= 88%) como un sólido amorfo.

2,3-Dihidro-27-deoxiwithaferina A (**33**)

[α]_D²⁵: + 5.0 (c 1.73, CHCl₃)

IR γ_{max} (película): 3441, 2943, 2869, 1703, 1453, 1395, 1286, 1129, 1046, 755 cm⁻¹.

UV (EtOH) λ_{max} (log ϵ): 226 (4.0); 283 (2.5) nm.

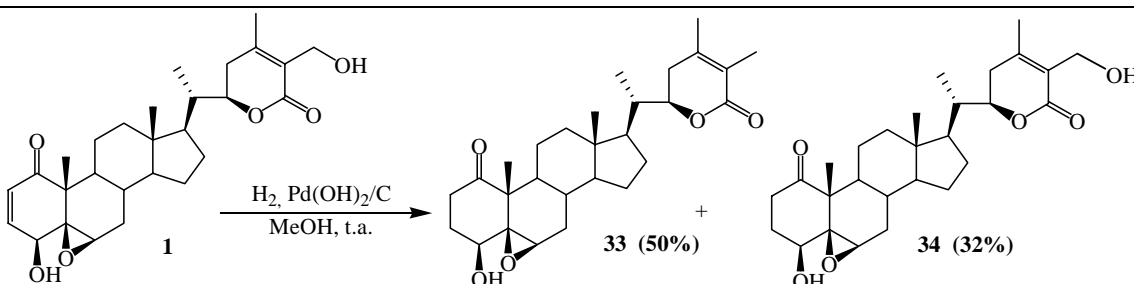
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ : 0.66 (3H, s, Me18); 0.95 (1H, m, H14); 0.98 (3H, d, *J*= 6.7 Hz, Me21); 1.09 (1H, m, H17); 1.10 (1H, m, H12); 1.13 (1H, m, H9); 1.15 (1H, m, H15); 1.29 (1H, m, H7 α); 1.32 (3H, s, Me19); 1.35 (2H, m, H11); 1.38 (1H, m, H16); 1.42 (1H, m, H8); 1.64 (1H, m, H15); 1.69 (1H, m, H16); 1.88 (3H, s, Me27); 1.92 (1H, m, H23 α); 1.93 (1H, m, H12); 1.94 (3H, s, Me28); 1.97 (1H, m, H20); 2.02 (1H, m, H3); 2.12 (1H, m, H3); 2.21 (1H, m, H7 β); 2.43 (1H, m, H23 β); 2.51 (1H, m, H2); 2.65 (1H, m, H2); 3.14 (1H, sa, H6); 3.51 (1H, t, *J*= 3.7 Hz, H4); 4.35 (1H, dt, *J*= 3.5, 13.3 Hz, H22).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ : 11.5 (c, C18); 12.5 (c, C27); 13.4 (c, C21); 15.5 (c, C19); 20.5 (c, C28); 21.4 (t, C11); 24.3 (t, C15); 26.4 (t, C3); 27.3 (t, C16); 29.3 (d, C8); 29.6 (t, C23); 31.4 (t, C7); 31.8 (t, C2); 38.8 (d, C20); 39.1 (t, C12); 42.7 (s, C13); 43.0 (d, C9); 50.5 (s, C10); 52.0 (d, C17); 56.2 (d, C14); 59.0 (d, C6); 66.5 (s, C5); 72.8 (d, C4); 78.3 (d, C22); 122.0 (s, C25); 149.0 (s, C24); 167.0 (s, C26); 211.5 (s, C1).

ESIMS *m/z* (%): 479 [M+Na]⁺ (100).

ESI/MS-AR *m/z*: Observado 479.2774 (calculado para C₂₈H₄₀O₅Na [M+Na]⁺: 479.2773).

- Hidrogenación con hidróxido de paladio sobre carbono al 5% de **1**.



A una disolución de 50.0 mg de **1** (0.1 mmoles, 1 eq) en 3 ml de MeOH se le añadió 25 mg de Pd(OH)₂/C (50% en peso) bajo atmósfera de argón. Se pasó la corriente de argón durante 10 minutos y se mantuvo la agitación bajo atmósfera de hidrógeno (1 atm) durante 1 hora. Pasado éste tiempo, la mezcla se filtró sobre celita y se eliminó el disolvente a presión reducida. El crudo de reacción fue purificado por CC sobre gel de sílice, usando como fase móvil CH₂Cl₂/acetona (9:1), rindiendo 23 mg de **33** (R= 50%) y 15 mg de **34** (R= 32%) como sólidos amorfos.

2,3-Dihidrowithaferina A (**34**)

[α]_D²⁵: + 13.4 (c 1.01, CHCl₃)

IR γ_{\max} (película): 3434, 2925, 2859, 1700, 1455, 1396, 1288, 1188, 1023, 754 cm⁻¹.

UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ): 222 (3.7) nm.

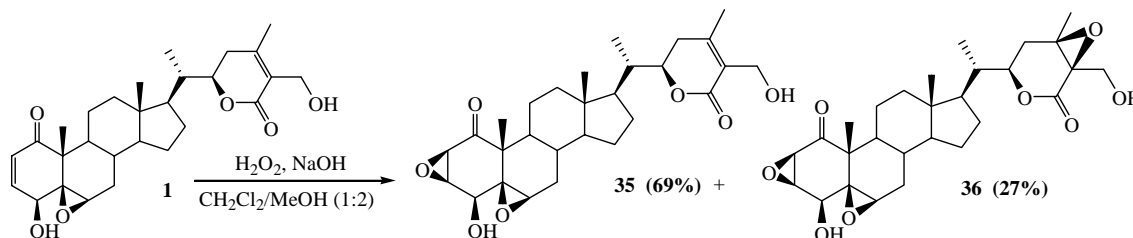
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ : 0.68 (3H, s, Me18); 0.96 (1H, m, H14); 1.00 (3H, d, *J*= 6.7 Hz, Me21); 1.09 (1H, m, H17); 1.12 (1H, m, H12); 1.15 (1H, m, H9); 1.16 (1H, m, H15); 1.29 (1H, m, H7 α); 1.33 (3H, s, Me19); 1.35 (2H, m, H11); 1.38 (1H, m, H16); 1.42 (1H, m, H8); 1.67 (1H, m, H15); 1.68 (1H, m, H16); 1.94 (1H, m, H12); 2.00 (1H, m, H20); 2.01 (1H, m, H3); 2.01 (1H, m, H23 α); 2.04 (3H, s, Me28); 2.13 (1H, m, H3); 2.21 (1H, m, H7 β); 2.50 (1H, m, H23 β); 2.52 (1H, m, H2); 2.68 (1H, m, H2); 3.15 (1H, sa, H6); 3.53 (1H, t, *J*= 3.7 Hz, H4); 4.35, 4.40 (2H, d_{AB}, *J*= 12.5 Hz, H27); 4.43 (1H, dt, *J*= 3.5, 13.3 Hz, H22).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ : 11.5 (c, C18); 13.4 (c, C21); 15.6 (c, C19); 20.0 (c, C28); 21.5 (t, C11); 24.3 (t, C15); 26.5 (t, C3); 27.3 (t, C16); 29.3 (d, C8); 29.8 (t, C23); 31.4 (t, C7); 31.9 (t, C2); 38.8 (d, C20); 39.1 (t, C12); 42.7 (s, C13); 43.0 (d, C9); 50.5 (s, C10); 51.9 (d, C17); 56.2 (d, C14); 57.5 (t, C27); 59.1 (d, C6); 66.5 (s, C5); 72.8 (d, C4); 78.7 (d, C22); 125.7 (s, C25); 152.7 (s, C24); 167.0 (s, C26); 211.5 (s, C1).

ESIMS *m/z* (%): 495 [M+Na]⁺ (100).

ESI/MS-AR *m/z*: Observado 495.2722 (calculado para C₂₈H₄₀O₆Na [M+Na]⁺: 495.2723).

• Epoxidación de **1** con H₂O₂/NaOH



A una disolución de 15.0 mg de **1** (0.03 mmoles) en 3 ml de una mezcla CH₂Cl₂/MeOH (1:2) a 0 °C, se le adicionó 0.1 ml de H₂O₂ y 0.05 ml de NaOH 4N (1.05 mmoles). La reacción se agitó durante 5 minutos, tras los cuales, se paró la reacción por adición de 5 ml de H₂O, se extrajo 3 veces con CH₂Cl₂ y la fase orgánica se secó sobre MgSO₄ anhidro. El residuo se concentró a vacío y se purificó por CPP, usando como fase móvil (CH₂Cl₂/acetona, 9:1), obteniéndose 10 mg de **35** (R= 69%) y 4 mg de **36** (R= 27%) como sólidos amorfos.

Al llevar a cabo la reacción en las mismas condiciones, pero durante 3 horas, se obtuvo como único producto el diepóxido **36**, con un 90% de rendimiento.

2β,3β-Epoxiwithaferina A (35)

[α]_D²⁵: - 12.9 (c 0.58, CHCl₃)

IR γ_{max} (película): 3434, 2945, 2868, 1456, 1391, 1313, 1237, 1047, 920, 821, 756 cm⁻¹.

UV (EtOH) λ_{max} (log ε) 212 (4.1).

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ: 0.65 (3H, s, Me18); 0.96 (1H, m, H14); 0.99 (3H, d, J= 6.6 Hz, Me21); 1.05 (1H, m, H17); 1.10 (1H, m, H12); 1.14 (1H, m, H15); 1.19 (1H, m, H9); 1.22 (3H, s, Me19); 1.22 (1H, m, H11); 1.30 (1H, m, H11); 1.36 (1H, m, H16); 1.40 (1H, m, H7α); 1.66 (1H, m, H15); 1.72 (1H, m, H16); 1.95 (1H, m, H12); 1.96 (1H, m, H20); 2.00 (1H, m, H8); 2.01 (1H, m, H23α); 2.04 (3H, s, Me28); 2.19 (1H, m, H7β); 2.49 (1H, m, H23β); 3.11 (1H, sa, H6); 3.58 (1H, d, J= 4.5 Hz, H2); 3.72 (1H, t, J= 4.5 Hz, H3); 3.92 (1H, sa, H4); 4.33, 4.37 (2H, d_{AB}, J= 13.1 Hz, H27); 4.42 (1H, dt, J= 3.4, 13.3 Hz, H22).

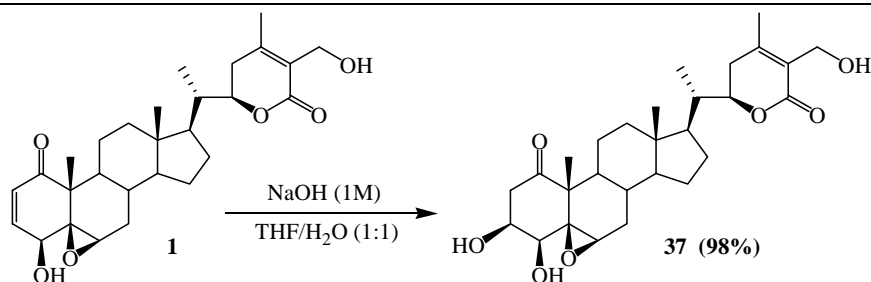
RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ: 11.2 (c, C18); 13.1 (c, C21); 14.4 (c, C19); 19.8 (c, C28); 19.9 (t, C11); 24.0 (t, C15); 27.1 (t, C16); 29.3 (d, C8); 29.6 (t, C23); 30.8 (t, C7); 38.5 (d, C20); 38.6 (t, C12); 40.5 (d, C9); 42.4 (s, C13); 48.4 (s, C10); 51.6 (d, C17); 54.6 (d, C2); 55.1 (d, C3); 55.8 (d, C14); 57.2 (t, C27); 59.4 (d, C6); 63.5 (s, C5); 74.7 (d, C4); 78.5 (d, C22); 125.4 (s, C25); 152.7 (s, C24); 166.9 (s, C26); 206.0 (s, C1).

EM (IE) m/z (%): 486 [M⁺] (1), 468 (1), 424 (4), 345 (3), 315 (10), 299 (2), 253 (2), 239 (3), 211 (5), 197 (34), 183 (10), 161 (12), 141 (100), 123 (61), 95 (56).

EMAR m/z: Observado 486.2610 (calculado para C₂₈H₃₈O₇ [M⁺]: 486.2618).

(2β,3β)-(24β,25β)-Diepoxiwithaferina A (36)	
[α]²⁵_D:	- 60.6 (c 0.53, CHCl ₃)
IR γ_{\max} (película):	3434, 2945, 2868, 1456, 1391, 1313, 1237, 1047, 920, 821, 756 cm ⁻¹ .
UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ):	212 (4.1).
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ:	0.64 (3H, s, Me18); 0.91 (3H, d, J= 6.8 Hz, Me21); 0.97 (1H, m, H14); 1.04 (1H, m, H17); 1.05 (1H, m, H12); 1.15 (1H, m, H15); 1.18 (1H, m, H9); 1.21 (1H, m, H11); 1.22 (3H, s, Me19); 1.27 (1H, m, H23); 1.30 (1H, m, H11); 1.37 (1H, m, H16); 1.39 (1H, m, H23); 1.40 (1H, m, H7 α); 1.57 (3H, s, Me28); 1.66 (1H, m, H15); 1.74 (1H, m, H16); 1.91 (1H, m, H12); 1.93 (1H, m, H20); 2.01 (1H, m, H8); 2.22 (1H, m, H7 β); 2.52 (1H, sa, OH-4); 2.71 (1H, t, J=6.2 Hz, OH-27); 3.11 (1H, sa, H6); 3.58 (1H, d, J= 4.5 Hz, H2); 3.72 (1H, dd, J= 3.5, 4.5 Hz, H3); 3.80 (1H, dd, J=6.2, 10.1 Hz, H27); 3.93 (1H, t, J= 3.5 Hz, H4); 4.14 (1H, dd, J=6.2, 10.1 Hz, H27); 4.56 (1H, dt, J= 3.2, 10.7 Hz, H22).
RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ:	11.2 (c, C18); 12.8 (c, C21); 14.4 (c, C19); 17.2 (c, C28); 19.9 (t, C11); 24.1 (t, C15); 27.1 (t, C16); 29.0 (t, C23); 29.4 (d, C8); 30.7 (t, C7); 38.3 (d, C20); 38.6 (t, C12); 40.5 (d, C9); 42.5 (s, C13); 48.4 (s, C10); 51.6 (d, C17); 54.6 (d, C2); 55.1 (d, C3); 55.8 (d, C14); 59.5 (d, C6); 60.1 (t, C27); 60.4 (s, C25); 63.0 (s, C24); 63.5 (s, C5); 74.7 (d, C4); 76.5 (d, C22); 170.2 (s, C26); 206.3 (s, C1).
EM (IE) m/z (%):	502 [M ⁺] (2), 448 (4), 429 (20), 334 (6), 315 (17), 297 (3), 275 (6), 253 (9), 213 (31), 199 (15), 183 (56), 159 (37), 140 (50), 123 (53), 95 (64).
EMAR m/z:	Observado 502.2585 (calculado para C ₂₈ H ₃₈ O ₈ [M ⁺]: 502.2567).

• Adición conjugada de H₂O sobre 1



A una disolución de 20.0 mg de 1 (0.04 mmoles) en 2 ml de una mezcla 1:1 de THF/H₂O a 0 °C, se le añadió 0.3 ml de NaOH (1M) y se agitó durante 8 horas. Transcurrido éste tiempo, se neutralizó con una disolución de HCl (1M) y se extrajo 3 veces con CH₂Cl₂. La fase orgánica se lavó con una disolución saturada de NaCl, se secó sobre MgSO₄ anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a vacío. El residuo fue purificado por CPP, usando como fase móvil (CH₂Cl₂/acetona, 7:3), obteniéndose 19.1 mg de 37 (R= 98%) como un sólido amorfo.

Viscosalactona B (37)

[α]_D²⁵: + 35.2 (c 0.71, CHCl₃)

IR γ_{max} (película): 3690, 3470, 2932, 1715, 1695, 1380, 1231, 1027, 960 cm⁻¹.

UV (EtOH) λ_{max} (log ϵ): 215 (4.5) nm.

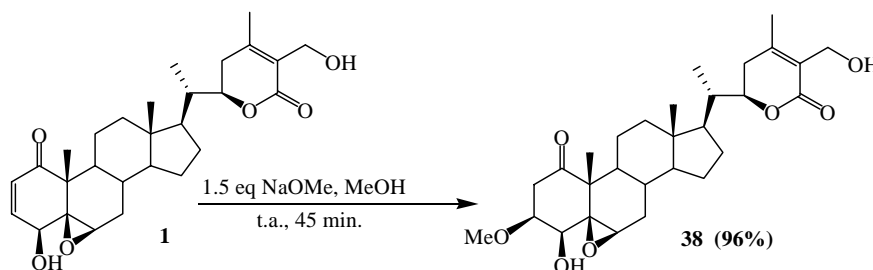
RMN ¹H
(CDCl₃, 400 MHz) δ : 0.67 (3H, s, Me18); 0.99 (1H, m, H14); 0.99 (3H, d, *J* = 6.5 Hz, Me21); 1.12 (1H, m, H17); 1.17 (1H, m, H12); 1.18 (1H, m, H15); 1.27 (1H, m, H8); 1.32 (1H, m, H9); 1.33 (1H, m, H11); 1.34 (3H, s, Me19); 1.36 (1H, m, H7 α); 1.38 (1H, m, H16); 1.53 (1H, m, H11); 1.68 (1H, m, H16); 1.69 (1H, m, H15); 1.93 (1H, m, H12); 2.00 (1H, m, H23 α); 2.01 (1H, m, H20); 2.04 (3H, s, Me28); 2.18 (1H, m, H7 β); 2.48 (1H, m, H23 β); 2.52 (1H, d, *J* = 5.2 Hz, H2 α); 2.90 (1H, t, *J* = 6.5 Hz); 3.16 (1H, dd, *J* = 6.5, 15.6 Hz, H2 β); 3.27 (1H, sa, H6); 3.42 (1H, t, *J* = 4.9 Hz, H3); 4.29 (1H, d, *J* = 4.9 Hz, H4); 4.36, 4.40 (2H, dd_{AB}, *J* = 6.0, 12.8 Hz, H27); 4.45 (1H, dt, *J* = 3.2, 13.4 Hz, H22).

RMN ¹³C
(CDCl₃, 100 MHz) δ : 11.4 (c, C18); 13.1 (c, C21); 15.8 (c, C19); 19.8 (c, C28); 21.6 (t, C11); 24.0 (t, C15); 27.0 (t, C16); 28.8 (d, C8); 29.6 (t, C23); 30.7 (t, C7); 38.5 (d, C20); 38.9 (t, C12); 42.1 (t, C2); 42.3 (s, C13); 42.4 (d, C9); 50.0 (s, C10); 51.7 (d, C17); 55.8 (d, C14); 57.2 (t, C27); 59.9 (d, C6); 64.0 (s, C5); 68.2 (d, C4); 77.0 (d, C3); 78.5 (d, C22); 125.4 (s, C25); 152.7 (s, C24); 166.8 (s, C26); 209.7 (s, C1).

ESIMS *m/z* (%): 511 [M+Na]⁺ (100).

ESI/MS-AR *m/z*: Observado 511.2975 (calculado para C₂₈H₄₀O₇Na [M+Na]⁺: 511.2672).

• Adición conjugada de metanol sobre 1



A una disolución de 30.0 mg de **1** (0.063 mmoles, 1 eq) en 2 ml de MeOH, bajo atmósfera de nitrógeno y a temperatura ambiente, se le adicionó 5 mg de NaOMe (0.095 mmoles, 1.5 eq) y se dejó agitar durante 45 minutos. Transcurrido éste tiempo, se neutralizó con una disolución de HCl (1M), se extrajo 3 veces con CHCl₃ y se lavó con una disolución saturada de NaCl. La fase orgánica se secó sobre MgSO₄ anhidro y tras filtrar se eliminó el disolvente a vacío. El residuo fue purificado por CPP, usando como fase móvil (CH₂Cl₂:acetona, 9:1), obteniéndose 30.1 mg de **38** (R= 96%) como un sólido amorfo.

3β-O-Metilwithaferina A (38)

[α]²⁵_D: +11.3° (c 3.0, CHCl₃).

IR γ_{max} (película): 3475, 2930, 1712, 1693, 1379, 1229, 1025, 956, 756 cm⁻¹.

UV (EtOH) λ_{max} (log ε): 217 (4.0) nm.

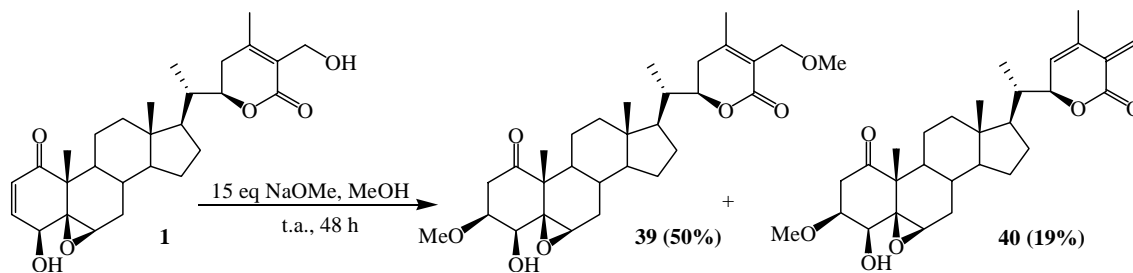
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ: 0.68 (3H, s, Me18); 0.98 (1H, m, H14); 1.00 (3H, d, J= 6.5 Hz, Me21); 1.10 (1H, m, H17); 1.14 (1H, m, H12); 1.19 (1H, m, H15); 1.20 (1H, m, H9); 1.31 (3H, s, Me19); 1.34 (1H, m, H7α); 1.37 (1H, m, H11); 1.39 (1H, m, H16); 1.41 (1H, m, H11); 1.43 (1H, m, H8); 1.66 (1H, m, H15); 1.67 (1H, m, H16); 1.91 (1H, m, H12); 2.00 (1H, m, H23α); 2.01 (1H, m, H20); 2.05 (3H, s, Me28); 2.19 (1H, m, H7β); 2.51 (1H, t, J= 13.9 Hz, H23β); 2.63 (1H, dd, J= 3.8, 15.0 Hz, H2α); 3.01 (1H, dd, J= 6.5, 15.0 Hz, H2β); 3.23 (1H, s, H6); 3.36 (3H, s, OMe); 3.50 (1H, d, J= 2.6 Hz, H4); 3.72 (1H, m, H3α); 4.35, 4.40 (2H, d_{AB}, J= 12.5 Hz, H27); 4.43 (1H, dt, J= 3.2, 13.3 Hz, H3).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ: 11.5 (c, C18); 13.3 (c, C21); 15.6 (c, C19); 20.0 (c, C28); 21.6 (t, C11); 24.3 (t, C15); 27.3 (t, C16); 29.4 (d, C8); 29.8 (t, C23); 31.2 (t, C7); 38.8 (d, C20); 39.1 (t, C12); 39.6 (t, C2); 42.7 (s, C13); 42.8 (d, C9); 50.4 (s, C10); 51.9 (d, C17); 56.0 (d, C14); 56.8 (c, OMe-3); 57.4 (t, C27); 60.2 (d, C6); 65.0 (s, C5); 75.1 (d, C4); 77.5 (d, C3); 78.7 (d, C22); 125.7 (s, C25); 153.0 (s, C24); 167.0 (s, C26); 209.9 (s, C1).

ESIMS *m/z* (%): 525 [M+Na]⁺ (100).

ESI/MS-AR *m/z*: Observado 525.2830 (calculado para C₂₉H₄₂O₈Na [M+Na]⁺: 525.2828).

• Adición conjugada de metanol sobre 1



A una disolución de 27.0 mg de **1** (0.057 mmoles, 1 eq) en 2 ml de MeOH, bajo atmósfera de nitrógeno, se le adicionó 15 mg de NaOMe (0.28 mmoles, 15 eq). La reacción se agitó durante 48 horas a temperatura ambiente. Transcurrido éste tiempo, se neutralizó con una disolución de HCl (1M), se extrajo 3 veces con CHCl₃ y se lavó con una disolución saturada de NaCl. La fase orgánica se secó sobre MgSO₄ anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a vacío. El residuo fue purificado por CPP, usando como fase móvil (CH₂Cl₂:acetona, 9:1), obteniéndose 15.1 mg de **39** (R= 50%) y 5.3 mg de **40** (R= 19%) como sólidos amorfos.

3β,27-Di-O-metilwithaferina A (39)

[α]_D²⁵: + 14.0 (c 0.97, CHCl₃)

IR γ_{max} (película): 3688, 3468, 2929, 1711, 1690, 1376, 1228, 1025, 956 cm⁻¹.

UV (EtOH) λ_{max} (log ε): 215 (4.5) nm.

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ: 0.68 (3H, s, Me18); 0.99 (1H, m, H14); 1.00 (3H, d, J= 6.7 Hz, Me21); 1.12 (1H, m, H17); 1.15 (1H, m, H12); 1.18 (1H, m, H15); 1.29 (1H, m, H9); 1.33 (3H, s, Me19); 1.36 (1H, m, H7α); 1.39 (1H, m, H11); 1.40 (1H, m, H16); 1.44 (1H, m, H11); 1.46 (1H, m, H8); 1.68 (1H, m, H15); 1.70 (1H, m, H16); 1.95 (1H, m, H12); 2.02 (1H, m, H23α); 2.03 (1H, m, H20); 2.09 (3H, s, Me28); 2.20 (1H, m, H7β); 2.48 (1H, s, OH-4); 2.51 (1H, m, H23β); 2.64 (1H, dd, J= 4.3, 14.9 Hz, H2α); 3.04 (1H, dd, J= 6.3, 14.9 Hz, H2β); 3.24 (1H, s, H6); 3.38 (3H, s, OMe-3); 3.40 (3H, s, OMe-27); 3.51 (1H, d, J= 2.2 Hz, H4); 3.74 (1H, m, H3α); 4.18, 4.31 (2H, d_{AB}, J= 10.7 Hz, H27); 4.43 (1H, dt, J= 3.2, 13.1 Hz, H22).

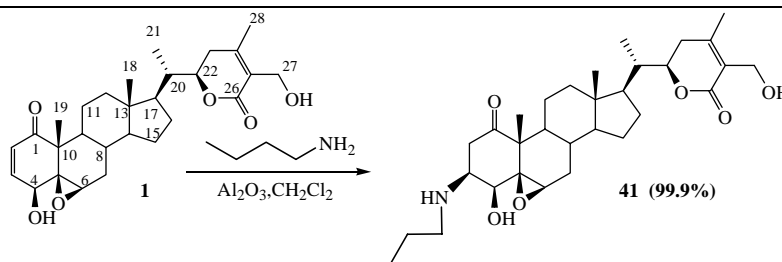
RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ: 11.6 (c, C18); 13.4 (c, C21); 15.8 (c, C19); 20.6 (c, C28); 21.6 (t, C11); 24.3 (t, C15); 27.3 (t, C16); 29.4 (d, C8); 30.0 (t, C23); 31.2 (t, C7); 38.8 (d, C20); 39.1 (t, C12); 39.5 (t, C2); 42.7 (s, C13); 42.8 (d, C9); 50.4 (s, C10); 52.0 (d, C17); 56.1 (d, C14); 56.8 (c, OMe-3); 58.5 (c, OMe-27); 60.5 (d, C6); 64.9 (s, C5); 65.7 (t, C27); 75.2 (d, C4); 77.5 (d, C3); 78.2 (d, C22); 123.7 (s, C25); 156.3 (s, C24); 165.9 (s, C26); 209.8 (s, C1).

ESIMS *m/z* (%): 539 [M+Na]⁺ (100).

ESI/MS-AR *m/z*: Observado 539.2983 (calculado para C₃₀H₄₄O₇Na [M+Na]⁺: 539.3979).

5β,6β-Epoxi-4,27-dihidroxi-3β-O-metil-1-oxo-witaha-23,25-dienolida (40)	
[α]²⁵_D:	- 5.7 (c 0.3, CHCl ₃)
IR γ_{\max} (película):	3438, 2927, 2857, 1715, 1465, 1400, 1296, 1121, 1040, 761, 631 cm ⁻¹ .
UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ):	214 (3.8) nm.
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ:	0.69 (3H, s, Me18); 0.81 (3H, d, J = 6.6 Hz, Me21); 1.01 (1H, m, H14); 1.14 (1H, m, H12); 1.19 (2H, m, H17, H15); 1.22 (1H, m, H9); 1.33 (3H, s, Me19); 1.37 (1H, m, H11); 1.38 (1H, m, H7 α); 1.41 (1H, m, H11); 1.45 (1H, m, H16); 1.46 (1H, m, H8); 1.68 (1H, m, H15); 1.82 (1H, m, H16); 1.88 (1H, m, H12); 1.97 (3H, s, Me28); 2.06 (1H, m, H20); 2.21 (1H, m, H7 β); 2.64 (1H, dd, J = 4.1, 14.8 Hz, H2 α); 3.05 (1H, dd, J = 5.8, 14.8 Hz, H2 β); 3.25 (1H, s, H6); 3.38 (3H, s, OMe-3); 3.52 (1H, d, J = 2.9 Hz, H4); 3.74 (1H, m, H3 α); 5.06 (1H, s, H22); 5.64 (1H, s, H27); 5.69 (1H, s, H23); 6.44 (1H, s, H27).
RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ:	11.8 (c, C18); 12.9 (c, C21); 15.9 (c, C19); 18.6 (c, C28); 21.7 (t, C11); 24.3 (t, C15); 27.4 (t, C16); 29.4 (d, C8); 31.2 (t, C7); 39.1 (t, C12); 39.5 (t, C2); 41.6 (s, C13; d, C20); 42.8 (d, C9); 50.4 (s, C10); 52.2 (d, C17); 56.1 (d, C14); 56.9 (c, OMe-3); 60.6 (d, C6); 64.9 (s, C5); 75.2 (d, C4); 77.5 (d, C3); 81.3 (d, C22); 122.0 (d, C23); 122.2 (t, C27); 131.8 (s, C24); 132.2 (s, C25); 164.6 (s, C26); 209.9 (s, C1).
ESIMS m/z (%):	507 [M+Na] ⁺ (100).
ESI/MS-AR m/z:	Observado 507.2721 (calculado para C ₂₉ H ₄₀ O ₆ Na [M+Na] ⁺ : 507.2717).

• Adición conjugada de 1-butilamina en 1.



A una disolución de 20.0 mg de **1** (0.04 mmoles, 1 eq) en 3.0 ml de CH₂Cl₂ anhidro, bajo atmósfera de argón, se le añadió 45 mg de Al₂O₃ y 71 µl de 1-butilamina (NBut) (0.72 mmoles, 18 eq). La reacción se agitó durante 20 horas a temperatura ambiente. Transcurrido éste tiempo, se filtró sobre celita, se lavó con agua, se extrajo 3 veces con CHCl₃ y se secó sobre MgSO₄ anhidro. Posteriormente, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo fue purificado por CC tipo flash de gel de sílice, eluída en CH₂Cl₂/MeOH (98:2) obteniéndose el producto **41** (24 mg, R= 99.9%) como un sólido amorfo.

3-Butilamino-2,3-dihidrowithaferina A (41)

[α]_D²⁵: + 14.5 (c 2.15, CHCl₃)

IR γ_{max} (película): 3430, 2931, 2868, 1692, 1459, 1396, 1290, 1133, 1019, 754 cm⁻¹.

UV (EtOH) λ_{max} (log ε): 224 (4.0) nm.

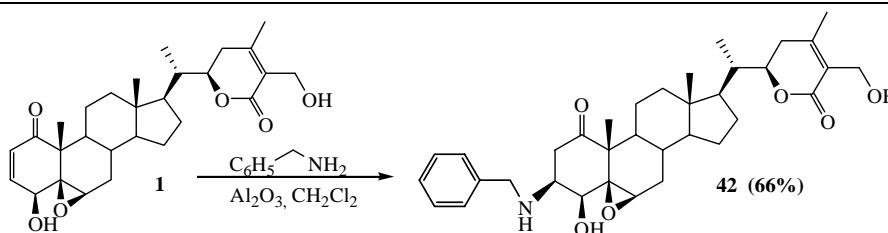
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ: 0.67 (3H, s, Me18); 0.98 (1H, m, H14); 1.00 (3H, d, J= 6.7 Hz, Me21); 1.09 (1H, m, H17); 1.15 (1H, m, H15); 1.17 (1H, m, H12); 1.28 (1H, m, H9); 1.29 (1H, m, H11); 1.30 (1H, m, H7α); 1.34 (3H, s, Me19); 1.36 (1H, m, H16); 1.40 (1H, m, H8); 1.55 (1H, m, H11); 1.65 (1H, m, H15); 1.66 (1H, m, H16); 1.91 (1H, m, H12); 1.99 (1H, m, H20); 2.00 (1H, m, H23α); 2.04 (3H, s, Me28); 2.15 (1H, m, H7β); 2.29 (1H, dd, J= 5.5, 14.4 Hz, H2α); 2.50 (1H, m, H23β); 3.11 (1H, dd, J= 5.7, 14.4 Hz, H2β); 3.23 (1H, sa, H6); 3.24 (1H, dd, J= 5.7, 9.9 Hz, H3α); 3.39 (1H, d, J= 4.4 Hz, H4); 4.34, 4.39 (2H, d_{AB}, J= 12.6 Hz, H27); 4.43 (1H, dt, J= 3.5, 13.3 Hz, H22); Nbut [0.90 (3H, t, J= 7.3 Hz); 1.35 (2H, m); 1.41 (2H, m); 2.52 (1H, m); 2.62 (1H, m)].

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ: 11.7 (c, C18); 13.3 (c, C21); 16.5 (c, C19); 20.0 (c, C28); 22.1 (t, C11); 24.3 (t, C15); 27.3 (t, C16); 29.1 (d, C8); 29.8 (t, C23); 31.1 (t, C7); 38.8 (d, C20); 39.2 (t, C12); 40.6 (t, C2); 42.7 (d, C9); 42.8 (s, C13); 50.2 (s, C10); 52.0 (d, C17); 56.0 (d, C14); 56.9 (d, C3); 57.4 (t, C27); 61.0 (d, C6); 65.4 (s, C5); 75.6 (d, C4); 78.8 (d, C22); 125.7 (s, C25); 152.9 (s, C24); 167.0 (s, C26); 211.2 (s, C1); Nbut [14.0 (c); 20.4 (t); 32.3 (t); 46.9 (t)].

ESIMS m/z (%): 544 [M+1]⁺ (100).

ESI/MS-AR m/z: Observado 544.3645 (calculado para C₃₂H₄₉NO₆ [M+1]⁺: 544.3638).

• Adición conjugada de bencilamina en 1.



A una disolución de 20.0 mg de **1** (0.04 mmoles, 1 eq) en 3.0 ml de CH₂Cl₂ anhidro, bajo atmósfera de argón, se le adicionó 45 mg de Al₂O₃ y 100 µl de bencilamina (0.91 mmoles, 18 eq), agitando la reacción durante 20 horas a temperatura ambiente. Transcurrido éste tiempo, se lavó con agua, se extrajo 3 veces con CHCl₃ y se secó sobre MgSO₄ anhidro. Posteriormente, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo fue purificado por CC de gel de sílice, eluída en CH₂Cl₂/MeOH al 2% obteniéndose el producto **42** (15.1 mg, R= 66%) como un sólido amorfo.

3-Bencilamino-2,3-dihidrowithaferina A (42)

[α]_D²⁵: - 13.9 (c 1.35, CHCl₃).

IR γ_{max} (película): 3419, 2934, 2868, 1692, 1454, 1397, 1321, 1236, 1131, 1007, 753 cm⁻¹.

UV (EtOH) λ_{max} (log ε): 229 (4.1) nm.

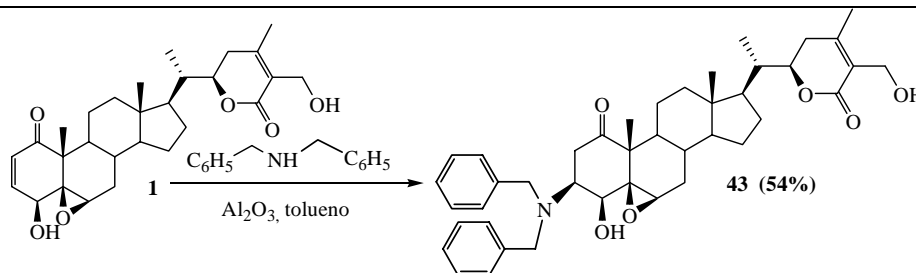
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ: 0.68 (3H, s, Me18); 0.99 (1H, m, H14); 1.00 (3H, d, J= 6.7 Hz, Me21); 1.11 (1H, m, H17); 1.16 (1H, m, H15); 1.19 (1H, m, H12); 1.30 (1H, m, H7α); 1.32 (2H, m, H9, H11); 1.35 (3H, s, Me19); 1.37 (1H, m, H16); 1.42 (1H, m, H8); 1.58 (1H, m, H11); 1.66 (1H, m, H15); 1.67 (1H, m, H16); 1.92 (1H, m, H12); 2.00 (1H, m, H20); 2.01 (1H, m, H23α); 2.05 (3H, s, Me28); 2.15 (1H, m, H7β); 2.36 (1H, dd, J= 5.3, 14.4 Hz, H2α); 2.51 (1H, m, H23β); 3.15 (1H, dd, J= 5.3, 14.4 Hz, H2β); 3.18 (1H, sa, H6); 3.31 (1H, dd, J= 5.5, 9.8 Hz, H3); 3.41 (1H, d, J= 4.2 Hz, H4); 4.35, 4.40 (2H, d_{AB}, J= 12.6 Hz, H27); 4.43 (1H, dt, J= 3.5, 13.4 Hz, H22); NBz [3.72, 3.83 (2H, d_{AB}, J= 13.3 Hz); 7.26 (2H, d, J= 6.9 Hz); 7.30 (1H, m); 7.32 (2H, d, J= 6.9 Hz)].

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ: 11.6 (c, C18); 13.3 (c, C21); 16.6 (c, C19); 20.0 (c, C28); 22.1 (t, C11); 24.3 (t, C15); 27.2 (t, C16); 29.1 (d, C8); 29.8 (t, C23); 31.1 (t, C7); 38.8 (d, C20); 39.2 (t, C12); 40.2 (t, C2); 42.7 (d, C9); 42.8 (s, C13); 50.3 (s, C10); 52.0 (d, C17); 56.0 (d, C14); 56.3 (d, C3); 57.5 (t, C27); 61.3 (d, C6); 65.4 (s, C5); 75.6 (d, C4); 78.8 (d, C22); 125.7 (s, C25); 152.8 (s, C24); 167.0 (s, C26); 211.1 (s, C1); NBz [51.3 (t); 127.3 (d); 128.0 (2 x d); 128.7 (2 x d); 139.7 (s)].

ESIMS m/z (%): 600 [M+Na]⁺ (100).

ESI/MS-AR m/z: Observado 600.3310 (calculado para C₃₅H₄₇NO₆Na [M+Na]⁺: 600.3301).

• Adición conjugada de dibencilamina en 1.



A una disolución de 20.0 mg de **1** (0.04 mmoles, 1 eq) en 3.0 ml de tolueno anhidro bajo atmósfera de argón, se le adicionó 45 mg de Al_2O_3 y 250 μl de benzilamina (1.29 mmoles, 32 eq.). La reacción se agitó durante 24 horas a temperatura ambiente. Transcurrido éste tiempo, se filtró sobre celita, se lavó con agua y se extrajo 3 veces con CHCl_3 . La fase orgánica se secó sobre MgSO_4 anhidro, se filtró y eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo fue purificado por CC de gel de sílice (CH_2Cl_2 /acetona al 12%) y CPP (CH_2Cl_2 /MeOH al 2%) obteniéndose el producto **43** (7.5 mg, R= 54%) como un sólido amorfo.

3-Dibencilamino-2,3-dihidrowithaferina A (43)

$[\alpha]_D^{25}$: + 5.9 (c 0.45, CHCl_3)

IR γ_{max} (película): 3477, 2928, 2858, 1712, 1457, 1383, 1293, 1132, 1029, 751 cm^{-1} .

UV (EtOH) λ_{max} (log ϵ): 221 (4.1) nm.

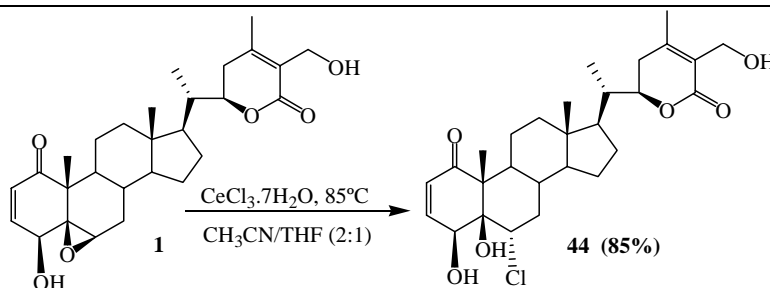
RMN ^1H (CDCl₃, 400 MHz)
 δ : 0.68 (3H, s, Me18); 0.96 (1H, m, H14); 1.01 (3H, d, $J= 6.6$ Hz, Me21); 1.11 (1H, m, H17); 1.12 (1H, m, H12); 1.13 (1H, m, H9); 1.17 (1H, m, H15); 1.22 (3H, s, Me19); 1.29 (1H, m, H7 α); 1.33 (1H, m, H11); 1.39 (1H, m, H16); 1.42 (2H, m, H8, H11); 1.66 (1H, m, H15); 1.68 (1H, m, H16); 1.93 (1H, m, H12); 2.00 (1H, m, H23 α); 2.01 (1H, m, H20); 2.06 (3H, s, Me28); 2.22 (1H, m, H7 β); 2.51 (1H, m, H23 β); 2.73 (2H, m, H2); 3.29 (1H, sa, H6); 3.39 (1H, m, H3); 3.70 (1H, sa, H4); 4.36, 4.40 (2H, d_{AB}, $J= 12.6$ Hz, H27); 4.44 (1H, dt, $J= 3.6, 13.3$ Hz, H22); NBz₂ [3.65, 3.71 (4H, d_{AB}, $J= 13.8$ Hz); 7.28 (2H, m); 7.34 (8H, d, $J= 6.9$ Hz)].

RMN ^{13}C (CDCl₃, 100 MHz)
 δ : 11.6 (c, C18); 13.3 (c, C21); 15.2 (c, C19); 20.0 (c, C28); 21.1 (t, C11); 24.2 (t, C15); 27.2 (t, C16); 28.8 (d, C8); 29.8 (t, C23); 31.3 (t, C7); 37.5 (t, C2); 38.7 (d, C20); 39.0 (t, C12); 42.7 (s, C13; d, C9); 49.9 (s, C10); 51.9 (d, C17); 56.1 (d, C14); 57.5 (t, C27); 58.7 (d, C3); 59.7 (d, C6); 64.7 (s, C5); 74.0 (d, C4); 78.7 (d, C22); 125.7 (s, C25); 152.6 (s, C24); 166.9 (s, C26); 210.4 (s, C1); NBz₂ [54.2 (2 x t); 127.3 (2 x d); 128.5 (4 x d); 128.6 (4 x d); 138.7 (2 x s)].

ESIMS m/z (%): 690 [M+Na]⁺ (100).

ESI/MS-AR m/z : Observado 690.3766 (calculado para C₄₂H₅₃NO₆Na [M+Na]⁺: 690.3771).

• Apertura del epóxido de la withaferina A con cloruro de cerio.



A 10 mg de $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.02 mmol, 1 eq) disueltos en 2 ml de CH_3CN en atmósfera inerte se le añadió, vía cánula, 20 mg de withaferina A (0.04 mmol, 2 eq) disueltos en 3 ml de una disolución (2:1) de $\text{CH}_3\text{CN}/\text{THF}$. La mezcla de reacción se calentó a reflujo (85°C) durante 18 horas y transcurrido éste tiempo, se eliminó el disolvente a presión reducida, se redisolvió en CHCl_3 y se lavó, en primer lugar, con una disolución saturada de NaCl y a continuación con H_2O . Posteriormente, se secó con MgSO_4 anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a vacío. El residuo resultante, fue purificado por cromatografía en columna de gel de sílice (CH_2Cl_2 :Acetona, 9:1), obteniéndose 17 mg de **44** ($R=85\%$) como un sólido amorfo.

6 α -Cloro-5 β -hidroxiwithaferina A (44)

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$: + 51.3 (c 1.60, CHCl_3)

IR γ_{max} (película): 3474, 2933, 2868, 1683, 1461, 1380, 1290, 1132, 1035, 841, 754 cm^{-1} .

UV (EtOH) λ_{max} ($\log \epsilon$) 218 (4.0); 283 (2.3) nm.

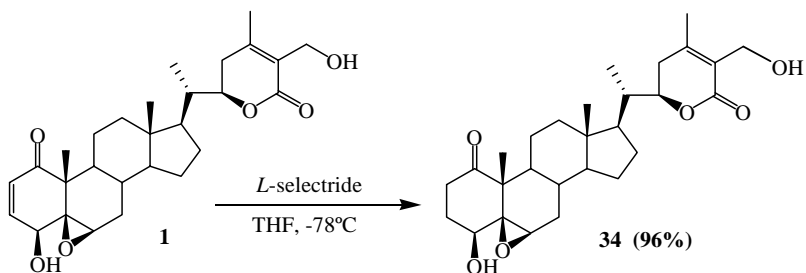
RMN ^1H
(CDCl_3 , 400 MHz) δ : 0.71 (3H, s, Me18); 0.94 (1H, m, H11); 0.99 (3H, d, $J=6.6$ Hz, Me21); 1.10 (1H, m, H12); 1.12 (1H, m, H14); 1.24 (1H, m, H15); 1.26 (1H, m, H17); 1.28 (3H, s, Me19); 1.31 (1H, m, H9); 1.37 (1H, m, H11); 1.40 (1H, m, H16); 1.65 (1H, m, H8); 1.69 (2H, m, H15, H16); 1.70 (1H, m, H7 α); 1.94 (1H, m, H12); 1.98 (1H, m, H23 α); 2.01 (1H, m, H20); 2.06 (3H, s, Me28); 2.33 (1H, m, H7 β); 2.50 (1H, m, H23 β); 2.89 (1H, s, OH-27); 3.17 (1H, d, $J=4.5$ Hz, OH-4); 4.38 (2H, m, H27); 4.40 (1H, m, H6); 4.46 (1H, dt, $J=3.5, 11.0$ Hz, H22); 5.05 (1H, t, $J=2.0$ Hz, H4); 6.04 (1H, dd, $J=2.0, 10.4$ Hz, H2); 6.50 (1H, dd, $J=2.4, 10.4$ Hz, H3).

RMN ^{13}C
(CDCl_3 , 100 MHz) δ : 9.9 (c, C19); 11.8 (c, C18); 13.3 (c, C21); 20.0 (c, C28); 22.7 (t, C11); 24.0 (t, C15); 27.2 (t, C16); 29.8 (t, C23); 35.1 (d, C8); 38.7 (d, C20); 39.0 (t, C7); 39.4 (t, C12); 43.1 (s, C13); 45.8 (d, C9); 51.8 (d, C17); 55.3 (d, C14); 57.2 (s, C10); 57.4 (t, C27); 66.1 (d, C6); 66.7 (d, C4); 78.1 (s, C5); 78.6 (d, C22); 125.8 (s, C25); 127.7 (d, C2); 142.8 (d, C3); 152.6 (s, C24); 166.9 (s, C26); 200.0 (s, C1).

ESIMS m/z (%): 529 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (100).

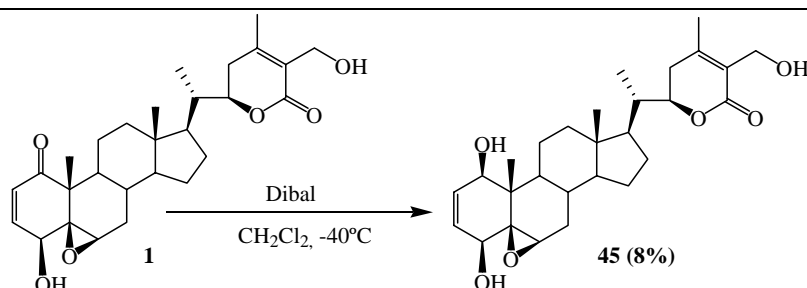
ESI/MS-AR m/z : Observado 529.2328 (calculado para $\text{C}_{28}\text{H}_{39}\text{O}_6\text{ClNa}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 529.2333).

- Reducción de **1** con *L*-selectride.



A una disolución de 20.0 mg de **1** (0.1 mmoles, 1 eq) en 2 ml de THF y -78 °C, se le adicionó 140 μ l de una disolución de *L*-selectride en THF (1M) y se agitó durante 1 hora, bajo atmósfera de argón. Transcurrido éste tiempo, se eliminó el disolvente a presión reducida, se redisolvió con CH₂Cl₂ y se lavó con una disolución de HCl al 5% y con H₂O. La fase orgánica se secó sobre MgSO₄ anhidro, se filtró y concentró a vacío. El residuo resultante, fue purificado por CC sobre gel de sílice usando como fase móvil CH₂Cl₂/acetona (9:1). Se obtuvo así 19 mg de **34** (R= 96%), derivado cuyos datos espectroscópicos y espectrométricos fueron coincidentes con el **2,3-Dihidro-withaferina A (34)**, obtenido de la hidrogenación catalítica de **1** con hidróxido de paladio.

• Reducción de 1 con hidruro de diisobutilaluminio (Dibal).



A una disolución de 25.0 mg de 1 (0.053 mmoles, 1 eq) en 3 ml de CH_2Cl_2 a -40°C , se le adicionó 80 μl de Dibal (1M) en hexano (0.080 mmol, 1.5 eq). La reacción se mantuvo durante 2 horas a -40°C y bajo atmósfera de argón. posteriormente, se añadió a la reacción una mezcla agua/hielo acidificada, con una disolución de HCl al 5% y se extrajo 3 veces con CHCl_3 . La fase orgánica se secó sobre MgSO_4 anhidro, se filtró y concentró a vacío. El residuo fue purificado por CC de gel de sílice (CH_2Cl_2 /acetona, 8.5:1.5), obteniéndose 2 mg de 45 (R= 8%) como un sólido amorfo.

1-Deoxo-1 β -hidroxiwithaferina A (45)

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$: + 44.4 (c 0.56, CHCl_3)

IR γ_{max} (película): 3416, 2924, 2854, 1694, 1460, 1380, 1131, 1021, 755 cm^{-1} .

UV (EtOH) λ_{max} (log ϵ): 225 (3.9); 285 (2.9) nm.

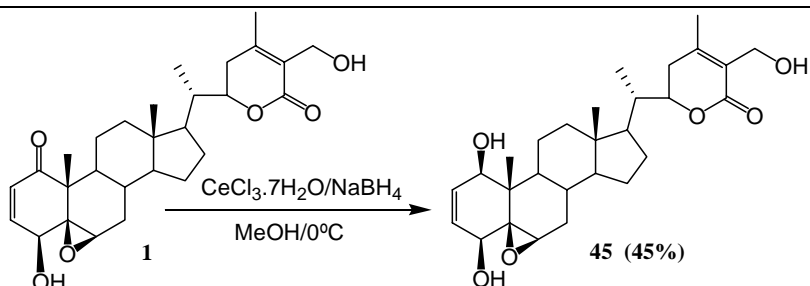
RMN ^1H
(CDCl_3 , 400 MHz) δ : 0.71 (3H, s, Me18); 0.71 (1H, m, H9); 0.92 (1H, m, H14); 1.01 (3H, d, $J= 6.7$ Hz, Me21); 1.08 (1H, m, H17); 1.13 (1H, m, H12); 1.15 (1H, m, H15); 1.16 (3H, s, Me19); 1.24 (1H, m, H7 α); 1.36 (1H, m, H16); 1.46 (1H, m, H11); 1.51 (1H, m, H8); 1.63 (1H, m, H15); 1.66 (1H, m, H16); 1.70 (1H, m, H11); 1.98 (1H, m, H12); 1.99 (1H, m, H23 α); 2.01 (1H, m, H20); 2.04 (3H, s, Me28); 2.12 (1H, m, H7 β); 2.50 (1H, m, H23 β); 3.08 (1H, sa, H6); 3.62 (1H, d, $J= 5.0$ Hz, H4); 4.15 (1H, d, $J= 4.2$ Hz, H1); 4.35, 4.39 (2H, d_{AB}, $J= 12.6$ Hz, H27); 4.43 (1H, dt, $J= 3.6, 13.3$ Hz, H22); 6.16 (1H, dd, $J= 5.0, 9.7$ Hz, H3); 6.20 (1H, dd, $J= 4.2, 9.7$ Hz, H2).

RMN ^{13}C
(CDCl_3 , 100 MHz) δ : 11.7 (c, C18); 13.3 (c, C21); 14.3 (c, C19); 20.0 (c, C28); 22.7 (t, C11); 24.2 (t, C15); 27.3 (t, C16); 29.8 (t, C23); 30.2 (d, C8); 31.0 (t, C7); 38.7 (d, C20); 39.7 (s, C10; t, C12); 42.7 (s, C13); 48.3 (d, C9); 52.0 (d, C17); 56.2 (d, C14); 57.5 (t, C27); 61.5 (d, C6); 65.3 (s, C5); 71.0 (d, C4); 73.1 (d, C1); 78.7 (d, C22); 125.7 (s, C25); 130.0 (d, C3); 136.0 (d, C2); 152.8 (s, C24); 167.0 (s, C26).

ESIMS m/z (%): 495 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (100).

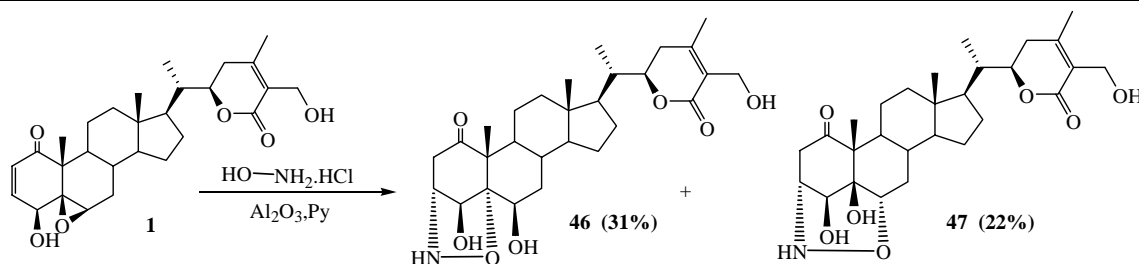
ESI/MS-AR m/z : Observado 495.2723 (calculado para $\text{C}_{28}\text{H}_{40}\text{O}_6\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 495.2723).

- Reducción de 1 en condiciones de Luche.



A una disolución de 40.0 mg de **1** (0.085 mmoles, 1 eq) en 3 ml de MeOH a 0°C , se le adicionó 32 mg de $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.085 mmol, 1 eq) y 6 mg de NaBH_4 (0.12 mmol, 1.5 eq). La reacción se agitó bajo atmósfera de argón y durante 45 min. A continuación se añadió a la mezcla de reacción 3 ml de H_2O fría y se lavó con una disolución saturada de NaCl. La fase orgánica se secó sobre MgSO_4 anhidro, se filtró y concentró a vacío. El residuo se purificó por CC de gel de sílice (CH_2Cl_2 /acetona, 8.5:1.5), obteniéndose 17 mg de **45** (R= 45%) como un sólido amorfo.

• Adición conjugada con hidroxilamina.



A una disolución de 20.0 mg de **1** (0.04 mmoles, 1 eq) en 1.0 ml de piridina bajo atmósfera de argón, se le añadió 5 mg de $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ (0.06 mmoles, 1.5 eq) y se agitó durante 2.5 días. Transcurrido este tiempo, se eliminó la piridina a presión reducida y se extrajo con AcOEt. Posteriormente, la fase orgánica, fue lavada con agua, secada con MgSO_4 anhidro y filtrada. Luego, se eliminó el disolvente a vacío y el residuo resultante fue purificado por columna cromatográfica de gel de sílice, eluída en CH_2Cl_2 :MeOH al 4% y cromatografía en placa preparativa eluída en CH_2Cl_2 :MeOH al 3% obteniéndose los productos **46** (6.2 mg, R= 31%) y **47** (4.4 mg, R= 22%) como sólidos amorfos.

5 α ,3 α -Epoximino-4 β ,6 β ,27-trihidroxi-1-oxo-witha-24-enolida (46)

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$: + 57.3 (c 0.46, CHCl_3).

IR γ_{max} (película): 3420, 2932, 2864, 1690, 1452, 1395, 1319, 1234, 1129, 1005, 751 cm^{-1} .

UV (EtOH) λ_{max} (log ϵ): 215 (4.1) nm.

RMN ^1H
(CD_3OD , 400 MHz) δ : 0.81 (3H, s, Me18); 1.05 (3H, d, J = 6.6 Hz, Me21); 1.14 (1H, m, H14); 1.20 (1H, m, H15); 1.26 (1H, m, H17); 1.33 (1H, m, H7 α); 1.34 (1H, m, H12); 1.40 (1H, m, H16); 1.51 (1H, m, H11); 1.62 (3H, s, Me19); 1.66 (1H, m, H7 β); 1.67 (1H, m, H15); 1.72 (1H, m, H11); 1.73 (1H, m, H9); 1.75 (1H, m, H8); 1.78 (1H, m, H16); 1.96 (1H, m, H20); 2.00 (1H, m, H12); 2.12 (3H, s, Me28); 2.20 (1H, m, H23 α); 2.31 (1H, d, J = 13.0 Hz, H2 α); 2.55 (1H, m, H23 β); 3.24 (1H, d, J = 15.0 Hz, H2 β); 3.63 (1H, da, J = 2.8 Hz, H3); 3.80 (1H, sa, H6); 4.33, 4.40 (2H, d_{AB}, J = 12.0 Hz, H27); 4.36 (1H, m, H4); 4.47 (1H, dt, J = 3.4, 13.3 Hz, H22).

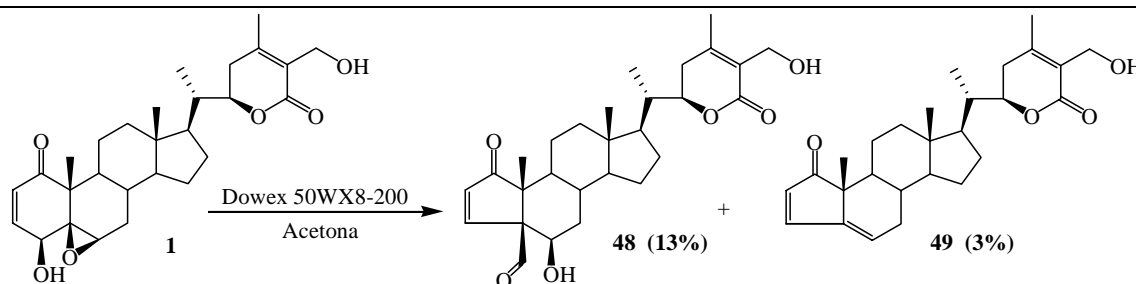
RMN ^{13}C
(CD_3OD , 100 MHz) δ : 11.1 (c, C18); 12.2 (c, C21); 13.2 (c, C19); 18.8 (c, C28); 22.7 (t, C11); 24.0 (t, C15); 26.7 (t, C16); 29.3 (t, C23); 29.6 (d, C8); 35.5 (t, C7); 39.0 (d, C20); 39.9 (2 x t, C2, C12); 42.5 (s, C13); 44.6 (d, C9); 51.9 (d, C17); 55.0 (t, C27); 55.8 (d, C14); 56.0 (s, C10); 59.6 (d, C3); 74.4 (d, C6); 78.7 (d, C22); 79.1 (s, C5); 82.6 (d, C4); 125.0 (s, C25); 156.5 (s, C24); 167.1 (s, C26); 213.6 (s, C1).

ESIMS m/z (%): 526 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (100).

ESI/MS-AR m/z : Observado 526.2772 (calculado para $\text{C}_{28}\text{H}_{41}\text{NO}_7\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 526.2781).

6α,3α-Epoximino-4β,6β,27-trihidroxi-1-oxo-witha-24-enolida (47)	
[α]²⁵_D:	+ 17.5 (c 0.26, CHCl ₃).
IR γ_{\max} (película):	3430, 2931, 1692, 1457, 1396, 1292, 1133, 1019, 750, 624 cm ⁻¹ .
UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ):	220 (4.2) nm.
RMN ¹H (CD₃OD, 400 MHz) δ:	0.77 (3H, s, Me18); 0.98 (1H, m, H14); 1.04 (3H, d, J = 6.6 Hz, Me21); 1.11 (1H, m, H7 α); 1.18 (1H, m, H15); 1.19 (1H, m, H12); 1.21 (1H, m, H17); 1.32 (3H, s, Me19); 1.41 (1H, m, H16); 1.54 (1H, m, H11); 1.68 (1H, m, H9); 1.69 (1H, m, H15); 1.75 (1H, m, H8); 1.79 (1H, m, H16); 1.95 (1H, m, H20); 2.00 (1H, m, H12); 2.12 (3H, s, Me28); 2.20 (1H, m, H23 α); 2.24 (1H, m, H7 β); 2.54 (1H, m, H23 β); 2.56 (1H, m, H2 α); 2.86 (1H, dd, J = 7.7, 13.0 Hz, H2 β); 3.42 (1H, m, H3); 3.68 (1H, d, J = 7.6 Hz, H6); 3.81 (1H, d, J = 4.1 Hz, H4); 4.32, 4.40 (2H, d _{AB} , J = 11.8 Hz, H27); 4.46 (1H, dt, J = 3.4, 13.2 Hz, H22).
RMN ¹³C (CD₃OD, 100 MHz) δ:	10.7 (c, C18); 12.3 (c, C21); 14.8 (c, C19); 18.8 (c, C28); 22.1 (t, C11); 23.8 (t, C15); 26.8 (t, C16); 29.3 (t, C23); 29.5 (d, C8); 31.2 (t, C7); 38.1 (t, C2); 38.9 (d, C20); 39.3 (t, C12); 41.3 (d, C9); 42.4 (s, C13); 51.5 (d, C17); 54.0 (s, C10); 55.0 (t, C27); 56.4 (d, C3); 58.2 (d, C14); 72.9 (s, C5); 75.2 (d, C4); 78.7 (d, C22); 82.4 (d, C6); 125.0 (s, C25); 156.4 (s, C24); 167.1 (s, C26); 214.3 (s, C1).
ESIMS m/z (%):	526 [M+Na] ⁺ (100).
ESI/MS-AR m/z:	Observado 526.2780 (calculado para C ₂₈ H ₄₁ O ₇ Na [M+Na] ⁺ : 526.2781).

• Contracción del anillo A de **1** con Dowex (50WX8-200)



A una suspensión de 130 mg Dowex (50WX8-200) en 5 ml de acetona seca, se le añadió, vía cánula, una disolución de 15 mg de **1** (0.032 mmoles) en 3 ml de acetona. La mezcla de reacción se agitó durante 24 horas, a temperatura ambiente y bajo atmósfera de N₂. Transcurrido éste tiempo, se filtró y eliminó el disolvente a vacío. El residuo se purificó por CPP, usando como fase móvil CH₂Cl₂/acetona, 9.5:0.5, obteniéndose 2 mg de **48** (R= 13%) y 0.5 mg de **49** (R= 3%) como un sólido amorfo. Los datos espectroscópicos de **48** fueron coincidentes con los del producto natural que denominamos **W-28** y que hemos presentado previamente en la parte experimental del capítulo 4.2.

27-Hidroxi-4-nor-1-oxo-witha-2,5,24-trienolida (49).

[α]_D²⁵: + 29.4 (c 0.40, CHCl₃).

IR γ_{\max} (película): 3438, 2940, 2870, 1700, 1460, 1396, 1320, 1187, 1019, 852, 754 cm⁻¹.

UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ): 288 (4.0) nm.

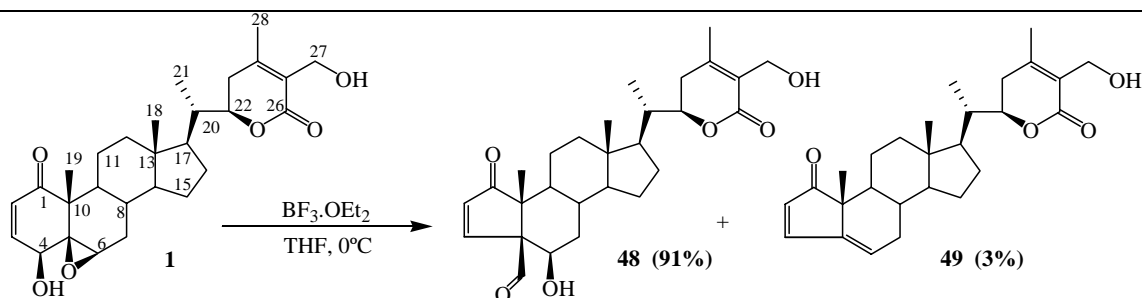
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ : 0.80 (3H, s, Me18); 1.06 (3H, d, *J* = 6.6 Hz, Me21); 1.07 (1H, m, H14); 1.12 (1H, m, H17); 1.19 (1H, m, H12); 1.20 (3H, s, Me19); 1.22 (1H, m, H9); 1.23 (1H, m, H15); 1.38 (1H, m, H16); 1.45 (1H, m, H11); 1.62 (1H, m, H11); 1.65 (1H, m, H15); 1.67 (1H, m, H16); 1.76 (1H, m, H7 α); 1.77 (1H, m, H8); 2.03 (1H, m, H12, H23 α); 2.05 (1H, m, H20); 2.06 (3H, s, Me28); 2.43 (1H, m, H7 β); 2.53 (1H, m, H23 β); 4.37, 4.42 (2H, d_{AB}, *J* = 12.6 Hz, H27); 4.47 (1H, dt, *J* = 3.3, 13.3 Hz, H22); 5.81 (1H, t, *J* = 3.9 Hz, H6); 5.98 (1H, d, *J* = 5.7 Hz, H2); 7.62 (1H, d, *J* = 5.7 Hz, H3).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ : 11.7 (c, C18); 13.2 (c, C21); 19.4 (c, C19); 19.8 (c, C28); 21.5 (t, C11); 24.2 (t, C15); 26.9 (t, C16); 29.6 (t, C23); 31.5 (t, C7); 32.4 (d, C8); 38.6 (d, C20); 39.0 (t, C12); 42.4 (d, C9); 43.3 (s, C13); 47.5 (s, C10); 51.7 (d, C17); 56.0 (d, C14); 57.3 (t, C27); 78.6 (d, C22); 123.3 (d, C6); 125.8 (s, C25); 129.1 (d, C2); 147.3 (s, C5); 153.1 (s, C24); 154.7 (d, C3); 167.1 (s, C26); 211.4 (s, C1).

EM (IE) *m/z* (%): 424 [M]⁺ (1), 283 (2), 253 (2), 239 (1), 227 (1), 213 (1), 197 (1), 185 (4), 141 (1), 43 (100).

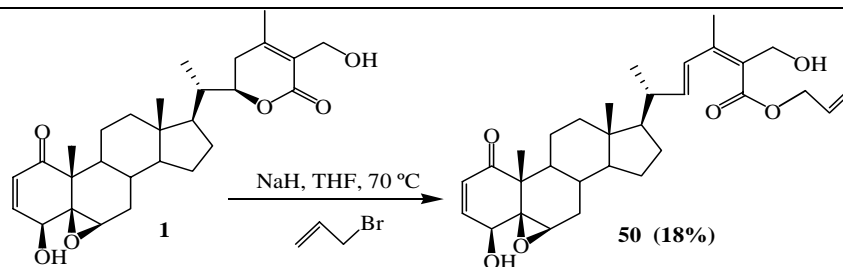
EMAR *m/z*: Observado 424.2625 (calculado para C₂₇H₃₆O₄ [M]⁺: 424.2614).

• Contracción del anillo A de **1** con el ácido de Lewis $\text{BF}_3\cdot\text{OEt}_2$.



A una disolución de 20 mg de **1** (0,04 mmol, 1 eq) en 2 ml de THF seco a 0 °C, se le añadió 100 μl de $\text{BF}_3\cdot\text{OEt}_2$ y agitó a temperatura ambiente durante 2.5 horas. Transcurrido éste tiempo, se neutralizó con una disolución de NaHCO_3 , se extrajo 3 veces con AcOEt y se lavó con una disolución saturada de NaCl . La fase orgánica, se secó sobre MgSO_4 anhidro, se filtró y eliminó el disolvente a vacío. El residuo fue purificado por CC de gel de sílice, usando como fase móvil $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{acetona}$, 9.5:0.5, obteniéndose 18.0 mg de **48** (R= 91 %) y 0.5 mg de **49** (R= 3%) como sólidos amorfos.

• Preparación del derivado 50 a partir de 1



A una suspensión de 27 mg de NaH (1.1 mmol, 10 eq) en 1 ml de THF a 0 °C, se le añadió 50 mg de withaferina A (1) (0.11 mmol, 1 eq) disueltos en 2 ml de THF. La reacción se dejó agitando a temperatura ambiente y en atmósfera de argón, durante 30 minutos. A continuación se adicionó 100 μ l de bromuro de alilo y se calentó a reflujo (70 °C) durante 48 horas. Pasado éste tiempo, se colocó el balón de reacción en un baño de hielo y se añadió H₂O, se neutralizó con una disolución de HCl al 5% y se extrajo con CHCl₃. Posteriormente, la fase orgánica, se secó sobre MgSO₄ anhidro, se filtró y concentró a vacío. El residuo se purificó por CC (CH₂Cl₂/acetona, 9:1), obteniéndose 10 mg de 50 (R= 18%) como un sólido amorfo.

(22E, 24Z)-5 β ,6 β -Epoxi-4 β ,27-dihidroxi-1-oxo-ergosta-2,22,24-trien-26-oato de alilo (50)

[α]_D²⁵: + 4.0 (c 0.40, CHCl₃).

IR γ_{\max} (película): 3473, 2922, 2853, 1711, 1680, 1453, 1378, 1207, 1113, 967, 962 cm⁻¹.

UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ): 223 (3.9); 260 (3.8) nm.

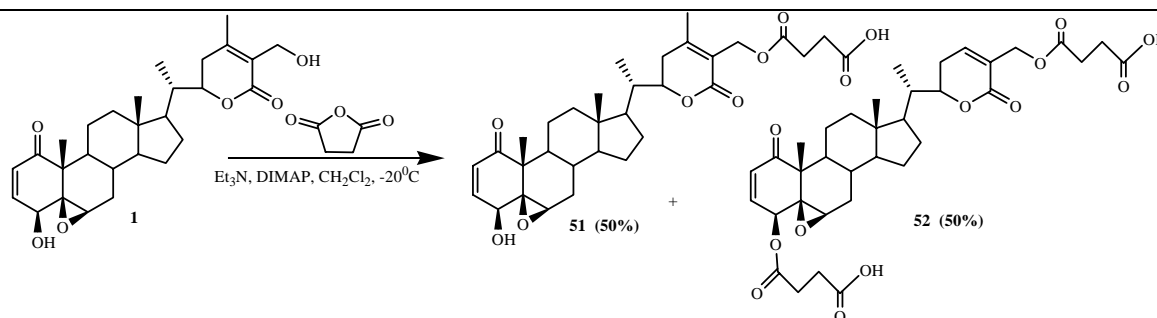
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ : 0.71 (3H, s, Me18); 0.97 (1H, m, H14); 1.03 (1H, m, H9); 1.07 (3H, d, J= 6.5 Hz, Me21); 1.10 (1H, m, H15); 1.15 (1H, m, H12); 1.20 (1H, m, H17); 1.28 (1H, m, H16); 1.30 (1H, m, H7 α); 1.43 (3H, s, Me19); 1.50 (1H, m, H11); 1.53 (1H, m, H8); 1.58 (1H, m, H15); 1.65 (1H, m, H16); 1.83 (1H, m, H11); 1.95 (1H, m, H12); 2.04 (3H, s, Me28); 2.16 (1H, m, H7 β); 2.23 (1H, m, H20); 2.52 (1H, sa, OH-4); 3.25 (1H, sa, H6); 3.78 (1H, d, J= 5.8 Hz, H4); 4.43 (2H, sa, H27); 5.14 (1H, t, J= 6.2 Hz, OH-27); 5.93 (1H, dd, J= 8.9, 15.6 Hz, H22); 6.23 (1H, d, J= 10.0 Hz, H2); 6.95 (1H, dd, J= 5.8, 10.0 Hz, H3); 6.96 (1H, d, J= 15.6 Hz, H23); OAli [4.73 (2H, dt, J= 1.2, 5.7 Hz); 5.29 (1H, dd, J= 1.2, 10.4 Hz); 5.39 (1H, dd, J= 1.2, 17.2 Hz); 6.01 (1H, m)].

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ : 12.0 (c, C18); 15.5 (c, C28); 17.3 (c, C19); 20.0 (c, C21); 22.1 (t, C11); 24.2 (t, C15); 26.4 (t, C16); 29.7 (d, C8); 31.1 (t, C7); 39.3 (t, C12); 40.8 (d, C20); 42.3 (s, C13); 44.1 (d, C9); 47.7 (s, C10); 55.6 (d, C17); 56.4 (d, C14); 60.4 (t, C27); 62.6 (d, C6); 63.9 (s, C5); 70.0 (d, C4); 126.9 (s, C25); 127.2 (d, C23); 132.5 (d, C2); 141.7 (d, C3); 143.6 (d, C22); 145.8 (s, C24); 168.2 (s, C26); 202.2 (s, C1); OAli [65.3 (t); 118.6 (t); 132.1 (d)].

ESIMS m/z (%): 533 [M+Na]⁺ (100).

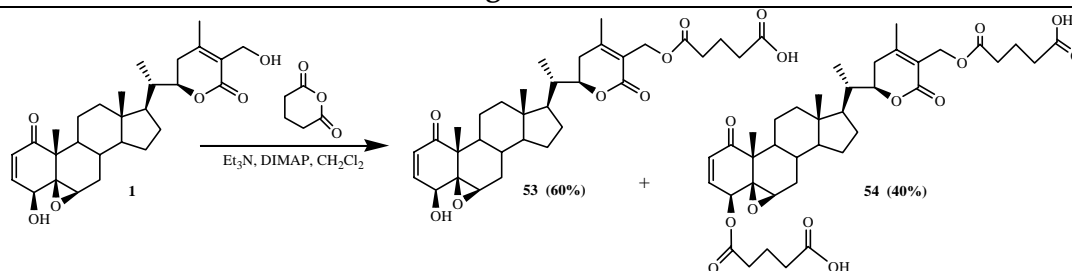
ESI/MS-AR m/z : Observado 533.2881 (calculado para C₃₁H₄₂O₆Na [M+Na]⁺: 533.2879).

- Tratamiento de **1** con anhídrido succínico



A una disolución de 50.0 mg de **1** (0.11 mmoles, 1 eq) en 2 ml de CH_2Cl_2 a -20°C , se le añadió 30 μl de Et_3N (0.16 mmoles, 1.5 eq), una cantidad catalítica de DIMAP y 8 mg de anhídrido succínico (0.16 mmoles, 1.5 eq). La reacción se dejó evolucionar a -20°C y atmósfera de argón durante 7 horas. Transcurrido éste tiempo, se neutralizó con una disolución de HCl al 5% y se extrajo con CHCl_3 . La fase orgánica, se secó sobre MgSO_4 anhidro, se filtró y concentró a vacío. El análisis del espectro de RMN ^1H del crudo de reacción, nos indicó contenía aproximadamente el 50% de cada uno de los derivados. La mezcla se intentó separar tanto por CC, usando como fase móvil un gradiente de polaridad (CH_2Cl_2 /acetona), así como por HPLC en fase reversa, usando como fase móvil H_2O /acetonitrilo. En ningún caso se obtuvieron los productos puros.

• Tratamiento de **1** con anhídrido glutárico



Una disolución de 50.0 mg de **1** (0.11 mmoles, 1 eq) en 2 ml de CH₂Cl₂ a temperatura ambiente, se hizo reaccionar con 30 µl de Et₃N (0.16 mmoles, 1.5 eq), una cantidad catalítica de DIMAP y 20 mg de anhídrido glutárico (0.16 mmoles, 1.5 eq), durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se neutralizó con HCl al 5%, se extrajo con CHCl₃ y secó sobre MgSO₄ anhidro, se filtró y concentró a vacío. El crudo de reacción contenía una mezcla de **53** y **54** en una relación 6:4 aproximadamente, en su espectro de RMN ¹H. La mezcla se intentó separar tanto por CC (CH₂Cl₂/acetona con gradiente de polaridad), como por HPLC en fase reversa usando como fase móvil H₂O/acetronitrilo en gradiente de polaridad, sólo se consiguió separar por éste último método, 1 mg de **53**.

5β,6β-Epoxi-27-O-glutaril-4β-hidroxi-1-oxo-witha-2,24-dienolida (54)

[α]_D²⁵: + 45.5 (c 0.29, CHCl₃)

IR γ_{max} (película): 3520-2560, 3410, 2922, 1735, 1443, 1357, 1265, 1158, 1034, 749 cm⁻¹.

UV (EtOH) λ_{max} (logε): 217 (4.1); 283 (2.9) nm.

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ: 0.71 (3H, s, Me18); 0.90 (1H, m, H9); 0.97 (1H, m, H14); 1.00 (3H, d, J= 6.7 Hz, Me21); 1.10 (1H, m, H12); 1.13 (1H, m, H17); 1.16 (1H, m, H15); 1.28 (1H, m, H7α); 1.39 (1H, m, H16); 1.41 (3H, s, Me19); 1.48 (1H, m, H11); 1.54 (1H, m, H8); 1.65 (1H, m, H15); 1.66 (1H, m, H16); 1.85 (1H, m, H11); 2.03 (1H, m, H12); 2.05 (2H, m, H20, H23α); 2.07 (3H, s, Me28); 2.16 (1H, m, H7β); 2.52 (1H, m, H23β); 3.24 (1H, sa, H6); 3.77 (1H, d, J= 5.7 Hz, H4); 4.41 (1H, dt, J= 3.5, 13.3 Hz, H22); 4.87, 4.92 (2H, d_{AB}, J= 12.2 Hz, H27); 6.20 (1H, d, J= 10.0 Hz, H2); 6.93 (1H, dd, J= 5.7, 10.0 Hz, H3); OGlú [1.96 (2H, t, J= 7.5 Hz); 2.41 (4H, m)].

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ: 11.6 (c, C18); 13.3 (c, C21); 17.5 (c, C19); 20.6 (c, C28); 22.2 (t, C11); 24.3 (t, C15); 27.3 (t, C16); 29.8 (d, C8); 30.1 (t, C23); 31.2 (t, C7); 38.8 (d, C20); 39.3 (t, C12); 42.6 (s, C13); 44.1 (d, C9); 47.7 (s, C10); 52.0 (d, C17); 56.1 (d, C14); 58.1 (t, C27); 62.7 (d, C6); 63.9 (s, C5); 69.9 (d, C4); 78.3 (d, C22); 121.8 (s, C25); 132.3 (d, C2); 141.8 (d, C3); 157.1 (s, C24); 165.4 (s, C26); 202.3 (s, C1); OGlú [19.9 (t); 32.4 (t); 33.0 (t); 172.7 (s); 174.8 (s)].

ESIMS *m/z* (%): 607 [M+Na]⁺ (100).

ESI/MS-AR *m/z*: Observado 607.2886 (calculado para C₃₃H₄₄O₉Na [M+Na]⁺: 607.2883).

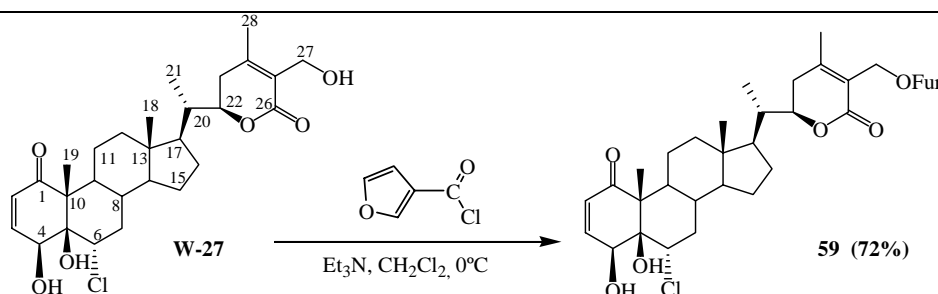
• Acetilación de W-27	
<p>La acetilación de 10.0 mg de W-27 (0.02 mmoles, 1 eq) con 0.1 ml de anhídrido acético (0.1 mmoles, 5 eq) durante 3 horas, se llevó a cabo, siguiendo la metodología para la obtención de 2. Transcurrido éste tiempo, se concentró a vacío y el crudo de reacción se purificó por CPP de gel de sílice (CH₂Cl₂/acetona, 9:1), obteniéndose 2.4 mg de 55 (R= 22%) y 5.1 mg de 56 (R= 45%) como sólidos amorfos.</p>	
27-O-Acetil-6α-cloro-5β-hidroxiwithaferina A (55)	
$[\alpha]_D^{25}$:	+ 29.8 (c 0.24, CHCl ₃).
IR γ_{\max} (película):	3413, 2928, 2851, 1732, 1715, 1457, 1374, 1227, 1028, 755 cm ⁻¹ .
UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ):	216 (3.4); 280 (2.7) nm.
RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) δ :	0.71 (3H, s, Me18); 0.94 (1H, m, H11); 1.00 (3H, d, J= 6.6 Hz, Me21); 1.09 (1H, m, H12); 1.11 (1H, m, H14); 1.14 (1H, m, H17); 1.24 (1H, m, H15); 1.29 (3H, s, Me19); 1.33 (1H, m, H11); 1.34 (1H, m, H9); 1.44 (1H, m, H16); 1.69 (1H, m, H8, H15); 1.70 (1H, m, H7 α); 1.74 (1H, m, H16); 1.95 (1H, m, H12); 2.01 (1H, m, H23 α); 2.03 (1H, m, H20); 2.10 (3H, s, Me28); 2.35 (1H, m, H7 β); 2.53 (1H, m, H23 β); 3.15 (1H, d, J= 12.0 Hz, OH-4); 4.42 (1H, dt, J= 3.1, 12.7 Hz, H22); 4.47 (1H, dd, J= 3.8, 11.7 Hz, H6); 4.89, 4.93 (2H, d _{AB} , J= 12.0 Hz, H27); 5.06 (1H, sa, H4); 6.04 (1H, d, J= 10.6 Hz, H2); 6.50 (1H, d, J= 10.6 Hz, H3); OAc [2.07 (3H, s)].
RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 100 MHz) δ :	9.9 (c, C19); 11.8 (c, C18); 13.3 (c, C21); 20.6 (c, C28); 22.7 (t, C11); 23.9 (t, C15); 27.2 (t, C16); 30.1 (t, C23); 35.1 (d, C8); 38.7 (d, C20); 39.0 (t, C12); 39.4 (t, C7); 43.2 (s, C13); 45.8 (d, C9); 51.8 (d, C17); 55.3 (d, C14); 57.2 (s, C10); 58.0 (t, C27); 66.2 (d, C4); 66.7 (d, C6); 78.1 (s, C5; d, C22); 122.0 (s, C25); 127.8 (d, C2); 142.7 (d, C3); 156.7 (s, C24); 165.1 (s, C26); 200.0 (s, C1); OAc [20.9 (c); 170.9 (s)].
ESIMS m/z (%):	571 [M] ⁺ (100).
ESI/MS-AR m/z :	Observado 571.2435 (calculado para C ₃₀ H ₄₁ O ₇ ClNa [M+Na] ⁺ : 571.2439).

4,27-Di-O-acetil-6α-cloro-5β-hidroxiwithaferina A (56)	
[α]_D²⁵:	+ 48.7 (c 0.43, CHCl ₃).
IR γ_{\max} (película):	3419, 2926, 2855, 1735, 1713, 1455, 1378, 1230, 1026, 751 cm ⁻¹ .
UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ):	216 (3.4); 280 (2.7) nm.
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ:	0.71 (3H, s, Me18); 0.95 (1H, m, H11); 1.00 (3H, d, J= 6.3 Hz, Me21); 1.13 (1H, m, H12); 1.17 (1H, m, H17); 1.22 (1H, m, H14); 1.23 (1H, m, H15); 1.29 (3H, s, Me19); 1.39 (1H, m, H11); 1.41 (2H, m, H9, H16); 1.66 (1H, m, H8); 1.68 (1H, m, H15); 1.70 (1H, m, H7 α); 1.73 (1H, m, H16); 1.95 (1H, m, H12); 2.02 (1H, m, H23 α); 2.03 (1H, m, H20); 2.11 (3H, s, Me28); 2.25 (1H, m, H7 β); 2.53 (1H, m, H23 β); 3.16 (1H, s, OH-5); 4.36 (1H, dd, J= 3.8, 11.7 Hz, H6); 4.42 (1H, dt, J= 3.2, 12.7 Hz, H22); 4.86, 4.91 (2H, d _{AB} , J= 11.9 Hz, H27); 6.07 (1H, d, J= 9.9 Hz, H2); 6.28 (2H, m, H3, H4); OAc-27 [2.07 (3H, s)]; OAc-4 [2.17 (3H, s)].
RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ:	9.5 (c, C19); 11.8 (c, C18); 13.2 (c, C21); 20.6 (c, C28); 22.8 (t, C11); 23.9 (t, C15); 27.2 (t, C16); 30.1 (t, C23); 35.5 (d, C8); 38.4 (t, C7); 38.7 (d, C20); 39.0 (t, C12); 43.2 (s, C13); 45.9 (d, C9); 51.7 (d, C17); 55.0 (d, C14); 57.6 (s, C10); 58.0 (t, C27); 64.0 (d, C6); 67.0 (d, C4); 78.0 (d, C22); 78.6 (s, C5); 121.9 (s, C25); 128.2 (d, C2); 140.7 (d, C3); 156.9 (s, C24); 165.3 (s, C26); 199.1 (s, C1); OAc-4 [20.9 (c); 169.9 (s)]; OAc-27 [21.6 (c); 170.9 (s)].
ESIMS m/z (%):	613 [M+Na] ⁺ (100).
ESI/MS-AR m/z:	Observado 613.2542 (calculado para C ₃₂ H ₄₃ O ₈ Na [M+Na] ⁺ : 613.2544).

• Esterificación de W-27 con cloruro de anisoilo	
<p>La esterificación de 20.0 mg de W-27 (0.04 mmoles, 1 eq) con 20 μl de cloruro de anisoilo (0.12 mmoles, 3 eq) a temperatura ambiente y durante 2.5 horas, se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita para la obtención del derivado 9, rindiendo 10.8 mg de 57 (R= 40%) y 18.7 mg de 58 (R= 55%) como sólidos amorfos.</p>	
27-O-Anisoil-6α-cloro-5β-hidroxiwithaferina A (57)	
$[\alpha]^{25}_D$:	+ 25.7 (c 0.5, CHCl ₃)
IR γ_{max} (película):	3466, 2930, 2868, 1710, 1606, 1256, 1168, 1102, 1031, 756 cm ⁻¹ .
UV (EtOH) λ_{max} (log ϵ):	218 (4.2); 255 (4.1) nm.
RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) δ :	0.70 (3H, s, Me18); 0.92 (1H, m, H12); 1.00 (3H, d, J= 6.6 Hz, Me21); 1.09 (1H, m, H12); 1.11 (1H, m, H14); 1.14 (1H, m, H17); 1.24 (1H, m, H15); 1.28 (3H, s, Me19); 1.32 (1H, m, H9); 1.34 (1H, m, H11); 1.44 (1H, m, H16); 1.65 (1H, m, H8); 1.68 (1H, m, H15); 1.69 (1H, m, H7 α); 1.73 (1H, m, H16); 1.94 (1H, m, H12); 2.02 (1H, m, H20); 2.03 (1H, m, H23 α); 2.15 (3H, s, Me28); 2.34 (1H, m, H7 β); 2.54 (1H, m, H23 β); 4.44 (1H, m, H22); 4.46 (1H, sa, H6); 5.05 (1H, s, H4); 5.13 (2H, sa, H27); 6.03 (1H, d, J= 10.3 Hz, H2); 6.49 (1H, d, J= 10.3 Hz, H3); OAni [3.87 (3H, s, OMe); 6.91 (2H, d, J= 8.6 Hz); 7.99 (2H, d, J= 8.6 Hz)].
RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 100 MHz) δ :	9.7 (c, C19); 11.6 (c, C18); 13.1 (c, C21); 20.5 (c, C28); 22.4 (t, C11); 23.7 (t, C15); 27.0 (t, C16); 29.9 (t, C23); 34.8 (d, C8); 38.5 (d, C20); 38.7 (t, C12); 39.1 (t, C7); 42.9 (s, C13); 45.6 (d, C9); 51.5 (d, C17); 55.1 (d, C14); 57.0 (s, C10); 57.9 (t, C27); 65.9 (d, C4); 66.4 (d, C6); 77.9 (s, C5; d, C22); 122.0 (s, C25); 127.5 (d, C2); 142.6 (d, C3); 156.6 (s, C24); 165.1 (s, C26); 199.9 (s, C1); OAni [55.2 (c); 113.4 (2 x d); 122.1 (s); 131.5 (2 x d); 163.2 (s); 166.0 (s)].
ESIMS m/z (%):	663 [M+Na] ⁺ (100).
ESI/MS-AR m/z :	Observado 663.2705 (calculado para C ₃₆ H ₄₅ O ₈ ClNa [M+Na] ⁺ : 663.2701).

4,27-Di-O-anisoil-6α-cloro-5β-hidroxiwithaferina A (58)	
$[\alpha]_{25}^D$:	+ 27.8 (c 1.87, CHCl ₃).
IR γ_{\max} (película):	3494, 2930, 2868, 1710, 1605, 1512, 1460, 1257, 1168, 755 cm ⁻¹ .
UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ):	224 (4.3); 253 (4.7); 270 (4.3) nm.
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ:	0.71 (3H, s, Me18); 0.95 (1H, m, H11); 1.00 (3H, d, J = 6.7 Hz, H21); 1.09 (2H, m, H12, H14); 1.12 (1H, m, H17); 1.22 (1H, m, H15); 1.28 (3H, s, Me19); 1.33 (1H, m, H9); 1.34 (1H, m, H11); 1.41 (1H, m, H16); 1.67 (2H, m, H8, H15); 1.68 (1H, m, H7 α); 1.73 (1H, m, H16); 1.95 (1H, m, H12); 2.01 (1H, m, H20); 2.02 (1H, m, H23 α); 2.16 (3H, s, Me28); 2.34 (1H, m, H7 β); 2.55 (1H, m, H23 β); 4.43 (1H, dt, J = 3.4, 13.0 Hz, H22); 4.46 (1H, da, J = 3.5 Hz, H6); 5.06 (1H, sa, H4); 5.14 (2H, sa, H27); 6.04 (1H, dd, J = 2.1, 10.4 Hz, H2); 6.49 (1H, dd, J = 2.5, 10.4 Hz, H3); OAni-27 [3.87 (3H, s, OMe); 6.91 (2H, d, J = 8.9 Hz); 8.00 (2H, d, J = 8.9 Hz)]; OAni-4 [3.90 (3H, s, OMe); 6.97 (2H, d, J = 8.9 Hz); 8.08 (2H, d, J = 8.9 Hz)].
RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ:	9.9 (c, C19); 11.8 (c, C18); 13.3 (c, C21); 20.7 (c, C28); 22.7 (t, C11); 23.9 (t, C15); 27.2 (t, C16); 30.2 (t, C23); 35.1 (d, C8); 38.7 (d, C20); 39.0 (t, C12); 39.3 (t, C7); 43.1 (s, C13); 45.8 (d, C9); 51.8 (d, C17); 55.3 (d, C14); 57.2 (s, C10); 58.1 (t, C27); 66.2 (d, C4); 66.7 (d, C6); 78.1 (s, C5; d, C22); 122.3 (s, C25); 127.7 (d, C2); 142.8 (d, C3); 156.7 (s, C24); 165.3 (s, C26); 200.4 (s, C1); OAni-27 [55.4 (c); 113.6 (2 x d); 122.4 (s); 131.8 (2 x d); 163.4 (s) 166.3 (s)]; OAni-4 [55.4 (c); 113.7 (2 x d); 121.6 (s); 132.3 (2 x d); 164.1 (s); 170.9 (s)].
ESIMS m/z (%):	663 [M-Ani+Na] ⁺ (100).
ESI/MS-AR m/z:	Observado 663.2720 (calculado para C ₃₆ H ₄₅ O ₈ ClNa [M-Ani+Na] ⁺ : 663.2701).

• Esterificación de W-27 con cloruro de furoilo



La esterificación de 15.0 mg de **W-27** (0.03 mmoles, 1 eq) con 12 µl de cloruro de furoilo (0.09 mmoles, 3 eq) durante 3 horas, siguiendo la metodología descrita para la obtención del derivado **4**, rindió el producto **59** (13.0 mg, R= 72%) como un sólido amorfo.

6α-Cloro-27-O-furoilo-5β-hidroxiwithaferina A (59)

[α]²⁵_D: + 30.1 (c 0.58, CHCl₃)

IR γ_{max} (película): 3478, 2926, 2865, 1710, 1468, 1380, 1294, 1179, 1116, 757, 669 cm⁻¹.

UV (EtOH) λ_{max} (log ε): 215 (4.2); 252 (3.9).

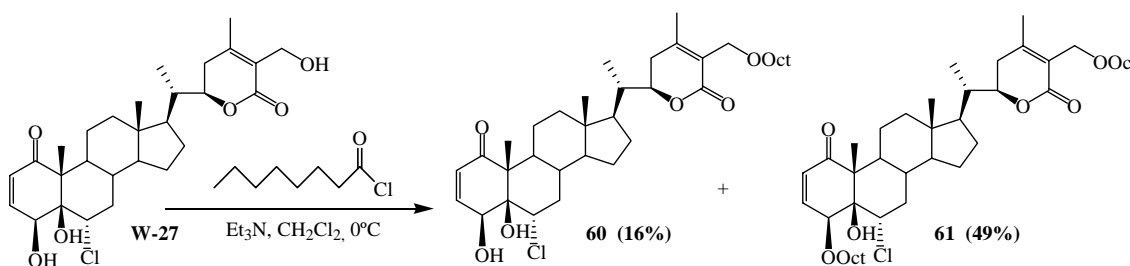
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ: 0.71 (3H, s, Me18); 0.92 (1H, m, H11); 1.00 (3H, d, J= 6.6 Hz, Me21); 1.09 (1H, m, H12); 1.10 (1H, m, H14); 1.12 (1H, m, H17); 1.22 (1H, m, H15); 1.28 (3H, s, Me19); 1.31 (1H, m, H9); 1.32 (1H, m, H11); 1.42 (1H, m, H16); 1.65 (1H, m, H8); 1.67 (1H, m, H7α); 1.68 (1H, m, H15); 1.71 (1H, m, H16); 1.94 (1H, m, H12); 2.02 (2H, m, H20, H23α); 2.16 (3H, s, Me28); 2.34 (1H, m, H7β); 2.55 (1H, m, H23β); 3.18 (1H, sa, OH); 3.75 (1H, sa, OH); 4.42 (1H, dt, J= 3.3, 13.1 Hz, H22); 4.46 (1H, sa, H6); 5.06 (1H, sa, H4); 5.13, 5.16 (2H, d_{AB}, J= 12.7 Hz, H27); 6.04 (1H, dd, J= 1.7, 10.3 Hz, H2); 6.50 (1H, dd, J= 2.1, 10.3 Hz, H3); OFur [6.51 (1H, d, J= 3.4 Hz); 7.20 (1H, d, J= 3.4 Hz); 7.59 (1H, s)].

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ: 9.7 (c, C19); 11.6 (c, C18); 13.1 (c, C21); 20.6 (c, C28); 22.5 (t, C11); 23.8 (t, C15); 27.1 (t, C16); 30.0 (t, C23); 34.9 (d, C8); 38.5 (d, C20); 38.9 (t, C12); 39.2 (t, C7); 43.0 (s, C13); 45.7 (d, C9); 51.6 (d, C17); 55.1 (d, C14); 57.0 (s, C10); 58.1 (t, C27); 66.0 (d, C4); 66.6 (d, C6); 77.9 (s, C5; d, C22); 121.5 (s, C25); 127.5 (d, C2); 142.6 (d, C3); 157.3 (s, C24); 165.0 (s, C26); 199.8 (s, C1); OFur [111.6 (d); 118.1 (d); 144.1 (s); 146.5 (d); 158.4 (s)].

ESIMS m/z (%): 623 [M+Na]⁺ (100).

ESI/MS-AR m/z: Observado 623.2397 (calculado para C₃₃H₄₁O₈ClNa [M+Na]⁺: 623.2388).

• Esterificación de W-27 con cloruro de octanoilo



La esterificación de 10 mg de **W-27** (0.02 mmoles, 1 eq) con 10 μl de cloruro de octanoilo (0.07 mmoles, 3.1 eq) durante 4.0 horas, se llevó a cabo según la metodología seguida para la obtención del derivado **4**. Transcurrido el tiempo de reacción, el crudo se concentró a vacío y se purificó por CPP de gel de sílice (CH_2Cl_2 /acetona, 9:1), obteniéndose los productos **60** (2.0 mg, R= 16%) y **61** (8.1 mg, R= 49%), como sólidos amorfos.

6 α -Cloro-5 β -hidroxi-27-O-octanoilwithaferina A (60)

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$: + 24.9 (c 0.20, CHCl_3)

IR γ_{max} (película): 3478, 2926, 2865, 1710, 1468, 1380, 1294, 1179, 1116, 757, 669 cm^{-1} .

UV (EtOH) λ_{max} (log ϵ): 215 (4.2).

RMN ^1H (CDCl₃, 400 MHz) δ : 0.68 (3H, s, Me18); 0.92 (1H, m, H11); 0.97 (3H, d, J = 6.3 Hz, Me21); 1.07 (1H, m, H12); 1.09 (1H, m, H14); 1.10 (1H, m, H17); 1.21 (1H, m, H15); 1.27 (3H, s, Me19); 1.30 (1H, m, H9); 1.35 (1H, m, H11); 1.41 (1H, m, H16); 1.66 (2H, m, H8, H15); 1.67 (1H, m, H7 α); 1.71 (1H, m, H16); 1.93 (1H, m, H12); 1.99 (1H, m, H23 α); 2.00 (1H, m, H20); 2.08 (3H, s, Me28); 2.32 (1H, m, H7 β); 2.50 (1H, m, H23 β); 3.13 (1H, sa, OH); 3.73 (1H, sa, OH); 4.41 (1H, dt, J = 3.3, 13.1 Hz, H22); 4.43 (1H, m, H6); 4.88 (2H, sa, H27); 5.04 (1H, sa, H4); 6.02 (1H, d, J = 10.1 Hz, H2); 6.48 (1H, d, J = 10.1 Hz, H3); OOct [0.88 (3H, m); 1.25 (2H, m); 1.28 (2H, m); 1.29 (4H, m); 1.61 (2H, m); 2.30 (2H, t, J = 7.4 Hz)].

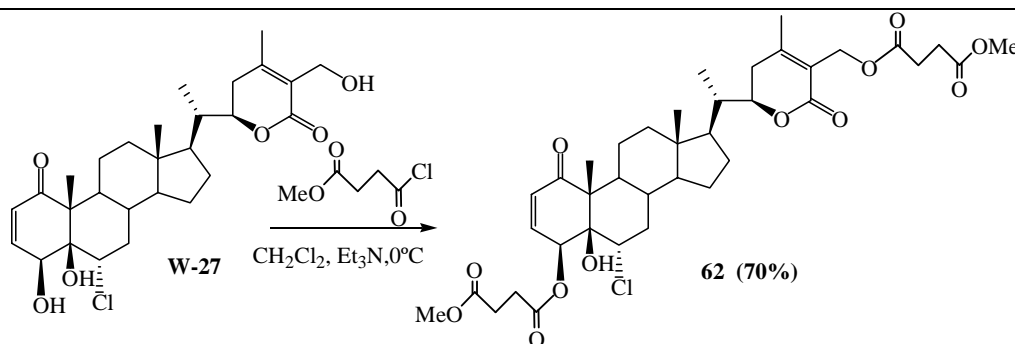
RMN ^{13}C (CDCl₃, 100 MHz) δ : 10.0 (c, C19); 11.8 (c, C18); 13.3 (c, C21); 20.6 (c, C28); 22.7 (t, C11); 24.0 (t, C15); 27.3 (t, C16); 30.1 (t, C23); 35.1 (d, C8); 38.7 (d, C20); 39.0 (t, C12); 39.4 (t, C7); 43.2 (s, C13); 45.9 (d, C9); 51.8 (d, C17); 55.3 (d, C14); 57.2 (s, C10); 57.8 (t, C27); 66.2 (d, C4); 66.8 (d, C6); 78.1 (s, C5; d, C22); 122.1 (s, C25); 127.8 (d, C2); 142.7 (d, C3); 156.6 (s, C24); 165.2 (s, C26); 200.1 (s, C1); OOct [14.1 (c); 22.6 (t); 25.0 (t); 28.9 (t); 29.1 (t); 31.7 (t); 34.2 (t); 173.8 (s)].

ESIMS m/z (%): 655 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (100).

ESI/MS-AR m/z : Observado 655.3392 (calculado para $\text{C}_{36}\text{H}_{53}\text{O}_7\text{ClNa}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 655.3378).

6α-Cloro-5β-hidroxi-4,27-di-O-octanoilwithaferina A (61)	
[α]²⁵_D:	+ 61.9 (c 0.53, CHCl ₃).
IR γ_{\max} (película):	3410, 2931, 2860, 1739, 1464, 1382, 1254, 1164, 1112, 964 cm ⁻¹ .
UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ):	218 (4.1) nm.
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ:	0.71 (3H, s, Me18); 0.98 (1H, m, H11); 1.00 (3H, d, J= 6.7 Hz, Me21); 1.11 (1H, m, H12); 1.14 (1H, m, H17); 1.20 (1H, m, H14); 1.21 (1H, m, H15); 1.30 (3H, s, Me19); 1.39 (1H, m, H11); 1.40 (2H, m, H9, H16); 1.66 (1H, m, H8); 1.67 (1H, m, H15); 1.72 (1H, m, H16); 1.78 (1H, m, H7 β); 1.95 (1H, m, H12); 2.02 (1H, m, H20); 2.03 (1H, m, H23 α); 2.11 (3H, s, Me28); 2.24 (1H, m, H7 β); 2.53 (1H, m, H23 β); 4.36 (1H, dd, J= 4.2, 12.5 Hz, H6); 4.42 (1H, dt, J= 3.2, 13.3 Hz, H22); 4.89, 4.93 (2H, d _{AB} , J= 12.0 Hz, H27); 6.09 (1H, d, J= 8.8 Hz, H2); 6.29 (1H, s, H4); 6.30 (1H, d, J= 8.8 Hz, H3); OOct-27 [0.90 (3H, m); 1.28 (2H, m); 1.30 (6H, m); 1.62 (2H, m); 2.32 (2H, t, J= 7.5 Hz)]; OOct-4 [0.90 (3H, m); 1.28 (2H, m); 1.30 (6H, m); 1.68 (2H, m); 2.41 (2H, m)].
RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ:	9.5 (c, C19); 11.7 (c, C18); 13.3 (c, C21); 20.5 (c, C28); 22.5 (t, C11); 24.1 (t, C15); 27.2 (t, C16); 30.1 (t, C23); 35.4 (d, C8); 38.4 (t, C7); 38.6 (d, C20); 38.9 (t, C12); 43.2 (s, C13); 45.8 (d, C9); 51.7 (d, C17); 54.9 (d, C14); 57.5 (s, C10); 57.7 (t, C27); 63.8 (d, C6); 66.7 (d, C4); 78.1 (d, C22); 78.5 (s, C5); 121.9 (s, C25); 127.9 (d, C2); 140.7 (d, C3); 156.6 (s, C24); 165.1 (s, C26); 199.2 (s, C1); OOct-27 [14.0 (c); 22.5 (t); 24.8 (t); 29.0 (2 x t); 31.7 (t); 34.1 (t); 173.8 (s)]; OOct-4 [14.0 (c); 22.5 (t); 24.8 (t); 29.0 (2 x t); 31.7 (t); 34.6 (t); 172.6 (s)].
ESIMS m/z (%):	781 [M+Na] ⁺ (100).
ESI/MS-AR m/z:	Observado 781.4434 (calculado para C ₄₄ H ₆₇ O ₈ ClNa [M+Na] ⁺ : 781.4422).

• Esterificación de W-27 con 4-cloro-4-oxo-butirato de metilo



La esterificación de 10.0 mg de **W-27** (0.02 mmoles, 1 eq) con 10 μ l de cloruro de 4-O-metilsuccinato (0.08 mmoles, 4.0 eq) durante 5.0 horas, se llevó a cabo, siguiendo la metodología usada para la obtención del derivado **4**. El crudo de reacción se purificó por CPP de gel de sílice (CH₂Cl₂/acetona, 9.5:0.5), obteniéndose el producto **62** (8.1 mg, R=70%) como un sólido amorfo.

4,27-Di-O-[4-O-metilsuccinatoil]-6 α -cloro-5 β -hidroxi-1-oxo-witha-2,24-dienolida (62)

[α]²⁵_D: + 41.3 (*c* 0.29, CHCl₃)

IR γ_{\max} (película): 3516, 2934, 2851, 1735, 1680, 1437, 1367, 1156, 994, 772, 629 cm⁻¹.

UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ): 215 (4.0); 283 (2.9) nm.

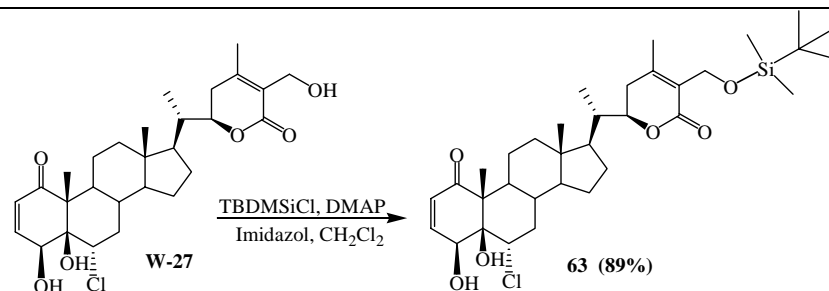
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ : 0.71 (3H, s, Me18); 0.92 (1H, m, H11); 1.00 (3H, d, *J*= 6.7 Hz, Me21); 1.10 (1H, m, H12); 1.13 (1H, m, H17); 1.20 (1H, m, H14); 1.21 (1H, m, H15); 1.29 (3H, s, Me19); 1.34 (1H, m, H11); 1.39 (1H, m, H9); 1.41 (1H, m, H16); 1.66 (1H, m, H8); 1.67 (1H, m, H15); 1.71 (1H, m, H16); 1.76 (1H, m, H7 α); 1.95 (1H, m, H12); 2.01 (1H, m, H20); 2.03 (1H, m, H23 α); 2.11 (3H, s, Me28); 2.22 (1H, m, H7 β); 2.53 (1H, m, H23 β); 4.36 (1H, dd, *J*= 4.5, 9.2 Hz, H6); 4.43 (1H, dt, *J*= 3.5, 12.9 Hz, H22); 4.92, 4.96 (2H, d_{AB}, *J*= 12.1 Hz, H27); 6.10 (1H, d, *J*= 9.2 Hz, H2); 6.31 (1H, sa, H4); 6.33 (1H, d, *J*= 9.2 Hz, H3); OMSuc-4 [2.64-2.71 (4H, m); 3.71 (3H, s, OMe)]; OMSuc-27 [2.64-2.71 (4H, m); 3.73 (3H, s, OMe)].

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ : 9.4 (c, C19); 11.6 (c, C18); 13.0 (c, C21); 20.4 (c, C28); 22.6 (t, C11); 23.7 (t, C15); 27.1 (t, C16); 29.9 (t, C23); 35.1 (d, C8); 38.4 (t, C7); 38.8 (d, C20); 38.9 (t, C12); 43.6 (s, C13); 45.7 (d, C9); 51.7 (d, C17); 54.9 (d, C14); 57.7 (s, C10); 58.1 (t, C27); 63.9 (d, C6); 67.2 (d, C4); 78.2 (s, C5; d, C22); 121.8 (s, C25); 128.1 (d, C2); 140.3 (d, C3); 157.1 (s, C24); 165.1 (s, C26); 199.4 (s, C1); OMSuc-4 [27.4 (t); 28.5 (t); 51.9 (c); 171.4 (s); 172.4 (s)]; OMSuc-27 [28.6 (t); 28.8 (t); 51.7 (c); 172.0 (s); 172.8 (s)].

ESIMS *m/z* (%): 757 [M+Na]⁺ (100).

ESI/MS-AR *m/z*: Observado 757.2971 (calculado para C₃₈H₅₁O₁₂ClNa [M+Na]⁺: 757.2967).

• Preparación del *tert*-butil-di-metilsilil éter de W-27



A una disolución de 14.0 mg de **W-27** (0.03 mmoles, 1 eq) en 2 ml de CH₂Cl₂ seco, se le añadió 2 mg de imidazol (0.03 mmoles, 1 eq), 4 mg de DIMAP (0.03 mmoles, 1 eq) y 7 mg de cloruro de *tert*-butil-di-metilsilicio (0.045 mmoles, 1.5 eq). La reacción se agitó durante 2.5 horas, a temperatura ambiente y bajo atmósfera de N₂. Transcurrido éste tiempo se paró la reacción con 2 ml de H₂O, se extrajo 3 veces con CH₂Cl₂ y secó sobre MgSO₄ anhidro, se filtró y eliminó el disolvente a vacío. El residuo se purificó por CC, usando como fase móvil CH₂Cl₂/acetona, 9:1, obteniéndose 16 mg de **63** (R= 89%) como un sólido amorfo.

6 α -Cloro-4 β ,5 β -dihidroxi-1-oxo-27-O-*tert*-butildimetilsilil-witha-2,24-dienolida (63)

[α]²⁵_D: + 45.0 (c 0.41, CHCl₃)

IR γ_{max} (película): 3748, 3503, 2929, 2856, 1697, 1685, 1461, 1397, 1254, 1067, 839 cm⁻¹.

UV (EtOH) λ_{max} (log ϵ): 215 (4.2) nm.

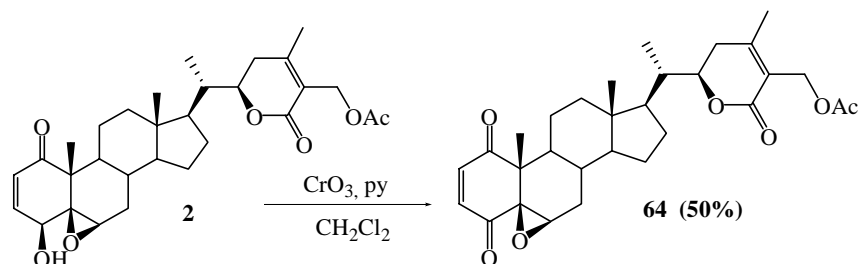
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ : 0.67 (3H, s, Me18); 0.95 (3H, d, J= 6.6 Hz, Me21); 1.00 (1H, m, H11); 1.08 (1H, m, H12); 1.10 (1H, m, H17); 1.12 (1H, m, H14); 1.21 (1H, m, H15); 1.25 (3H, s, Me19); 1.30 (1H, m, H9); 1.32 (1H, m, H11); 1.34 (1H, m, H16); 1.66 (2H, m, H8, H15); 1.68 (2H, m, H7 α , H16); 1.92 (1H, m, H12); 1.94 (1H, m, H23 α); 1.96 (1H, m, H20); 2.05 (3H, s, Me28); 2.30 (1H, m, H7 β); 2.43 (1H, m, H23 β); 3.19 (1H, sa, OH); 3.75 (1H, sa, H6); 4.42 (1H, m, H22); 4.36, 4.47 (2H, d_{AB}, J= 11.6 Hz, H27); 5.03 (1H, sa, H4); 6.00 (1H, dd, J= 1.9, 10.3 Hz, H2); 6.47 (1H, dd, J= 2.4, 10.3 Hz, H3); OTBDMSi [0.08 (6H, s); 0.88 (9H, s)].

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ : 9.7 (c, C19); 11.6 (c, C18); 13.1 (c, C21); 20.3 (c, C28); 22.4 (t, C11); 23.7 (t, C15); 27.0 (t, C16); 29.8 (t, C23); 34.8 (d, C8); 38.5 (d, C20); 38.7 (t, C7); 39.1 (t, C12); 42.9 (s, C13); 45.6 (d, C9); 51.6 (d, C17); 55.1 (d, C14); 56.8 (t, C27); 57.0 (s, C10); 65.9 (d, C6); 66.4 (d, C4); 77.8 (d, C22); 77.9 (s, C5); 125.8 (s, C25); 127.5 (d, C2); 142.6 (d, C3); 154.2 (s, C24); 165.5 (s, C26); 199.9 (s, C1); OTBDMSi [-5.5 (2 x c); 18.1 (s); 25.7 (3 x c)].

EM (FAB) m/z (%): 621 [M+1]⁺ (22), 563(9), 523(9), 469 (1), 413 (4), 391 (18), 322 (6), 307 (9), 285 (36), 227 (3), 197 (11), 154 (100), 136 (86), 107 (29).

FAB/MS-AR- m/z : Observado 621.3428 (calculado para C₃₄H₅₄O₆SiCl [M+1]⁺: 621.3378).

• Oxidación del derivado 2



A una disolución de 20.0 mg de **2** (0.04 mmoles) en 1.5 ml de CH_2Cl_2 seco, se le adicionó 2 ml de una mezcla de 250 mg de CrO_3 (2.5 mmoles), en 0.4 ml de piridina y 6 ml de CH_2Cl_2 . Tras 6 horas bajo agitación y atmósfera de N_2 , el crudo de reacción se filtró sobre celita y eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo se purificó por CPP de gel de sílice (CH_2Cl_2 /acetona, 9:1), obteniéndose 10 mg de **64** (R= 50%) como un sólido amorfo.

27-O-Acetil-4-deoxi-4-oxowithaferina A (64)

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$: + 106.4 (c 0.78, CHCl_3)

IR γ_{max} (película): 2928, 1701, 1540, 1458, 1397, 1256, 1066, 838, 756 cm^{-1} .

UV (EtOH) λ_{max} (log ϵ): 223 (4.2) nm.

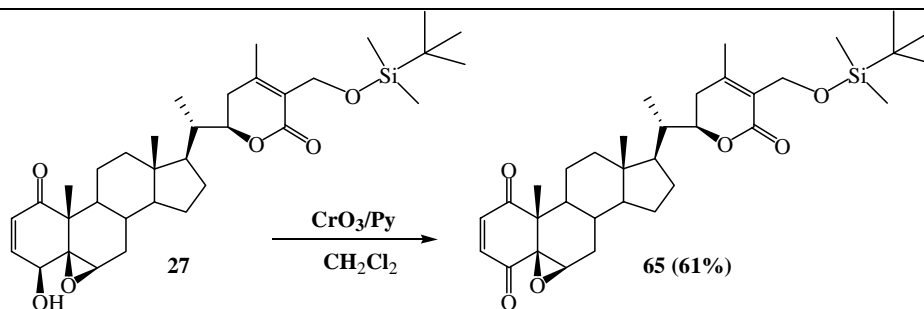
RMN ^1H (CDCl₃, 400 MHz) δ : 0.71 (3H, s, Me18); 1.01 (3H, d, J = 6.6 Hz, Me21); 1.03 (1H, m, H14); 1.09 (1H, m, H17); 1.16 (1H, m, H15); 1.24 (1H, m, H12); 1.38 (3H, s, Me19); 1.40 (2H, m, H9, H16); 1.44 (1H, m, H7 α); 1.45 (1H, m, H11); 1.62 (1H, m, H8); 1.66 (1H, m, H15); 1.70 (1H, m, H16); 1.74 (1H, m, H11); 2.00 (1H, m, H12); 2.01 (1H, m, H23 α); 2.03 (1H, m, H20); 2.07 (3H, s, Me28); 2.15 (1H, m, H7 β); 2.53 (1H, m, H23 β); 3.43 (1H, d, J = 2.0 Hz, H6); 4.41 (1H, dt, J = 3.3, 13.1 Hz, H22); 4.85, 4.90 (2H, d_{AB}, J = 12.1 Hz, H27); 6.86 (2H, s, H2, H3); OAc [2.05 (3H, s)].

RMN ^{13}C (CDCl₃, 100 MHz) δ : 11.5 (c, C18); 13.1 (c, C21); 19.0 (c, C19); 20.4 (c, C28); 23.2 (t, C11); 24.0 (t, C15); 27.0 (t, C16); 29.4 (d, C8); 29.8 (t, C23); 30.3 (t, C7); 38.5 (d, C20); 39.2 (t, C12); 42.4 (s, C13); 43.4 (d, C9); 49.6 (s, C10); 51.8 (d, C17); 55.3 (d, C14); 57.8 (t, C27); 63.3 (d, C6); 63.7 (s, C5); 77.9 (d, C22); 121.7 (s, C25); 138.9 (d, C2); 141.4 (d, C3); 156.7 (s, C24); 165.1 (s, C26); 193.6 (s, C4); 201.9 (s, C1); OAc [20.7 (c); 170.7 (s)].

ESIMS m/z (%): 533 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (100).

ESI/MS-AR m/z : Observado 533.2509 (calculado para $\text{C}_{30}\text{H}_{38}\text{O}_7\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 533.2515).

• Oxidación del derivado 27



A una disolución de 20.0 mg de **27** (0.034 mmoles) en 1.5 ml de CH_2Cl_2 seco, se le adicionó 2 ml de una mezcla de 250 mg de CrO_3 (2.5 mmoles), en 0.4 ml de piridina y 6 ml de CH_2Cl_2 . La mezcla se dejó en agitación durante 6 horas bajo atmósfera de N_2 . Posteriormente, se filtró sobre celita y eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo se purificó por CPP de gel de sílice (CH_2Cl_2 /acetona, 9:1), obteniéndose 12 mg de **65** (R= 61%) como un sólido amorfo.

27-O-tert-Butildimetilsilil-4-deoxi-4-oxowithaferina A (65)

$[\alpha]_D^{25}$: + 61.2 (c 0.49, CHCl_3)

IR γ_{max} (película): 2929, 1699, 1652, 1459, 1398, 1258, 1064, 839 cm^{-1} .

UV (EtOH) λ_{max} (log ϵ): 222 (4.4) nm.

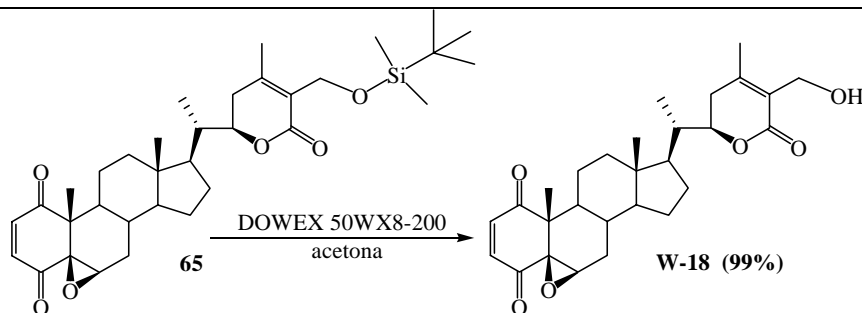
RMN ^1H (CDCl₃, 400 MHz) δ : 0.71 (3H, s, Me18); 1.00 (3H, d, J = 6.6 Hz, Me21); 1.02 (1H, m, H14); 1.09 (1H, m, H17); 1.17 (1H, m, H15); 1.23 (1H, m, H12); 1.35 (1H, m, H7 α); 1.37 (3H, s, Me19); 1.39 (1H, m, H16); 1.45 (1H, m, H11); 1.46 (1H, m, H9); 1.62 (1H, m, H8); 1.65 (1H, m, H15); 1.69 (1H, m, H16); 1.97 (1H, m, H12); 2.00 (1H, m, H23 α); 2.01 (1H, m, H11); 2.04 (1H, m, H20); 2.06 (3H, s, Me28); 2.15 (1H, m, H7 β); 2.47 (1H, m, H23 β); 3.42 (1H, sa, H6); 4.38 (1H, m, H22); 4.39, 4.50 (2H, d_{AB}, J = 11.5 Hz, H27); 6.83 (1H, d, J = 10.5 Hz, H2); 6.87 (1H, d, J = 10.5 Hz, H3); OTBDMSi [0.08 (6H, s); 0.88 (9H, s)].

RMN ^{13}C (CDCl₃, 100 MHz) δ : 11.5 (c, C18); 13.1 (c, C21); 19.0 (c, C19); 20.3 (c, C28); 23.2 (t, C11); 24.0 (t, C15); 26.9 (t, C16); 29.4 (d, C8); 29.8 (t, C23); 30.3 (t, C7); 38.5 (d, C20); 39.2 (t, C12); 42.4 (s, C13); 43.4 (d, C9); 49.6 (s, C10); 51.9 (d, C17); 55.4 (d, C14); 56.9 (t, C27); 63.3 (d, C6); 63.7 (s, C5); 77.9 (d, C22); 125.8 (s, C25); 138.9 (d, C2); 141.4 (d, C3); 154.2 (s, C24); 165.6 (s, C26); 193.8 (s, C4); 201.9 (s, C1); OTBDMSi [-5.5 (2 x c); 18.1 (s); 25.7 (3 x c)].

EM (IE) m/z (%): 582 [M^+] (1), 525(100), 509(33), 311 (1), 297 (4), 281 (3), 253 (3), 227 (33), 197 (16), 171 (7), 151 (15), 95 (13), 75 (48).

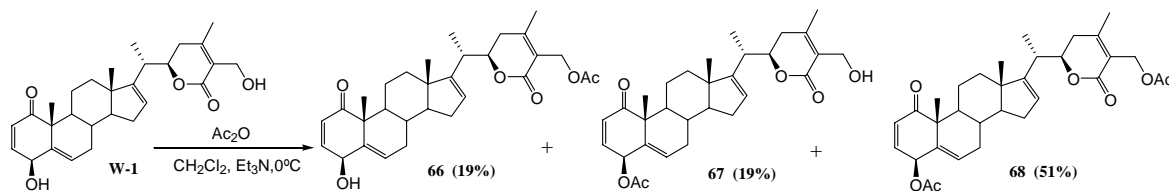
EMAR m/z : Observado 582.3383 (calculado para $\text{C}_{34}\text{H}_{50}\text{O}_6\text{Si}$ [M^+]: 582.3377).

- Desprotección del *tert*-butil-di-metilsilil eter en **65**



A una suspensión de 150.0 mg de Dowex (50WX8-200) en 5 ml de acetona seca, se le añadió 23 mg de **65** (0.04 mmoles, 1 eq) disueltos en 3 ml de acetona, via cánula. La reacción se agitó durante 24 horas, a temperatura ambiente y bajo atmósfera de N₂. Transcurrido éste tiempo, la mezcla de reacción se filtró, eliminó el disolvente a vacío y purificó por CPP de gel de sílice (CH₂Cl₂/acetona, 9.5:0.5), obteniéndose 22 mg (R= 99%) de un producto cuyos datos espectroscópicos fueron coincidentes con los del producto natural **W-18**, aislado en esta Memoria de Tesis.

• Preparación de derivados para dicroísmo circular. Acetilación de W-1



A una disolución de 10.0 mg de **W-1** (0.022 mmoles, 1 eq) en 2 ml de CH₂Cl₂ seco a temperatura ambiente, se le añadió 10 µl de Et₃N (0.08 mmoles, 3.8 eq) y 0.05 ml de anhídrido acético (0.04 mmoles, 2 eq). La reacción se agitó durante 2.5 horas bajo atmósfera de nitrógeno. Transcurrido éste tiempo, se eliminó el disolvente a vacío y la mezcla de reacción se purificó por CC, usando como fase móvil un gradiente de CH₂Cl₂/acetona (10:0 a 8:2), obteniéndose 2 mg de **66** (R= 19%), 2 mg de **67** (R= 19%) y 6 mg de **68** (R= 51%), como sólidos amorfos.

(4S,20R,22R)-27-O-Acetil-4-hidroxi-1-oxo-witha-2,5,16,24-tetraenolida (66)

[α]_D²⁵: + 80.0 (c 0.20, CHCl₃)

IR γ_{max} (película): 3673, 2929, 1701, 1540, 1458, 1397, 1258, 1066, 838 cm⁻¹.

UV (EtOH) λ_{max} (log ε): 227 (3.9) nm.

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ: δ 0.87 (3H, s, Me18); 1.15 (3H, d, J = 7.0 Hz, Me21); 1.46 (1H, m, H14); 1.50 (3H, s, Me19); 1.52 (1H, m, H12); 1.56 (1H, m, H11); 1.67 (1H, m, H9); 1.70 (1H, m, H7α); 1.73 (1H, m, H12); 1.75 (1H, m, H15); 1.84 (1H, m, H8); 2.10 (3H, s, Me28); 2.16 (1H, m, H15); 2.17 (1H, m, H7β); 2.18 (1H, m, H11); 2.26 (1H, m, H23α); 2.58 (1H, m, H20); 2.60 (1H, m, H23β); 4.48 (1H, d, J = 11.2 Hz, H22); 4.67 (1H, s, H4); 4.89, 4.94 (2H, d_{AB}, J = 12.3 Hz, H27); 5.57 (1H, s, H16); 5.98 (1H, d, J = 10.2 Hz, H2); 5.99 (1H, s, H6); 6.79 (1H, dd, J = 4.2, 10.2 Hz, H3); OAc [2.08 (3H, s)].

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ: 16.4 (c, C18); 16.8 (c, C21); 20.5 (c, C28); 22.7 (c, C19); 22.9 (t, C11); 30.7 (t, C15); 31.3 (d, C8); 31.3 (t, C7); 33.1 (t, C23); 34.6 (t, C12); 35.8 (d, C20); 43.5 (d, C9); 46.9 (s, C13); 49.5 (s, C10); 57.2 (d, C14); 58.0 (t, C27); 69.5 (d, C4); 78.6 (d, C22); 121.9 (s, C25); 124.5 (d, C16); 129.1 (d, C2); 130.9 (d, C6); 139.1 (s, C5); 142.6 (d, C3); 155.5 (s, C17); 156.7 (s, C24); 165.0 (s, C26); 203.3 (s, C1); OAc [22.8 (c); 170.9 (s)].

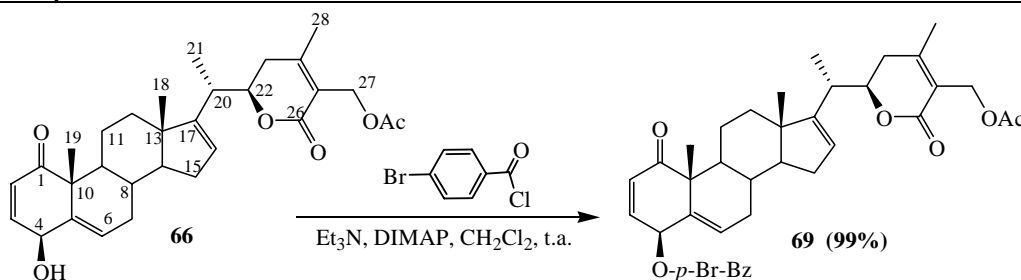
EM (IE) m/z (%): 476 [M-18]⁺ (18), 416 (13), 401 (17), 293 (50), 249 (19), 209 (7), 183 (22), 172 (22), 123 (100), 95 (40).

EMAR m/z: Observado 476.2578 (calculado para C₃₀H₃₆O₅ [M-18]⁺: 476.2563).

(4S,20R,22R)-4-O-Acetil-27-hidroxi-1-oxo-witha-2,5,16,24-tetraenolida (67)	
[α]²⁵_D:	+ 80.0 (c 0.20, CHCl ₃).
IR γ_{\max} (película):	3673, 2929, 1701, 1540, 1458, 1397, 1258, 1066, 838 cm ⁻¹ .
UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ):	220 (4.1) nm.
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ:	0.87 (3H, s, Me18); 1.15 (3H, d, J = 7.1 Hz, Me21); 1.48 (1H, m, H14); 1.44 (3H, s, Me19); 1.55 (1H, m, H12); 1.63 (1H, m, H11); 1.69 (1H, m, H9); 1.71 (1H, m, H15); 1.72 (1H, m, H8); 1.77 (1H, m, H12); 1.93 (1H, m, H7 α); 2.06 (3H, s, Me28); 2.15 (1H, m, H7 β); 2.16 (1H, m, H15); 2.19 (1H, m, H23 α); 2.27 (1H, m, H11); 2.57 (1H, m, H23 β); 2.58 (1H, m, H20); 4.48 (1H, d, J = 11.9 Hz, H22); 4.39, 4.42 (2H, d _{AB} , J = 12.3 Hz, H27); 5.56 (1H, sa, H16); 5.81 (1H, d, J = 4.7 Hz, H4); 6.05 (1H, d, J = 10.0 Hz, H2); 6.13 (1H, d, J = 3.7 Hz, H6); 6.73 (1H, dd, J = 4.7, 10.0 Hz, H3); OAc [2.11 (3H, s)].
RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ:	16.4 (c, C18); 16.7 (c, C21); 19.9 (c, C28); 21.8 (c, C19); 22.8 (t, C11); 30.7 (t, C15); 31.0 (d, C8); 31.3 (t, C7); 32.7 (t, C23); 34.6 (t, C12); 35.8 (d, C20); 43.6 (d, C9); 46.9 (s, C13); 49.3 (s, C10); 57.2 (d, C14); 57.6 (t, C27); 70.2 (d, C4); 79.1 (d, C22); 124.5 (d, C16); 125.7 (s, C25); 131.0 (d, C2); 133.9 (d, C6); 134.5 (s, C5); 139.8 (d, C3); 152.6 (s, C24); 155.5 (s, C17); 166.5 (s, C26); 203.0 (s, C1); OAc [21.4 (c); 170.6 (s)].
EM (IE) m/z (%):	476 [M ⁺ -18] (22), 416 (13), 401 (20), 293 (54), 249 (23), 209 (12), 183 (25), 172 (27), 123 (100), 95 (45).
EMAR m/z:	Observado 476.2578 (calculado para C ₃₀ H ₃₆ O ₅ [M-18] ⁺ : 476.2563).

(4S,20R,22R)-4,27-Di-O-acetil-1-oxo-witha-2,5,16,24-tetraenolida (68)	
[α]_D²⁵:	+ 22.4 (c 0.26, CHCl ₃).
IR γ_{\max} (película):	2926, 2856, 1737, 1514, 1462, 1379, 1235, 1152, 1027, 962 cm ⁻¹ .
UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ):	229 (3.9) nm.
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ:	0.87 (3H, s, Me18); 1.15 (3H, d, J = 7.0 Hz, Me21); 1.44 (3H, s, Me19); 1.47 (1H, m, H14); 1.55 (1H, m, H12); 1.62 (1H, m, H11); 1.70 (1H, m, H9); 1.71 (1H, m, H15); 1.72 (1H, m, H8); 1.76 (1H, m, H12); 1.94 (1H, m, H7 α); 2.09 (3H, s, Me28); 2.15 (1H, m, H15); 2.17 (1H, m, H7 β); 2.21 (1H, m, H23 α); 2.27 (1H, m, H11); 2.56 (1H, m, H20); 2.59 (1H, m, H23 β); 4.47 (1H, da, J = 11.2 Hz, H22); 4.94, 4.89 (2H, d _{AB} , J = 11.8 Hz, H27); 5.56 (1H, sa, H16); 5.81 (1H, d, J = 4.6 Hz, H4); 6.04 (1H, d, J = 10.0 Hz, H2); 6.13 (1H, d, J = 5.0 Hz, H6); 6.72 (1H, dd, J = 4.6, 10.0 Hz, H3); OAc-4 [2.10 (3H, s)]; OAc-27 [2.08 (3H, s)].
RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ:	16.2 (c, C18); 16.5 (c, C21); 20.4 (c, C28); 21.8 (c, C19); 22.8 (t, C11); 30.7 (t, C15); 31.0 (d, C8); 31.2 (t, C7); 33.0 (t, C23); 34.6 (t, C12); 35.8 (d, C20); 43.5 (d, C9); 46.9 (s, C13); 49.3 (s, C10); 57.1 (d, C14); 58.0 (t, C27); 70.2 (d, C4); 78.8 (d, C22); 121.9 (s, C25); 124.5 (d, C16); 130.9 (d, C2); 133.9 (d, C5); 134.6 (s, C6); 139.8 (d, C3); 155.5 (s, C17); 156.6 (s, C24); 165.0 (s, C26); 203.0 (s, C1); OAc-27 [21.8 (c); 170.9 (s)]; OAc-4 [21.7 (c); 170.2 (s)].
EM (IE) m/z (%):	536 [M ⁺] (1), 476 (17), 416 (13), 401 (24), 327 (7), 293 (47), 249 (19), 197 (5), 171 (38), 159 (17), 123 (100), 95 (41).
EMAR m/z:	Observado 536.2750 (calculado para C ₃₂ H ₄₀ O ₇ [M ⁺]: 476.2774).

- Preparación de derivados para dicroísmo circular. Esterificación de 66 con cloruro de *p*-bromo benzoilo



A una disolución de 2.0 mg de **66** (0.004 mmoles, 1 eq) en 0.5 ml de CH₂Cl₂ seco, se le añadió 0.05 ml de Et₃N y una cantidad catalítica de DIMAP a temperatura ambiente y en atmósfera de nitrógeno. Posteriormente, se añadió 4 mg de cloruro de *p*-bromo benzoilo (0.018 mmoles, 4.5 eq) y se agitó durante 24 horas. Tras eliminar el disolvente a vacío, el crudo de reacción se purificó por CPP usando como fase móvil CH₂Cl₂/acetona (94:6) obteniéndose el derivado **69** (2.7 mg, R= 99%) como un sólido amorfo.

(4*S*,20*R*,22*R*)-27-*O*-Acetil-4-*O*-(*p*-bromobenzoil)-1-oxo-witha-2,5,16,24-tetraenolida (**69**)

[α]_D²⁵: + 118.2 (c 0.22, CHCl₃).

IR γ_{max} (película): 2926, 2856, 1717, 1590, 1457, 1379, 1264, 1096, 1013, 848, 755 cm⁻¹.

UV (EtOH) λ_{max} (log ε): 320 (2.7); 243 (4.3) nm.

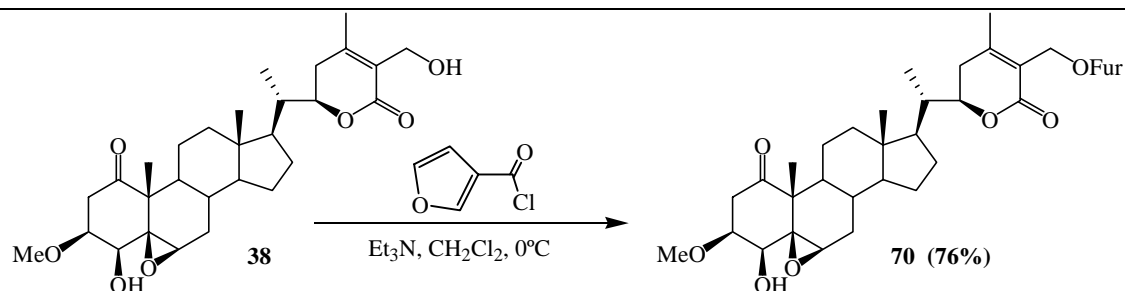
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ: 0.86 (3H, s, Me18); 1.15 (3H, d, *J* = 6.9 Hz, Me21); 1.49 (1H, m, H14); 1.55 (3H, s, Me19); 1.57 (1H, m, H12); 1.67 (1H, m, H11); 1.72 (1H, m, H8); 1.75 (1H, m, H9); 1.78 (1H, m, H15); 1.79 (1H, m, H12); 1.93 (1H, m, H7α); 2.09 (3H, s, Me28); 2.14 (1H, m, H7β); 2.19 (1H, m, H15); 2.23 (1H, m, H23α); 2.33 (1H, m, H11); 2.58 (1H, m, H20); 2.60 (1H, m, H23β); 4.47 (1H, d, *J* = 11.6 Hz, H22); 4.93, 4.89 (2H, d_{AB}, *J* = 12.3 Hz, H27); 5.56 (1H, sa, H16); 6.07 (1H, d, *J* = 4.8 Hz, H4); 6.11 (1H, d, *J* = 9.8 Hz, H2); 6.24 (1H, d, *J* = 5.0 Hz, H6); 6.83 (1H, dd, *J* = 4.8, 9.8 Hz, H3); OAc-27 [2.08 (3H, s)]; *O**p*-Br-Bz [7.61 (2H, d, *J* = 8.3 Hz); 7.90 (2H, d, *J* = 8.3 Hz)].

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ: 16.4 (c, C18); 16.8 (c, C21); 20.5 (c, C28); 22.0 (c, C19); 22.9 (t, C11); 30.8 (t, C15); 31.1 (d, C8); 31.3 (t, C7); 33.1 (t, C23); 34.6 (t, C12); 35.8 (d, C20); 43.6 (d, C9); 46.9 (s, C13); 49.4 (s, C10); 57.0 (d, C14); 58.0 (t, C27); 70.9 (d, C4); 78.5 (d, C22); 121.9 (s, C25); 124.5 (d, C16); 131.3 (d, C2); 134.4 (d, C5); 134.5 (s, C6); 139.5 (d, C3); 155.5 (s, C17); 156.6 (s, C24); 165.0 (s, C26); 202.9 (s, C1); OAc-27 [20.5 (c); 170.9 (s)]; *O**p*-Br-Bz-4 [128.4 (s); 128.9 (s); 131.2 (2 x d); 131.8 (2 x d); 165.1 (s)].

ESIMS *m/z* (%): 701.1914 [M+Na]⁺.

ESI/MS-AR *m/z*: Observado 701.1914 (calculado para C₃₇H₄₁O₇NaBr [M+Na]⁺: 701.1913).

• Esterificación del derivado 38 con cloruro de furoilo



La esterificación de 15.0 mg de **38** (0.032 mmoles, 1 eq) con 8 μl de cloruro de furoilo (0.077 mmoles, 2.5 eq) durante 3 horas, se llevó a cabo, siguiendo la metodología propuesta para la obtención de **4**, rindiendo el producto **70** (14.1 mg, R= 76%) como un sólido amorfo.

27-O-Furoil-3 β -metoxi-2,3-dihidrowithaferina A (70)

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$: + 66.0 (c 0.43, CHCl_3)

IR γ_{max} (película): 3438, 2927, 2857, 1715, 1465, 1400, 1296, 1121, 1040, 761 cm^{-1} .

UV (EtOH) λ_{max} (log ϵ): 214 (3.8); 250 (3.5); 291 (2.9) nm.

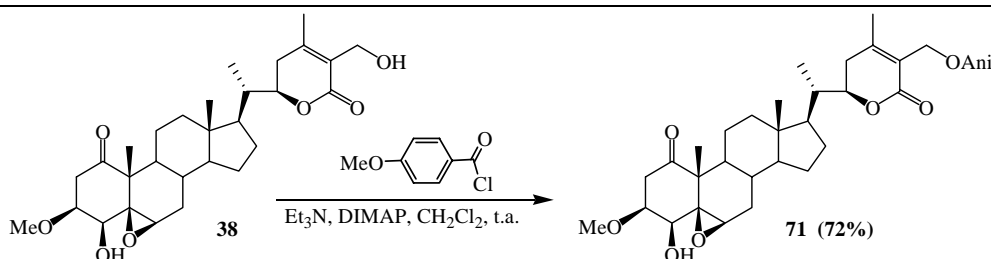
RMN ^1H (CDCl₃, 400 MHz) δ : 0.69 (3H, s, Me18); 1.01 (1H, m, H14); 1.02 (3H, d, J = 6.6 Hz, Me21); 1.12 (1H, m, H17); 1.15 (1H, m, H12); 1.19 (1H, m, H15); 1.24 (1H, m, H9); 1.33 (3H, s, Me19); 1.35 (1H, m, H7 α); 1.41 (1H, m, H16); 1.43 (1H, m, H11); 1.44 (1H, m, H8); 1.65 (1H, m, H15); 1.70 (1H, m, H16); 1.93 (1H, m, H12); 2.02 (1H, m, H20); 2.05 (1H, m, H23 α); 2.16 (3H, s, Me28); 2.18 (1H, m, H7 β); 2.56 (1H, m, H23 β); 2.65 (1H, dd, J = 4.2, 14.9 Hz, H2 α); 3.05 (1H, dd, J = 6.2, 14.9 Hz, H2 β); 3.25 (1H, sa, H6); 3.38 (3H, s, OMe); 3.52 (1H, d, J = 3.2 Hz, H4); 3.74 (1H, ddd, J = 3.2, 4.2, 6.2 Hz, H3); 4.45 (1H, dt, J = 3.5, 13.1 Hz, H22); 5.13, 5.16 (2H, d_{AB}, J = 12.7 Hz, H27); OFur [6.51 (1H, d, J = 3.4 Hz); 7.21 (1H, d, J = 3.4 Hz); 7.59 (1H, s)].

RMN ^{13}C (CDCl₃, 100 MHz) δ : 11.3 (c, C18); 13.1 (c, C21); 15.6 (c, C19); 20.6 (c, C28); 21.4 (t, C11); 24.0 (t, C15); 27.1 (t, C16); 29.1 (d, C8); 29.9 (t, C23); 30.9 (t, C7); 38.5 (d, C20); 38.9 (t, C12); 39.3 (t, C2); 42.4 (s, C13); 42.5 (d, C9); 50.2 (s, C10); 51.7 (d, C17); 55.8 (d, C14); 56.6 (c, OMe); 58.1 (t, C27); 60.3 (d, C6); 64.7 (s, C5); 74.9 (d, C4); 77.0 (d, C3); 78.0 (d, C22); 121.4 (s, C25); 157.5 (s, C24); 165.1 (s, C26); 209.7 (s, C1); OFur [111.6 (d); 118.1 (d); 144.1 (s); 146.2 (d); 158.4 (s)].

ESIMS m/z (%): 619 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (100).

ESI/MS-AR m/z : Observado 619.2887 (calculado para $\text{C}_{34}\text{H}_{44}\text{O}_9\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 619.2883).

• Esterificación de 38 con cloruro de anisoilo



La esterificación de 10.0 mg de **38** (0.02 mmoles, 1 eq) con 10 μ l de cloruro de anisoilo (0.065 mmoles, 3.3 eq) durante 4 horas y a temperatura ambiente, se llevó a cabo, siguiendo la metodología propuesta para la obtención de **9**. Transcurrido este tiempo, se eliminó el disolvente y el residuo se purificó por CPP, usando como fase móvil CH_2Cl_2 /acetona, 8:2, obteniéndose 9.2 mg de **71** (R= 72%).

27-O-Anisoil-3 β -metoxi-2,3-dihidrowithaferina A (71)

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$: + 3.6 (c 0.6, CHCl_3)

IR γ_{max} (película): 3405, 2928, 1715, 1610, 1516, 1463, 1261, 1171, 1105, 1031, 760 cm^{-1} .

UV (EtOH) λ_{max} (log ϵ): 215 (4.1); 250 (3.9) nm.

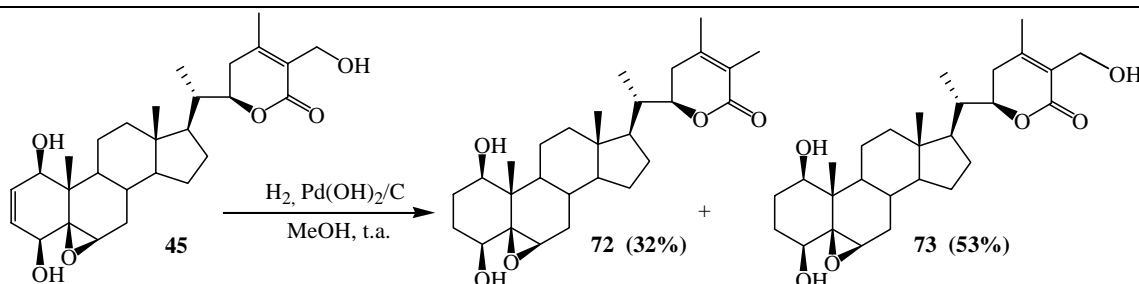
RMN ^1H (CDCl₃, 400 MHz) δ : 0.69 (3H, s, Me18); 1.02 (3H, d, J = 6.4 Hz, H21); 1.04 (1H, m, H14); 1.15 (2H, m, H15, H17); 1.17 (1H, m, H12); 1.26 (1H, m, H9); 1.33 (3H, s, Me19); 1.38 (1H, m, H16); 1.39 (1H, m, H7 α); 1.43 (2H, m, H11); 1.46 (1H, m, H8); 1.61 (1H, m, H15); 1.67 (1H, m, H16); 1.93 (1H, m, H12); 2.04 (1H, m, H20); 2.06 (1H, m, H23 α); 2.16 (3H, s, Me28); 2.21 (1H, m, H7 β); 2.57 (1H, m, H23 β); 2.64 (1H, dd, J = 4.3, 14.9 Hz, H2 α); 3.05 (1H, dd, J = 6.0, 14.9 Hz, H2 β); 3.24 (1H, sa, H6); 3.37 (3H, s, OMe); 3.51 (1H, d, J = 2.6 Hz, H4); 3.73 (1H, m, H3); 4.44 (1H, dt, J = 3.3, 13.1 Hz, H22); 5.14 (2H, sa, H27); OAni [3.87 (3H, s, OMe); 6.91 (2H, d, J = 8.6 Hz); 7.99 (2H, d, J = 8.6 Hz)].

RMN ^{13}C (CDCl₃, 100 MHz) δ : 11.3 (c, C18); 13.1 (c, C21); 15.6 (c, C19); 20.5 (c, C28); 21.4 (t, C11); 24.0 (t, C15); 27.1 (t, C16); 29.1 (d, C8); 29.9 (t, C23); 30.9 (t, C7); 38.5 (d, C20); 38.9 (t, C12); 39.2 (t, C2); 42.4 (s, C13); 42.5 (d, C9); 50.2 (s, C10); 51.7 (d, C17); 55.8 (d, C14); 56.6 (c, OMe); 57.9 (t, C27); 60.3 (d, C6); 64.7 (s, C5); 75.0 (d, C4); 77.3 (d, C3); 78.0 (d, C22); 121.9 (s, C25); 156.8 (s, C24); 165.1 (s, C26); 209.6 (s, C1); OAni [55.2 (c); 113.3 (2 x d); 122.2 (s); 131.6 (2 x d); 163.2 (s); 166.0 (s)].

EM (IE) m/z (%): 636 [M]⁺ (1), 604 (2), 586 (13), 452 (9), 416 (7), 389 (21), 329 (24), 311 (25), 283 (7), 239 (23), 183 (25), 161 (19), 124 (100), 95 (80).

EMAR m/z : Observado 636.3341 (calculado para C₃₇H₄₈O₉ [M]⁺: 636.3298).

• Hidrogenación con Pd(OH)₂ de 45.



A una disolución de 10.0 mg de **45** (0.02 mmoles, 1 eq) en 1 ml de MeOH, se le adicionó 5 mg de Pd(OH)₂/C (50% en peso) bajo atmósfera de argón (se pasa una corriente de argón durante 10 minutos). Posteriormente, se mantuvo la agitación bajo atmósfera de hidrógeno (1 atm) durante 1 hora. Pasado este tiempo, la mezcla se filtró sobre celita y eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo resultante se purificó por CPP, usando como fase móvil CH₂Cl₂:acetona (9:1), obteniéndose 2.9 mg de **72** (R= 32%) y 5.0 mg de **73** (R= 53%) como sólidos amorfos.

5β,6β-Epoxi-1β,4β-dihidroxi-witha-24-enolida (72)

[α]_D²⁵: + 22.6 (c 0.27, CHCl₃).

IR γ_{max} (película): 3519, 2924, 2854, 1731, 1703, 1456, 1380, 1285, 1130, 762 cm⁻¹.

UV (EtOH) λ_{max} (log ε): 220 (3.7) nm.

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ: 0.72 (3H, s, Me18); 0.79 (1H, m, H9); 0.94 (1H, m, H14); 1.02 (3H, d, J= 6.6 Hz, Me21); 1.11 (1H, m, H17); 1.14 (1H, m, H12); 1.17 (1H, m, H15); 1.22 (3H, s, Me19); 1.24 (1H, m, H7α); 1.37 (1H, m, H16); 1.46 (1H, m, H11); 1.51 (1H, m, H8); 1.64 (1H, m, H15); 1.66 (1H, m, H2α); 1.69 (1H, m, H16); 1.70 (1H, m, H11); 1.88 (1H, m, H3α); 1.91 (3H, s, Me27); 1.93 (1H, m, H23α); 1.97 (2H, m, H12); 1.98 (2H, m, H2β, H3β); 1.99 (3H, s, Me28); 2.00 (1H, m, H20); 2.19 (1H, m, H7β); 2.46 (1H, m, H23β); 3.05 (1H, sa, H6); 3.31 (1H, d, J= 5.5 Hz, H4); 3.76 (1H, dd, J= 1.8, 6.4 Hz, H1); 4.39 (1H, dt, J= 3.4, 13.3 Hz, H22).

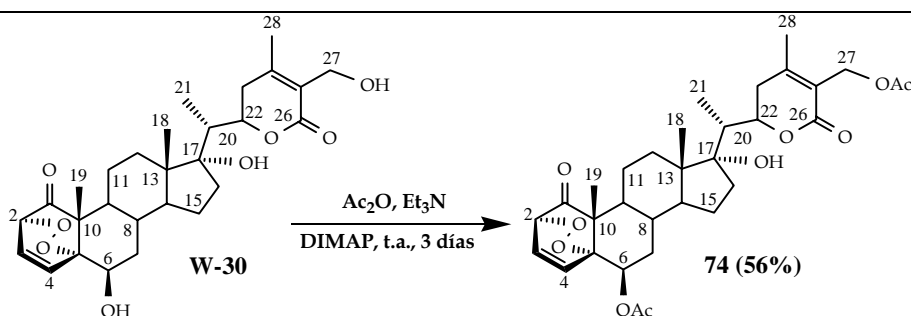
RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ: 11.8 (c, C18); 12.5 (c, C27); 13.4 (c, C21); 14.5 (c, C19); 20.6 (c, C28); 22.3 (t, C11); 24.2 (t, C2); 24.3 (t, C15); 26.3 (t, C3); 27.3 (t, C16); 29.6 (d, C8); 29.8 (t, C23); 31.5 (t, C7); 38.8 (d, C20); 39.7 (t, C12); 41.3 (s, C10); 42.6 (s, C13); 47.4 (d, C9); 52.1 (d, C17); 56.3 (d, C14); 60.9 (d, C6); 64.9 (s, C5); 75.2 (2 x d, C1, C4); 78.3 (d, C22); 122.0 (s, C25); 149.0 (s, C24); 167.1 (s, C26).

ESIMS *m/z* (%): 481 [M+Na]⁺ (100).

ESI/MS-AR *m/z*: Observado 481.2934 (calculado para C₂₈H₄₂O₅Na [M+Na]⁺: 481.2930).

5β,6β-Epoxi-1β,4β,27-trihidroxi-witha-24-enolida (73)	
[α]²⁵_D:	+ 29.7 (c 0.50, CHCl ₃).
IR γ_{\max} (película):	3399, 2927, 2858, 1693, 1464, 1394, 1291, 1001, 915, 754 cm ⁻¹ .
UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ):	224 (3.7) nm.
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ:	0.72 (3H, s, Me18); 0.80 (1H, m, H9); 0.95 (1H, m, H14); 1.02 (3H, d, J= 6.6 Hz, Me18); 1.12 (1H, m, H17); 1.15 (1H, m, H12); 1.19 (1H, m, H15); 1.21 (3H, s, Me19); 1.25 (1H, m, H7 α); 1.38 (1H, m, H16); 1.47 (1H, m, H11); 1.52 (1H, m, H8); 1.65 (1H, m, H15); 1.66 (1H, m, H2 α); 1.68 (1H, m, H16); 1.70 (1H, m, H11); 1.89 (1H, m, H3 α); 1.98 (2H, m, H2 β , H3 β); 1.99 (1H, m, H12); 2.01 (1H, m, H23 α); 2.03 (1H, m, H20); 2.06 (3H, s, Me28); 2.15 (1H, m, H7 β); 2.52 (1H, m, H23 β); 3.04 (1H, sa, H6); 3.28 (1H, d, J= 5.3 Hz, H4); 3.74 (1H, dd, J= 2.4, 6.6 Hz, H1); 4.36, 4.41 (2H, d _{AB} , J= 12.5 Hz, H27); 4.45 (1H, dt, J= 3.4, 13.3 Hz, H22).
RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ:	11.7 (c, C18); 13.3 (c, C21); 14.3 (c, C19); 20.0 (c, C28); 22.3 (t, C11); 24.2 (t, C15); 24.9 (t, C2); 26.3 (t, C3); 27.3 (t, C16); 29.7 (d, C8); 29.8 (t, C23); 31.4 (t, C7); 38.8 (d, C20); 39.7 (t, C12); 41.3 (s, C10); 42.6 (s, C13); 47.6 (d, C9); 52.1 (d, C17); 56.3 (d, C14); 57.5 (c, C27); 60.9 (d, C6); 64.9 (s, C5); 75.1 (d, C4); 75.4 (d, C1); 78.7 (d, C22); 125.7 (s, C25); 152.7 (s, C24); 167.0 (s, C26).
ESIMS m/z (%):	497 [M+Na] ⁺ (100).
ESI/MS-AR m/z:	Observado 497.2877 (calculado para C ₂₈ H ₄₂ O ₆ Na [M+Na] ⁺ : 497.2879).

• Preparación del derivado acetilado de W-30



A una disolución de 7.0 mg de **W-1** (0.014 mmoles, 1 eq) en 2 ml de CH_2Cl_2 seco a temperatura ambiente, se le añadió 100 μl de Et_3N (0.8 mmoles, 57 eq) y 0.15 ml de anhídrido acético (0.12 mmoles, 6 eq). La reacción se agitó durante 3 días bajo atmósfera de nitrógeno. Transcurrido éste tiempo, se eliminó el disolvente a vacío y la mezcla de reacción se purificó por CC, usando como fase móvil un gradiente de CH_2Cl_2 /acetona (10:0 a 8:2), obteniéndose 4.5 mg de **74** (R= 56%) como un sólido amorfo.

6 β ,27-Diacetoxi-17 α -hidroxi-2 α ,5 α -dioxan-1-oxo-witha-3,24-dienolida (74)

$[\alpha]_D^{25}$: + 56.0 (c 0.20, CHCl_3)

IR γ_{max} (película): 3669, 2925, 1697, 1537, 1454, 1393, 1255, 1063, 834 cm^{-1} .

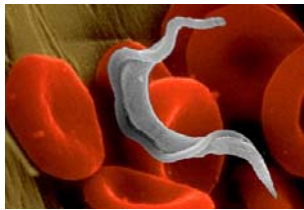
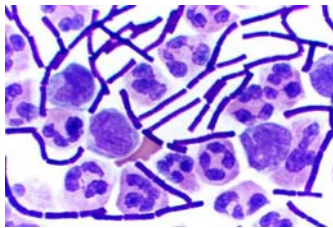
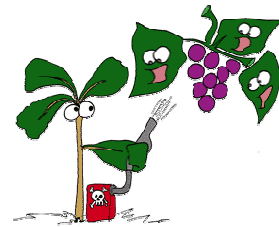
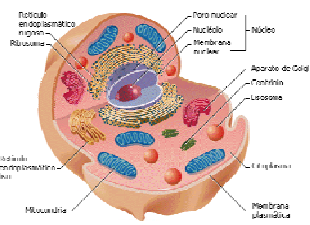
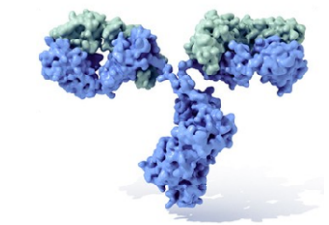
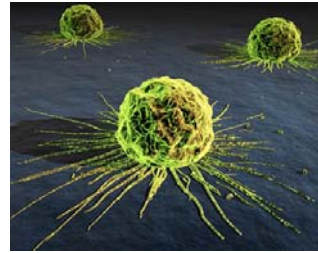
UV (EtOH) λ_{max} (log ϵ): 223 (3.8) nm.

RMN ^1H (CDCl₃, 400 MHz) δ : 0.88 (3H, s, Me18); 1.05 (3H, d, J = 6.9 Hz, Me21); 1.14 (3H, s, Me19); 1.21 (1H, m, H15); 1.39 (1H, m, H12); 1.52 (1H, m, H11); 1.63 (1H, m, H12); 1.61 (1H, m, H16); 1.68 (1H, m, H8); 1.69 (1H, m, H11); 1.71 (1H, m, H14); 1.72 (1H, m, H7 α); 1.73 (1H, m, H16); 1.76 (1H, m, H15); 1.98 (2H, m, H9); 2.00 (1H, m, H7 β); 2.09 (3H, s, Me28); 2.36 (1H, m, H20); 2.59 (2H, d, J = 7.8 Hz, H23); 4.54 (1H, d, J = 6.2 Hz, H2); 4.68 (1H, dt, J = 3.0, 8.8 Hz, H22); 4.89, 4.93 (2H, d_{AB}, J = 11.8 Hz, H27); 5.38 (1H, sa, H6); 6.62 (1H, t, J = 8.5 Hz, H3); 7.00 (1H, d, J = 8.5 Hz, H4); OAc-27 [2.09 (3H, s)]; OAc-6 [2.16(3H, s)].

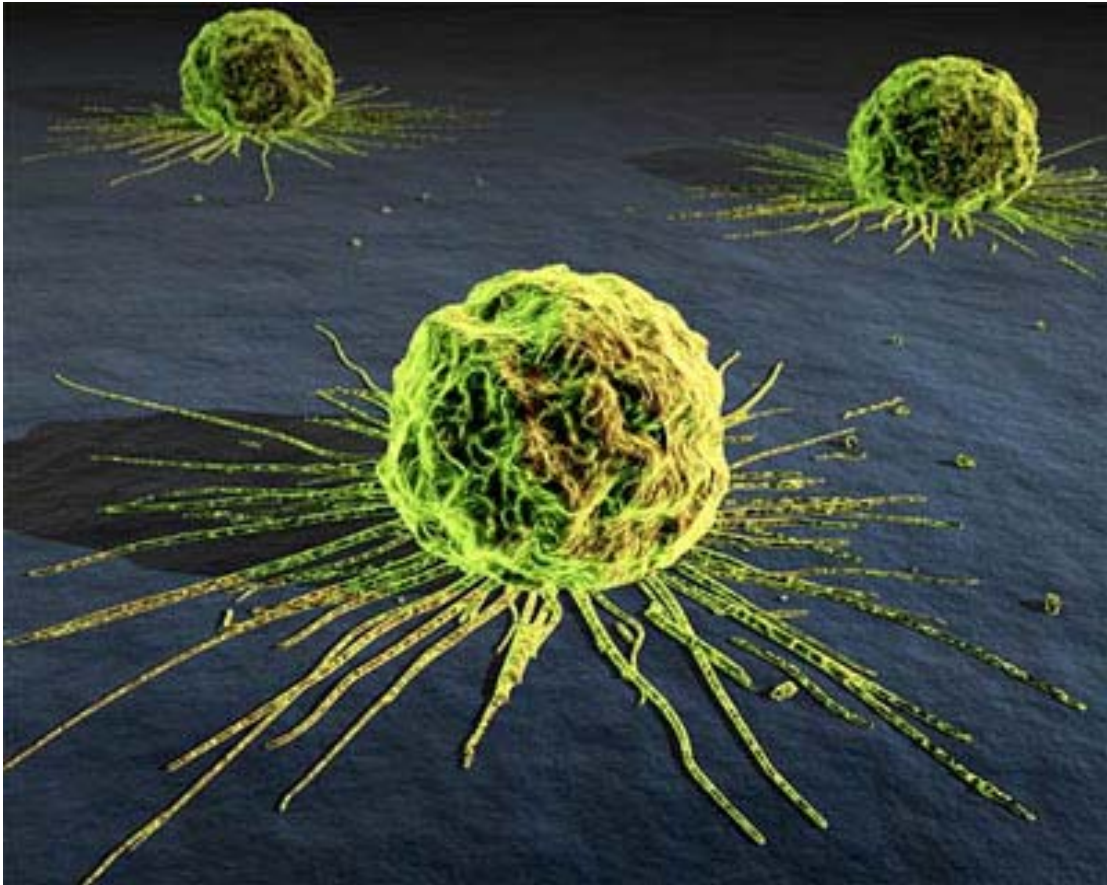
RMN ^{13}C (CDCl₃, 100 MHz) δ : 9.4 (c, C21); 15.0 (c, C18); 18.0 (c, C19); 20.6 (c, C28); 21.8 (t, C11); 23.6 (t, C15); 29.8 (d, C8); 32.0 (t, C12); 33.1 (t, C23); 34.9 (t, C16); 36.5 (t, C7); 42.6 (d, C20); 43.5 (d, C9); 47.1 (s, C10); 48.3 (s, C13); 49.1 (d, C14); 58.0 (t, C27); 68.8 (d, C6); 78.7 (d, C2); 79.1 (d, C22); 85.0 (s, C5); 85.9 (s, C17); 121.3 (s, C25); 130.9 (d, C3); 142.9 (d, C4); 158.6 (s, C24); 165.5 (s, C26); 205.4 (s, C1); OAc-6 [20.8 (c); 169.6 (s)]; OAc-27 [21.0 (c); 171.0 (s)].

ESIMS m/z (%): 609 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (100).

ESI/MS-AR m/z : Observado 609.2679 (calculado para $\text{C}_{32}\text{H}_{42}\text{O}_{10}\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 609.2676).



6. Actividades biológicas



6.1. Actividad citotóxica

6.1. Actividad citotóxica

6.1.1. Introducción

El cáncer engloba a un complejo y heterogéneo grupo de patologías de origen multigénico y multifactorial¹, en las que las células proliferan descontroladamente e invaden y dañan los tejidos vecinos. Esto se produce al eliminar las restricciones que limitan la división celular en células y tejidos ya diferenciados. El cáncer no es causado por un único factor, sino por una combinación de varios factores que se engloban en dos grupos: la herencia y el ambiente.

Según datos de la Organización Mundial de la Salud², el cáncer es la segunda causa de mortalidad en los países desarrollados. Once millones de personas en todo el mundo son diagnosticadas de algún tipo de cáncer al año, de las que siete millones fallecen por esta causa, lo que representa el 12,5% de todas las muertes anuales en el planeta.

Por otra parte, la prevención del cáncer está siendo ampliamente estudiada con la finalidad de desarrollar estrategias para su control, siendo definida la prevención como el método mediante el cual se administra compuestos naturales o sintéticos capaces de detener o inhibir el inicio del proceso carcinogénico. De este modo, la quimioprevención se presenta como una solución prometedora, siendo de particular interés la búsqueda de inhibidores de la promoción de tumores en procesos carcinogénicos³.

Existen dos grupos de agentes quimioterapéuticos: los que actúan sobre el ADN celular, como los inhibidores o antimetabolitos de la síntesis del ADN que disparan la apoptosis y los que, por el contrario, no dañan el ADN sino que actúan sobre componentes citoplasmáticos como el citoesqueleto y los microtúbulos, estructuras esenciales para la división celular.

La quimioterapia se basa fundamentalmente en el uso de fármacos con actividad antiproliferativa, siendo los compuestos más utilizados hoy día los que

¹ Manoharan, S.; Singh, R. B.; Balakrishnan, S. *Open Nutraceuticals Journal*. **2009**, 2, 52.

² <http://www.who.int/cancer/en/>.

³ Aggarwal, B. B.; Danda, D.; Gupta, S.; Gehlot, P. *Biochem. Pharmacol.* **2009**, 78, 1083.

pertenecen al grupo de los citotóxicos. La mayoría de cánceres carecen de una única diana vital y específica que los haga sensibles a un fármaco en particular sin atacar también a las células sanas. Por ello, la especificidad de la quimioterapia contra el cáncer sólo puede conseguirse limitadamente, explotando las sutiles diferencias existentes entre las células cancerosas y las normales⁴.

Los tratamientos contra el cáncer basados en la combinación de fármacos, con diferentes dianas celulares y mecanismos de acción farmacológica, incrementan la especificidad de acción y la efectividad de la quimioterapia. Ya en la década de los 60, el uso combinado de fármacos citotóxicos demostró ser mucho más efectivo, tanto para el tratamiento de cánceres metastásicos como para evitar la reaparición de tumores en pacientes a los que se les ha extirpado un tumor.

En los últimos años se ha producido una revolución en el tratamiento del cáncer, la terapia de diana específica (*targeted-therapy*). Este nuevo enfoque ha surgido debido a los estudios de biología celular y molecular de los tumores, que ha permitido identificar nuevas dianas de acción citotóxica en células cancerosas con potencial interés terapéutico⁵. Las nuevas dianas identificadas son en su mayoría elementos pertenecientes a las redes de señalización intracelular encargadas del control de la proliferación, supervivencia y muerte celular, que están alteradas en las células tumorales.

Además del problema de la especificidad y efectividad de la quimioterapia, está la multirresistencia a fármacos, unos de los principales inconvenientes que limita el éxito del tratamiento farmacológico del cáncer.

6.1.2. Productos naturales con actividad citotóxica

En la década de los 50, el Instituto Nacional del Cáncer (NCI) inició un programa de búsqueda de nuevos agentes anticancerígenos de plantas. Más de 400.000 productos, tanto naturales como sintéticos, fueron evaluados por su actividad anticancerígena, incluyendo cerca de 180.000 productos derivados de microorganismos y 114.000 extractos de plantas. Este programa representó un esfuerzo combinado de

⁴ Chabner, B. A.; Roberts, T. G. *Nat. Rev. Cancer*. **2005**, *5*, 6572.

⁵ Huang, T. T.; Sarkaria, S. M.; Cloughesy, T. F.; Mischel, P. S. *Neurotherapeutics*. **2009**, *6*, 500.

diversas organizaciones de investigación en el área de la química médica, industrias y centros, tanto farmacéuticos como químicos⁶.

Entre 1990 y 1996 se aprobó el uso clínico de 20 fármacos anticancerígenos procedentes de productos naturales o derivados semi-sintéticos de estos. Esto incluye, Bisantreno (1990), Idarubicina (1990), Fosfato Fludarabina (1991), Pentostatina (1992), Interferón gamma primera (1992), Miltefosina (1993), Paclitaxel/Taxol (1993), Citarabina octofosfato (1993), Porfímero sódico (1993), Formestano (1993), Irinotecan (1994), Pegaspargaso (1994), Sobuzoxano (1994), Zinostatina estimalamer (1994), Bicalutamina (1995), Docetaxel/Taxotere (1995), Gemcitabina (1995), Raltitrexedo (1996) y Topotecan (1996). Recientemente, se ha publicado que más del 60% de las nuevas entidades químicas, aprobadas como fármacos anticancerígenos entre 1980-2008, son productos naturales, análogos semisintéticos o compuestos sintetizados basándose en sus farmacóforos⁷.

Podemos destacar diversos alcaloides con actividad anticancerígena⁸, como es la **camptotecina**, un alcaloide pirano-indolizinoquinolina, aislado por primera vez de la madera y la corteza de *Camptotheca acuminata*. El topotecan, un derivado de la camptotecina, recibió la aprobación de la FDA para el tratamiento del cáncer de mama y ovario, siendo su mecanismo de acción la inhibición de la topoisomera I, esencial en el proceso de replicación del ADN. Por otra parte, la camptotecina es capaz de inhibir el fenotipo MDR mediado por la Pgp⁹. La 7-etil-10-hidroxi-camptotecina (SN-38) presentó actividad frente al carcinoma de pulmón y el tratamiento combinado de SN-38 con otros agentes anticancerígenos ha dado excelentes resultados para el tratamiento del carcinoma de pulmón de células no-pequeñas. Un derivado de la camptotecina, el irinotecan se usa en clínica para el tratamiento del cáncer de colon y recto¹⁰.

Ellepticina es un alcaloide antineoplásico presente en numerosas especies de la familia *Apocyanaceae*. Diversos derivados de la ellepticina que poseen el núcleo de piridocarbazol, han mostrado una significativa selectividad en líneas tumorales de leucemia, adenocarcinoma y sarcoma. Estos compuestos actúan como agentes

⁶ Ma, X.; Wang, Z. *Drug Discovery Today*. **2009**, *14*, 1136.

⁷ Newman D. J.; Cragg G. M. *Phytochem. Rev.* **2009**, *8*, 313.

⁸ Tringali, C. *Bioactive Compounds from Natural Sources*. **2001**, Taylor and Francis: Nueva York.

⁹ Chauvier, D.; Kegelaer, G.; Morjani, H.; Manfait, M. *J. Pharm. Sci.* **2002**, *91*, 1765.

¹⁰ Srivasta, V.; Negi, A. S.; Kumar, J. K.; Gupta, M. M.; Khanuja, S. P. S. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 5892.

intercalantes del ADN, lo que lo favorece su estructura planar, impidiendo la síntesis del ADN y ARN.

Las **harringtoninas** son un grupo de alcaloides con núcleo de cefalotaxina, aislados de diversas especies de *Cephalotaxus*, de las cuales el más activo de ellos, el homoharringtonina, ha sido seleccionado para estudios clínicos en Estados Unidos.

La **colchicina** y alcaloides relacionados se han aislado del bulbo o semillas de *Colchicum autumnale* y de algunas especies de *Liliaceae*. La colchicina no se utiliza como antitumoral debido a su elevada toxicidad, pero es empleada como referencia en la evaluación de otros posibles fármacos con mecanismo similar, inhibidor de las tubulinas y microtúbulos. Un derivado, la democolchicina es usado actualmente para el tratamiento de la leucemia mielocítica.

Los **alcaloides de la vinca**, aislados de *Catharanthus roseus*, son un grupo de metabolitos (vincristina, vinblastina, leurosina y leurosidina) extremadamente activos. Estos agentes actúan inhibiendo la polimerización de la tubulina¹¹. Se utilizan principalmente en combinación con otros fármacos, para el tratamiento de una gran variedad de cáncer, como por ejemplo leucemias, linfomas, cáncer testicular, cáncer de mama, de pulmón y el sarcoma de Kaposi.

La **podophyllotoxina** es un lignano fenilpropanoide, aislado de *Podophyllum peltatum*. Los primeros ensayos de este metabolito en humanos no mostraron una respuesta significativa. Modificaciones posteriores, dieron lugar a metabolitos más activos, destacando el etopósido, empleado actualmente en clínica, que fue el primer inhibidor de la topoisomerasa II, enzima implicada en la replicación del ADN durante el ciclo celular¹².

El **taxol**, diterpeno que se obtiene de diversas especies de *Taxus*, presenta mayor actividad en tumores sólidos que en leucemias, utilizándose en el tratamiento del cáncer de ovario y mama¹³. Cabe destacar, que en la actualidad, existen 23 taxanos en fase de desarrollo preclínico como potenciales fármacos antitumorales.

¹¹ Jordan, M. A.; Wilson, L. *Nat. Rev. Cancer.* **2004**, *4*, 253.

¹² Gordaliza, M. *Toxicon.* **2004**, *44*, 441.

¹³ Altmann, K. H.; Gertsch, J. *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24*, 327.

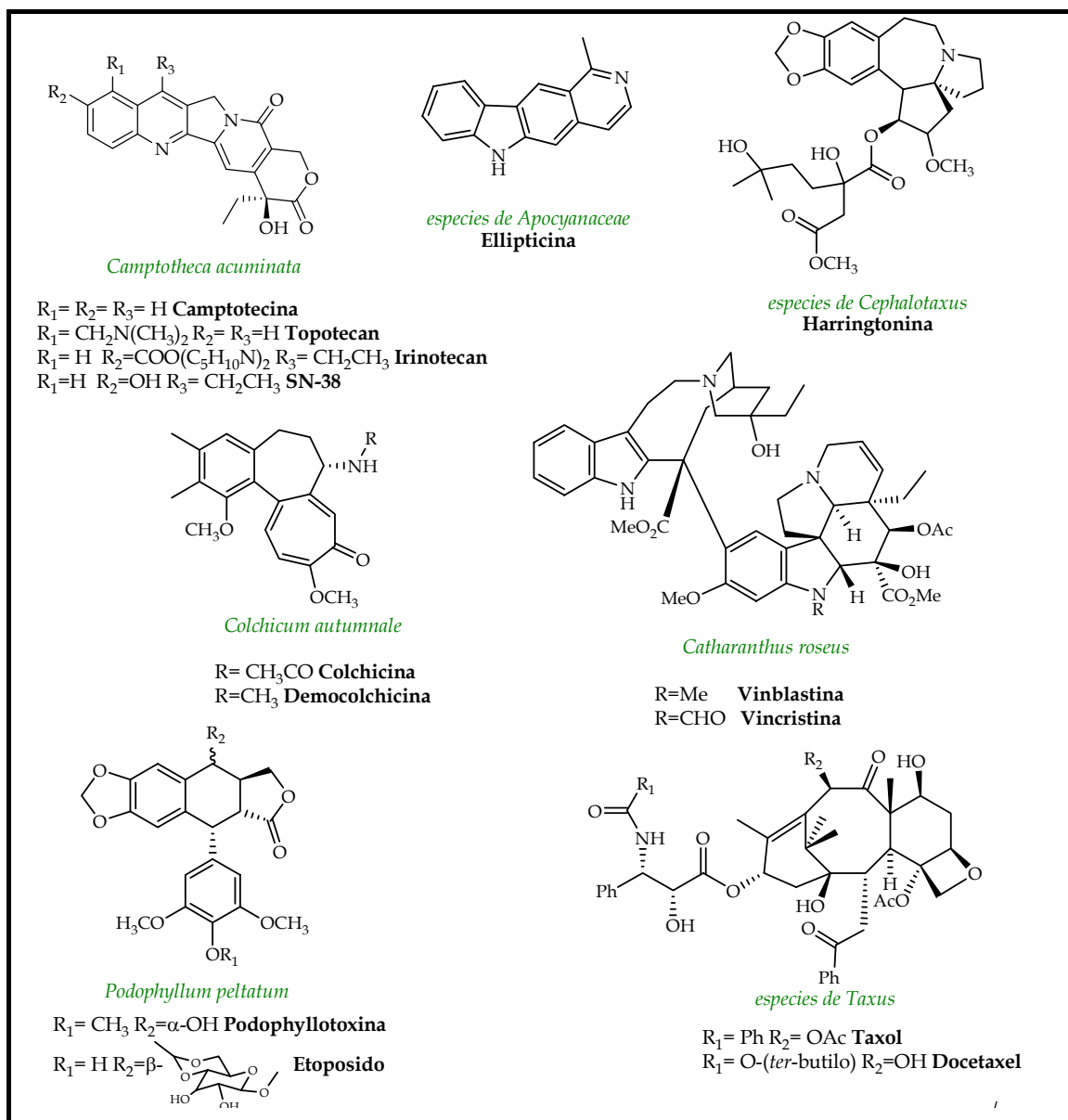


Figura 6.1.1. Productos naturales aislados de plantas superiores con actividad anticancerígena.

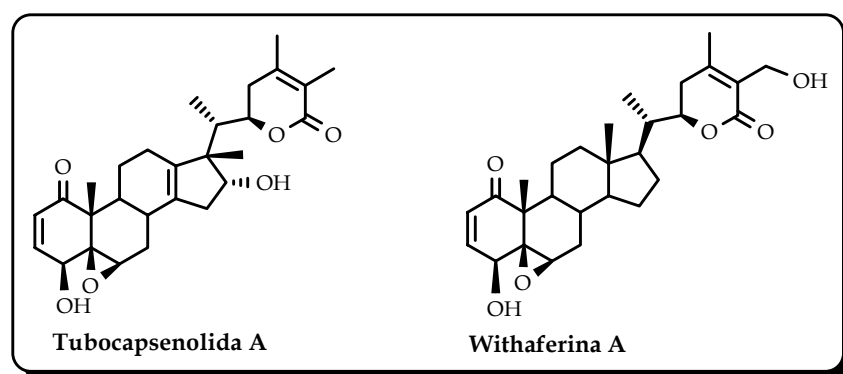
Se han identificado diversos metabolitos con actividad anticancerígena de especies de la familia *Solanaceae*. Así, se ha demostrado el potencial quimiopreventivo del cáncer de withanolidas aisladas de distintos géneros de esta familia, por inducción de la enzima quinona-reductasa (QR), ensayo que proporciona información sobre la potencia anticarcinogénica de estos compuestos y de su posible toxicidad. El primer estudio sobre la inducción de esta enzima, la realizó Kinghorn y col.¹⁴ en withanolidas aisladas de *Physalis philadelphica*, compuestos que también presentaron una potente actividad citotóxica¹⁵.

¹⁴ Kinghorn, A. D.; Su, B.-N.; Lee, D.; Gu, J.-Q.; Pezzuto, J. M. *Curr. Org. Chem.* **2003**, *7*, 213.

¹⁵ Jayaprakasam, B.; Zhang, Y.; Seeram, N. P.; Nair, M.G. *Life Sci.*, **2003**, *74*, 125.

Del extracto metanólico de *Tubocapsicum anomalum* se aislaron 17 withanolidas, de las cuales, tubocapsenolida A resultó la más potente por su actividad citotóxica frente a distintas líneas celulares tumorales con valores de IC_{50} inferiores a $1 \mu\text{g}/\text{ml}^{16}$. En un trabajo más reciente se estudió su mecanismo de acción en células MDAMB-231 receptores negativos de estrógeno, observándose que induce apoptosis y la detención del ciclo celular, efectos que están relacionados con la inhibición de las proteínas de choque térmico Hsp90 y Hsp70. Los autores consideran que ésta puede ser una estrategia novedosa en el tratamiento del cáncer¹⁷.

La withaferina A, compuesto mayoritario de *Withania somnifera*, ha mostrado actividad citotóxica frente a una gran variedad de líneas de células tumorales¹⁸. Se ha demostrado que suprime el factor NF- κ B que activa y regula la expresión de genes en células cancerígenas¹⁹, así mismo, se ha descrito que este compuesto actúa como inhibidor proteosomal, lo que contribuye a la actividad antitumoral *in vivo*²⁰. Recientemente, se ha descrito la activación selectiva de apoptosis por parte de la withaferina A en células de cáncer de próstata²¹ y de leucemia²².



¹⁶ Hsieh, P. W.; Huang, Z. Y.; Chen, J. H.; Chang, F. R.; Wu, C. C.; Yang, Y. L.; Chiang, M. Y.; Yen, M. H.; Chen, S. L.; Yen, H. F.; Lubken, T.; Hung, W. C.; Wu, Y. C. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 747.

¹⁷ Chen, W.; Chang, F.; Huang, Z.; Chen, J.; Wu, Y.; Wu, C. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 17184.

¹⁸ Jayaprakasam, B.; Zhang, Y.; Seeram, N. P.; Nair, M. G. *Life Sci.* **2003**, *74*, 125.

¹⁹ Ichikawa, H.; Takada, Y.; Shishodia, S.; Jayaprakasam, B.; Nair, M. G.; Aggarwal, B. B. *Mol. Cancer Ther.* **2006**, *5*, 1434.

²⁰ Yang, H.; Shi, G.; Dou, Q. P. *Mol. Pharmacol.* **2007**, *71*, 426.

²¹ Srinivasan, S.; Ranga, R.; Burikhanov, R.; Han, S.; Chendil, D. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 246.

²² Malik, F.; Kumar, A.; Bhushan, S.; Khan, S.; Bhatia, A.; Suri, K. A.; Qazi, G. N.; Singh, J. *Apoptosis.* **2007**, *12*, 2115.

6.1.3 Resultados y discusión

La actividad citotóxica de los distintos extractos de *Withania aristata*, así como de los metabolitos aislados y los derivados preparados, fue realizada en el Departamento de Microbiología y Biología Celular de la Universidad de La Laguna, por la Lda. Liliana Araujo Baptista bajo la dirección de la Dra. Laila Moujir.

La actividad se determinó usando el método colorimétrico de Mosmann²³, que se basa en la capacidad que poseen las células vivas de reducir el MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltrazol-2-1)-2,5-difeniltetrazolio) por medio de la succinato deshidrogenasa existente en las mitocondrias. Para llevar a cabo la actividad citotóxica se emplearon las siguientes líneas celulares:

- Células HeLa: carcinoma epitelial de cuello de útero humano
- Células A-549: carcinoma humano de pulmón
- Células MCF-7: células de cáncer de mama
- Células Vero: células de riñón de Mono Verde Africano (no tumoral)

Se evaluó la actividad citotóxica de **los extractos de *W. aristata*** obtenidos con disolventes de diferente polaridad, con el fin de seleccionar aquel o aquellos de mayor interés para su posterior estudio fitoquímico. La planta se dividió en hojas y tallos para su extracción. Se obtuvieron así los siguientes extractos que fueron evaluados:

- Extracto de hojas en hexano: H-H
- Extracto de hojas en diclorometano: H-D
- Extracto de hojas en acetato de etilo: H-A
- Extracto de hojas en etanol: H-E
- Extracto de tallos en hexano: T-H
- Extracto de tallos en diclorometano: T-D
- Extracto de tallos en acetato de etilo: T-A
- Extracto de tallos en etanol: T-E

Se evaluó la actividad citotóxica frente a dos líneas celulares tumorales HeLa y A-549. El extracto más activo fue el extracto de diclorometano de las hojas, con una CI₅₀ de 11.7 y 19.9 µg/ml frente a HeLa y A-549, respectivamente.

²³ Mosmann, T. J. *Immunol. Methods.* **1983**, 65, 55.

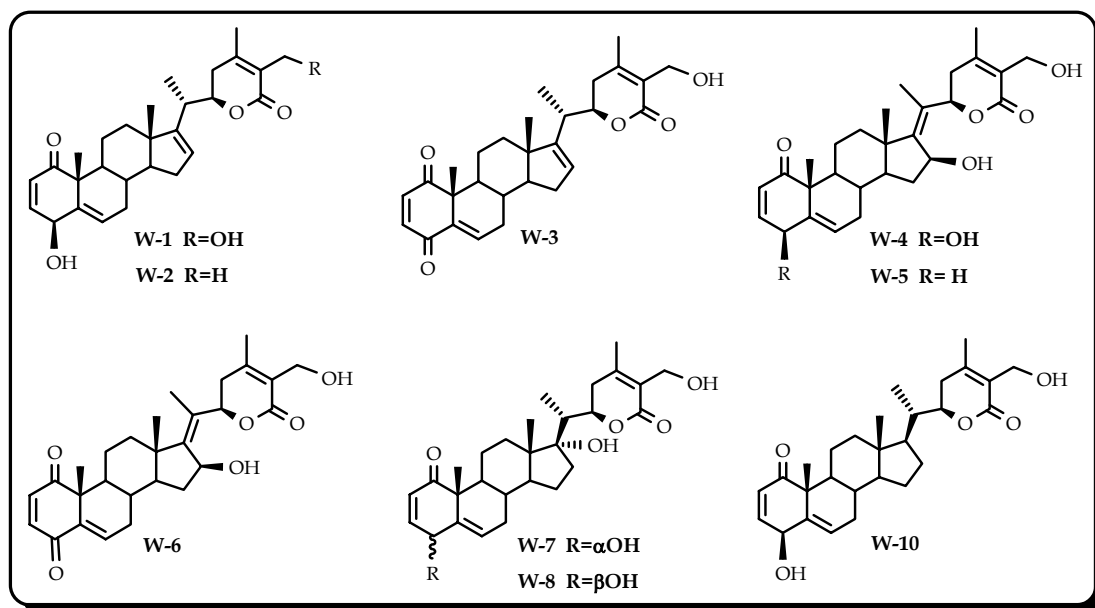
Tabla 6.1.1. Actividad citotóxica en (CI₅₀) µg/ml de los extractos de *W. aristata*

Extracto	HeLa	A-549
H-H	32.4	44.3
H-D	11.7	19.9
H-A	23.0	26.3
H-E	63.1	95.3
T-H	58.0	126.6
T-D	64.3	142.4
T-A	104.8	151.7
T-E	> 200	> 200
Mercaptopurina	0.6	10.6

*Los ensayos fueron realizados por triplicado.

* Mercaptopurina fue usado control positivo.

Las withanolidas aisladas de *W. aristata* fueron evaluadas por su actividad citotóxica frente a las líneas celulares: células HeLa, células A-549, células MCF-7 y la línea celular no tumoral células Vero.



Continúa en la siguiente página

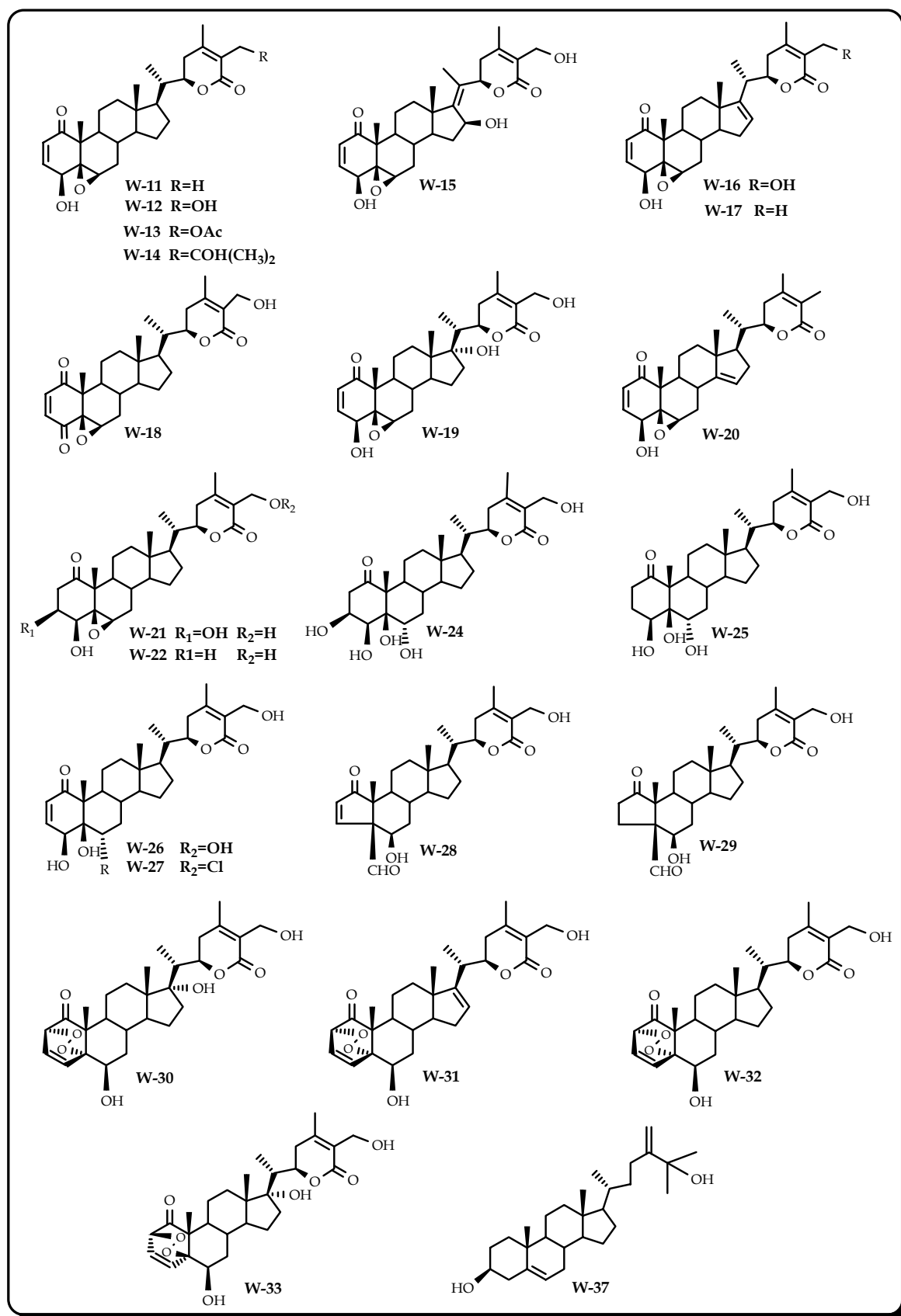


Figura 6.1.2. Metabolitos aislados de *W. aristata* evaluados por su actividad citotóxica.

Los resultados de la actividad citotóxica de las withanolidas naturales descritas anteriormente, se recogen en la siguiente tabla.

Tabla 6.1.2. Actividad citotóxica de withanolidas aisladas de *W. aristata*. Datos^a expresados como valores de CI_{50} (μ M).

Prod	HeLa		A-549		MCF-7		Vero	
	A	B	A	B	A	B	A	B
W-1	14.2	10.8	26.3	25.2	19.7	13.5	10.6	6.4
W-2	20.8	11.0	31.9	28.4	31.2	21.6	7.8	11.5
W-3	13.9	15.3	32.3	35.2	10.4	13.9	32.7	15.5
W-4	40.0	>40	>40	>40	32.7	10.3	>40	25.6
W-7	> 40	> 40	> 40	> 40	37.4	26.6	40.1	> 40
W-8	28.3	24.0	>40	>40	>40	27.0	25.3	23.8
W-10	32.6	19.6	>40	35.7	>40	32.4	31.7	>40
W-11	4.2	4.8	9.0	10.6	6.6	2.8	1.5	4.6
W-12	1.7	6.2	6.6	10.0	3.6	1.3	1.3	6.6
W-13	7.70	10.2	6.7	6.7	5.3	4.6	11.4	5.9
W-14	> 40	> 40	> 40	> 40	25.9	22.4	27.8	38.6
W-15	40.0	>40	>40	>40	27.7	22.3	>40	34.7
W-16	4.1	6.4	4.1	4.7	1.3	6.4	3.4	1.9
W-17	21.5	13.7	41.8	27.2	12.6	12.6	4.6	10.0
W-18	23.3	9.0	25.4	33.0	3.2	9.2	7.7	16.9
W-19	17.7	22.0	>40	>40	16.3	17.3	28.9	>40
W-20	2.2	5.8	2.7	7.7	1.3	5.5	2.2	6.2
W-22	28.9	32.2	33.5	19.7	14.4	12.2	15.5	24.2
W-26	> 40	> 40	> 40	> 40	38.4	27.1	40	> 40
W-27	9.1	18.0	14.6	16.2	7.5	7.9	14.8	7.9
W-31	39.1	> 40	> 40	> 40	22.7	23.3	26.4	31.6
W-32	28.9	> 40	25.1	27.4	12.2	15.7	14.2	16.0
W-37	>40	21.3	>40	20.8	>40	>40	>40	29.3
C1 ^b	1.1x10 ⁻³	3.2x10 ⁻³	7.2x10 ⁻³	0.8x10 ⁻²	2.4x10 ⁻²	4.8x10 ⁻²	7.1x10 ⁻²	1.1x10 ⁻²
C2 ^b	2.9	4.1	47.0	49.4	1.4	5.8	67.6	>117.5

^aTodos los experimentos se hicieron por triplicado. Los compuestos evaluados que no se encuentran en la tabla presentaron valores de CI_{50} >40 μ M.

^bControles positivos, C1: Actinomicina D, C2: Mercapturina.

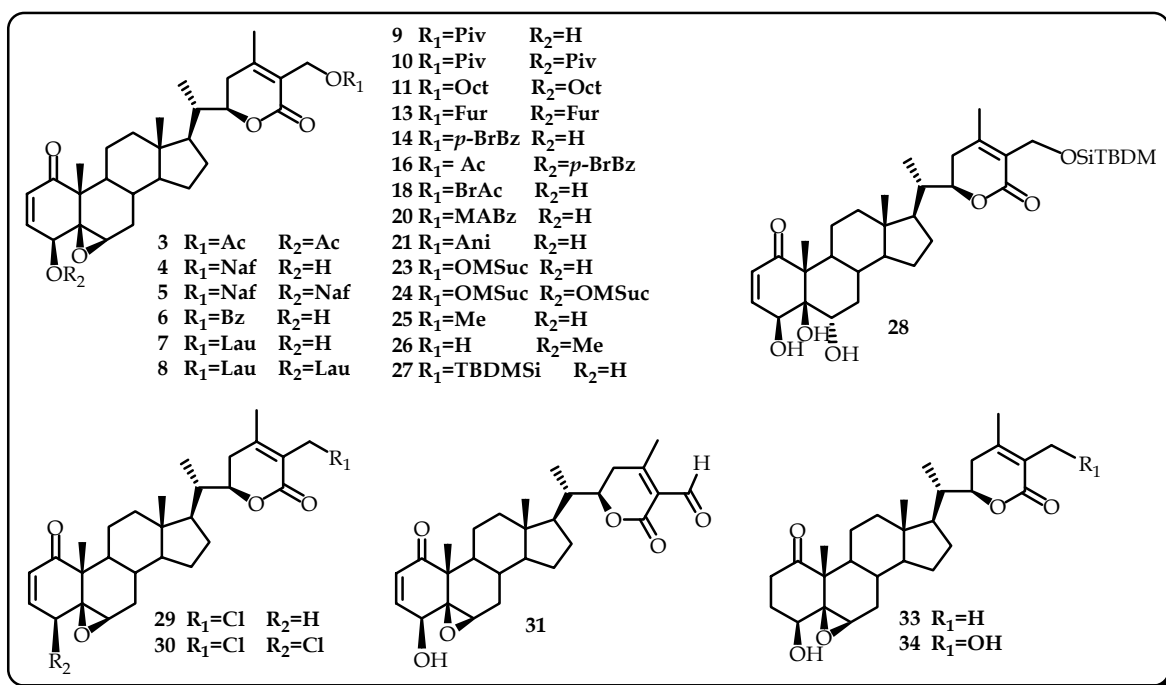
A: Fase de latencia. Los productos fueron incorporados al comienzo del experimento.

B: Fase exponencial. Los productos fueron incorporados cuando las células estaban en fase de división.

De los resultados mostrados en la Tabla 6.1.2., podemos deducir que las células HeLa y MCF-7 fueron las más sensibles a las withanolidas naturales, presentando una potente actividad ($CI_{50} \leq 5 \mu M$) frente a las tres líneas tumorales los compuestos **W-12**, **W-16** y **W-20**. Sin embargo, **W-11** mostró potente actividad frente a HeLa y MCF-7 y **W-13** frente a A-549 y MCF-7, mientras que **W-18** mostró una actividad selectiva con una CI_{50} inferior a $5 \mu M$ frente a la línea MCF-7.

Cabe destacar que las withanolidas más activas (**W-11**, **W-12**, **W-13**, **W-16**, **W-18** y **W-20**) mostraron mayor actividad al ser incorporadas cuando las células se encontraban en fase de latencia que cuando éstas estaban en fase exponencial llegándose incluso a triplicar la actividad, a excepción de **W-11**, **W-12** y **W-13** frente a la célula MCF-7, donde la actividad se incrementó hasta tres veces cuando fueron añadidas a las células en fase exponencial.

Con el fin de profundizar en el estudio de relación estructura-actividad, se preparó una serie de cincuenta y tres **derivados de las withanolidas aisladas de W. aristata**, que fueron evaluados por su potencial citotóxico frente a las líneas celulares tumorales HeLa, A-549, MCF-7 y la línea celular no tumoral Vero.



Continúa en la página siguiente

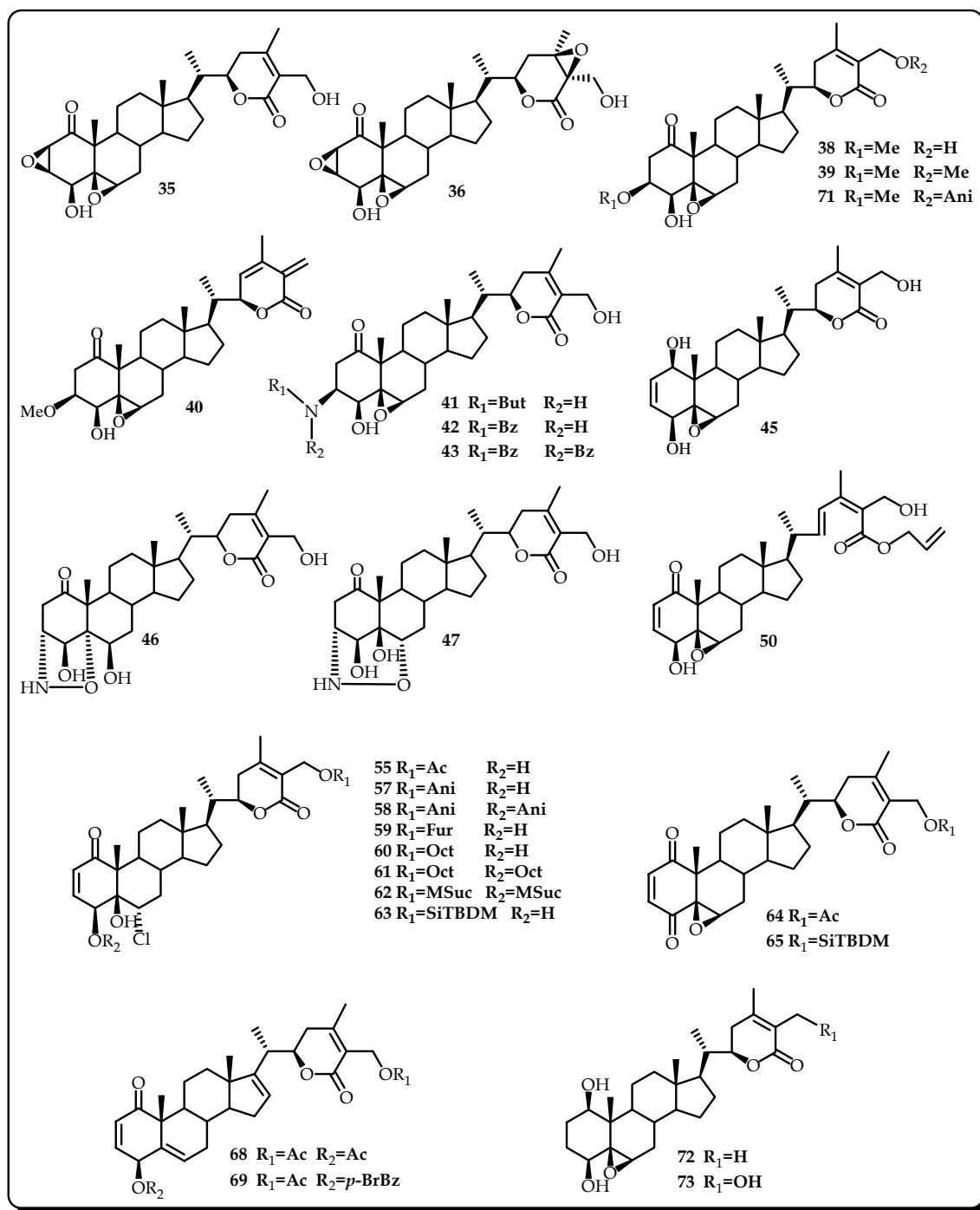


Figura 6.1.3. Derivados de las withanolidas naturales evaluados por su actividad citotóxica.

Los resultados de la actividad citotóxica de los derivados de las withanolidas naturales, se recogen en la siguiente tabla:

Tabla 6.1.3. Actividad citotóxica de los derivados de withanolidas. Datos^a expresados como valores de CI_{50} (μM).

Prod	HeLa		A-549		MCF-7		Vero	
	A	B	A	B	A	B	A	B
3	0.66	1.41	0.97	1.39	0.32	0.83	0.49	1.19
4	0.81	3.49	6.44	13.72	0.88	2.16	0.37	0.57
6	0.38	1.26	0.96	1.47	0.33	0.73	0.18	0.53
7	3.65	4.66	10.18	12.16	2.43	3.48	1.90	4.74
9	0.83	1.69	1.80	2.13	0.34	0.38	0.36	0.53
10	0.21	2.26	4.07	4.62	0.62	1.20	0.40	0.51
11	33.76	>40	>40	>40	23.75	33.52	3.27	18.29
13	1.56	3.79	3.55	3.84	1.45	1.73	0.85	0.89
14	1.21	3.74	2.86	4.16	0.99	2.27	0.49	0.66
16	1.21	2.13	2.12	1.72	0.40	0.55	0.51	0.93
18	2.12	4.87	3.93	4.81	1.24	0.90	1.12	1.63
20	1.56	4.16	3.68	4.66	1.58	1.04	1.20	1.62
23	0.93	2.94	2.33	3.66	0.4	1.58	0.61	0.61
24	1.42	2.85	2.10	3.38	1.41	1.47	0.74	0.62
25	3.16	3.25	4.20	5.34	1.38	1.85	0.87	1.53
26	2.14	3.84	3.97	4.42	1.09	1.70	0.86	1.50
27	0.94	4.93	1.52	4.01	0.72	1.20	0.71	0.84
28	14.82	11.97	14.20	10.03	7.54	5.55	7.88	7.55
29	2.52	2.76	2.03	3.62	1.13	1.00	0.52	0.59
30	3.09	7.88	9.57	18.13	4.10	4.80	1.90	3.06
31	6.47	10.9	15.73	13.47	3.73	2.14	4.37	3.58
34	28.88	32.22	33.49	19.71	14.44	12.20	15.51	24.24
39	> 40	> 40	> 40	> 40	26.90	21.59	36.93	> 40
40	> 40	> 40	> 40	> 40	> 40	23.02	> 40	> 40
41	9.56	8.36	21.78	9.63	7.63	6.88	13.59	20.64
42	8.50	10.95	9.98	13.84	7.17	6.62	13.13	7.79
43	22.19	>40	40.0	>40	15.40	18.50	32.90	15.58
45	15.81	17.53	>40	17.28	16.83	7.50	7.05	6.03
50	4.15	7.07	7.86	8.31	2.39	2.42	2.21	4.74
55	16.10	14.80	10.78	17.13	10.92	7.20	4.83	6.47
57	26.43	37.74	>40	>40	3.00	6.79	3.81	6.82
58	11.17	28.09	24.04	>40	2.99	4.54	3.70	3.04
59	> 40	> 40	> 40	> 40	33.52	28.63	30.60	31.18
60	29.52	32.85	31.32	> 40	15.14	13.80	16.40	16.10
62	13.98	7.95	7.84	8.87	5.46	4.80	3.88	4.05
63	3.10	3.36	4.14	3.76	2.46	3.12	3.54	3.13
64	16.34	17.51	13.22	16.24	6.40	6.83	3.91	6.42
65	1.74	5.79	2.85	5.27	0.48	0.84	3.13	6.12
68	12.41	14.74	24.77	17.0	10.58	5.38	13.33	7.75
69	3.70	3.50	4.26	3.59	2.29	2.81	3.43	3.47
71	13.74	>40	28.83	>40	9.76	16.72	2.70	7.29
^b C1	1.1x10 ⁻³	3.2x10 ⁻³	7.2x10 ⁻³	0.8x10 ⁻²	2.4x10 ⁻²	4.8x10 ⁻²	7.1x10 ⁻²	1.1x10 ⁻²
^b C2	2.9	4.1	47.0	49.4	1.4	5.8	67.6	>117.5

^aTodos los experimentos se hicieron por triplicado. Los compuestos evaluados que no se recogen en la tabla presentaron valores de CI_{50} >40 μM . ^bControles positivos, C1: Actinomicina D, C2: Mercapturina. A: Fase de latencia. B: Fase exponencial.

En general, los derivados evaluados resultaron más activos que los productos naturales, presentando incluso una $CI_{50} < 1 \mu M$, siendo la línea celular de mama (MCF-7) la más sensible a estos derivados. Así, los compuestos más activos frente a las tres líneas celulares tumorales fueron los derivados **3** y **6**, con valores de $CI_{50} < 1 \mu M$. Los compuestos **4**, **9**, **10**, **23** y **27** mostraron una actividad muy potente ($CI_{50} < 1 \mu M$) frente a las células tumorales Hela y MCF-7 y potente ($CI_{50} < 5 \mu M$) frente a las A-549. Los derivados **14**, **16**, **18** y **65** presentaron valores de $CI_{50} < 1 \mu M$ frente a la línea celular de cáncer de mama (MCF-7) y de $CI_{50} < 5 \mu M$ para las otras dos líneas celulares tumorales.

Así mismo, los derivados **13**, **20**, **24-26**, **29**, **63** y **69** presentaron una potente actividad ($CI_{50} < 5 \mu M$) frente a todas las células tumorales evaluadas. Los compuestos **7**, **30** y **50** mostraron valores de $CI_{50} < 5 \mu M$ para las líneas celulares HeLa y MCF-7, mientras que **31**, **57**, **58** y **62** mostraron una $CI_{50} < 5 \mu M$ frente a la línea celular de cáncer de mama (MCF-7).

Cabe destacar que todos estos derivados, a excepción de **18**, **20**, **29**, **31**, **62**, **63** y **69**, mostraron mayor actividad al ser incorporados cuando las células se encontraban en fase de latencia que cuando se incorporaban a las células en fase exponencial, llegándose incluso a multiplicar por diez la actividad como en el caso del derivado **10** frente a las células HeLa. Estos resultados nos sugieren que el mecanismo de acción de las withanolidas debe ser diferente según el tipo de células y la fase de crecimiento en que ellas se encuentren.

Pese a los buenos resultados obtenidos con las líneas celulares tumorales, todas las withanolidas (naturales y derivados) fueron activas frente a la línea no tumoral Vero. Cabe destacar que ninguno de los compuestos evaluados mostró actividad citotóxica superior al control actinomicina D, pero si presentaron actividad superior a la mercaptopurina, usado también como control.

Estudio de relación estructura-actividad (SAR)

Dado el número de compuestos evaluados (ochenta y cinco), tanto naturales como derivados, nos pareció interesante realizar un estudio preliminar de la relación estructura-actividad (SAR), que podemos resumir en los siguientes puntos:

- ❖ La presencia del sistema enónico en el anillo A es importante para la expresión de la actividad. Ello se pone de manifiesto al comparar la actividad de **W-12** (CI_{50} 1.3-10 μ M) con sus análogos:
 - a) Reducido en C-1, **45** (OH-1, CI_{50} > 6 μ M).
 - b) Hidrogenado en C2-C3, **34** (CI_{50} > 12.2 μ M).
 - c) Funcionalizados en C-3, **W-21** (OH-3, CI_{50} > 40 μ M), **38** (OMe-3, CI_{50} > 40 μ M) y con **41-43** (aminas en C-3, CI_{50} > 6.6 μ M).
 - d) Epoxidado en C2-C3, **35** (CI_{50} > 34.5 μ M).

- ❖ Un alcohol en disposición β sobre C-4 es requisito estructural imprescindible para la citotoxicidad, lo que se deduce al comparar los siguientes compuestos:
 - a) El derivado **W-8** (OH-4 β , CI_{50} > 23.8 μ M) con el compuesto **W-7** (CI_{50} > 37.4 μ M) que presenta un OH-4 α .
 - b) La withanolida **W-4** (OH-4 β , CI_{50} > 10.3 μ M) con **W-5** (H-4, CI_{50} > 40 μ M).
 - c) Los productos **W-12** (CI_{50} 1.3-10 μ M), **W-13** (CI_{50} 4.6-11.4 μ M) y **27** (CI_{50} 0.7-4.9 μ M) con sus respectivos análogos oxidados en C-4, **W-18** (CI_{50} 3.2-33.0 μ M), **64** (CI_{50} 3.9-17.5 μ M) y **65** (CI_{50} 0.5-6.1 μ M), respectivamente.
 - d) El compuesto **29** (OH-4 β , CI_{50} 0.5-3.6 μ M) con el derivado clorado en C-4, **30** (CI_{50} 1.9-18.1 μ M).

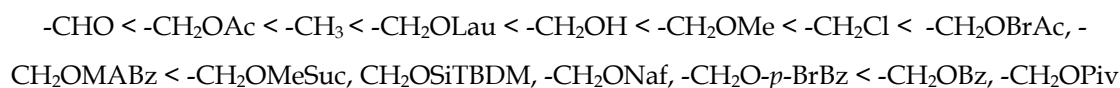
- ❖ La contracción del anillo A en el esqueleto de withanolida afecta de forma negativa a la actividad (**W-12 versus W-28**).

- ❖ Un grupo epóxido en los carbonos C5-C6 es importante para la expresión de la actividad, lo que se observa al comparar la actividad de los siguientes compuestos:
 - a) El producto **W-12** (CI_{50} 1.3-10 μ M), que presenta epóxido en C5-C6 con **W-10** ($\Delta^{5,6}$, CI_{50} > 19.6 μ M), **W-26** (OH-5, OH-6, CI_{50} > 27.1 μ M) y **W-27** (OH-5, Cl-6, CI_{50} > 7.5 μ M).
 - b) Los compuestos que presentan epóxido en C5-C6 con sus respectivos análogos con doble enlace en dichas posiciones, donde se reduce considerablemente la actividad, (**W-16 versus W-1** y **W-19 versus W-8**).

- ❖ La presencia de grupos funcionales en el anillo D afecta de forma negativa a la actividad:
 - a) Los dobles enlaces C16-C17 (**W-11 versus W-17** y **W-12 versus W-16**) o C14-C15 (**W-11 versus W-20**), reducen considerablemente la actividad.
 - b) Un grupo hidroxilo en C-17 afecta negativamente la citotoxicidad (**W-12 versus W-19**).
 - c) Un sistema 17-en-16-ol elimina la actividad (**W-12 versus W-10** y **W-15 versus W-4**).

- ❖ Los resultados mostraron que las sustituciones sobre el carbono C-27 del anillo lactónico afectan la actividad:
 - a) La eliminación del alcohol en C-27 (**W-1 versus W-2**, **W-12 versus W-11**, **W-16 versus W-17**), la oxidación a aldehído (**W-12 versus 31**), la acetilación (**W-12 versus W-13**) o la formación del éster del ácido láurico (**W-12 versus 7**) afecta negativamente la actividad.
 - b) La sustitución del alcohol en C-27 por un metoxilo (**W-12 versus 25**), por un cloro (**W-12 versus 29**), así como la introducción en C-27 de un *tert*-butildimetilsilil éter (**W-12 versus 27** y **W-26 versus 28**) o los ésteres: benzoilo (**W-12 versus 6**), pivaloilo (**W-12 versus 9**), naftoilo (**W-12 versus 4**), *p*-bromobenzoilo (**W-12 versus 14**), bromoacétilo (**W-12 versus 18**), metilaminobenzoilo (**W-12 versus 20**) y metilsiccínilo (**W-12 versus 23**) aumentan la actividad.

Podemos proponer el siguiente orden creciente de actividad, en función de la sustitución en el carbono C-27:



- ❖ La presencia de ésteres en C-4 afecta a la actividad, así se observa que:
 - a) Se potencia la actividad tanto al acetilar el alcohol en C-4 (**W-13 versus 3**) como al formar el éster del ácido *p*-bromobenzoico (**W-13 versus 16**).
 - b) Se resta actividad al formar los ésteres pivaloilo (**9 versus 10**), metilsuccínilo (**23 versus 24**) y naftoilo (**4 versus 5**).

De este análisis preliminar de la relación estructura-actividad, podemos concluir que la withanolida ideal como potencial agente citotóxico debe reunir los siguientes requisitos estructurales:

- Un sistema 2-en-1-ona en el anillo A.
- Un alcohol o un acetato en C-4.
- Un epóxido en los carbonos C5-C6 del anillo B.
- La ausencia de dobles enlaces y grupos hidroxilos en el anillo D y la cadena lateral.
- Un grupo benzoato o pivaloato en el carbono C-27 del anillo lactónico.

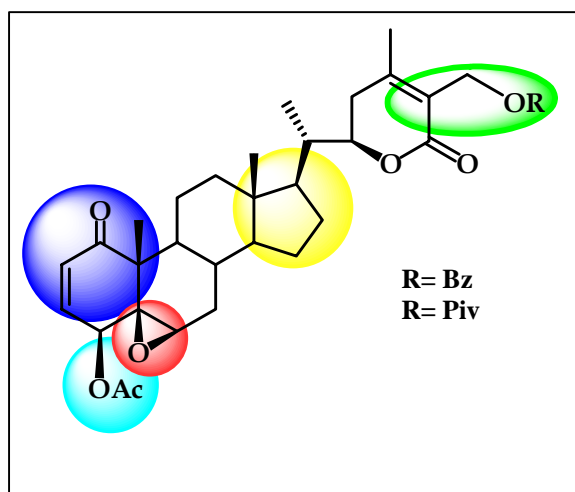
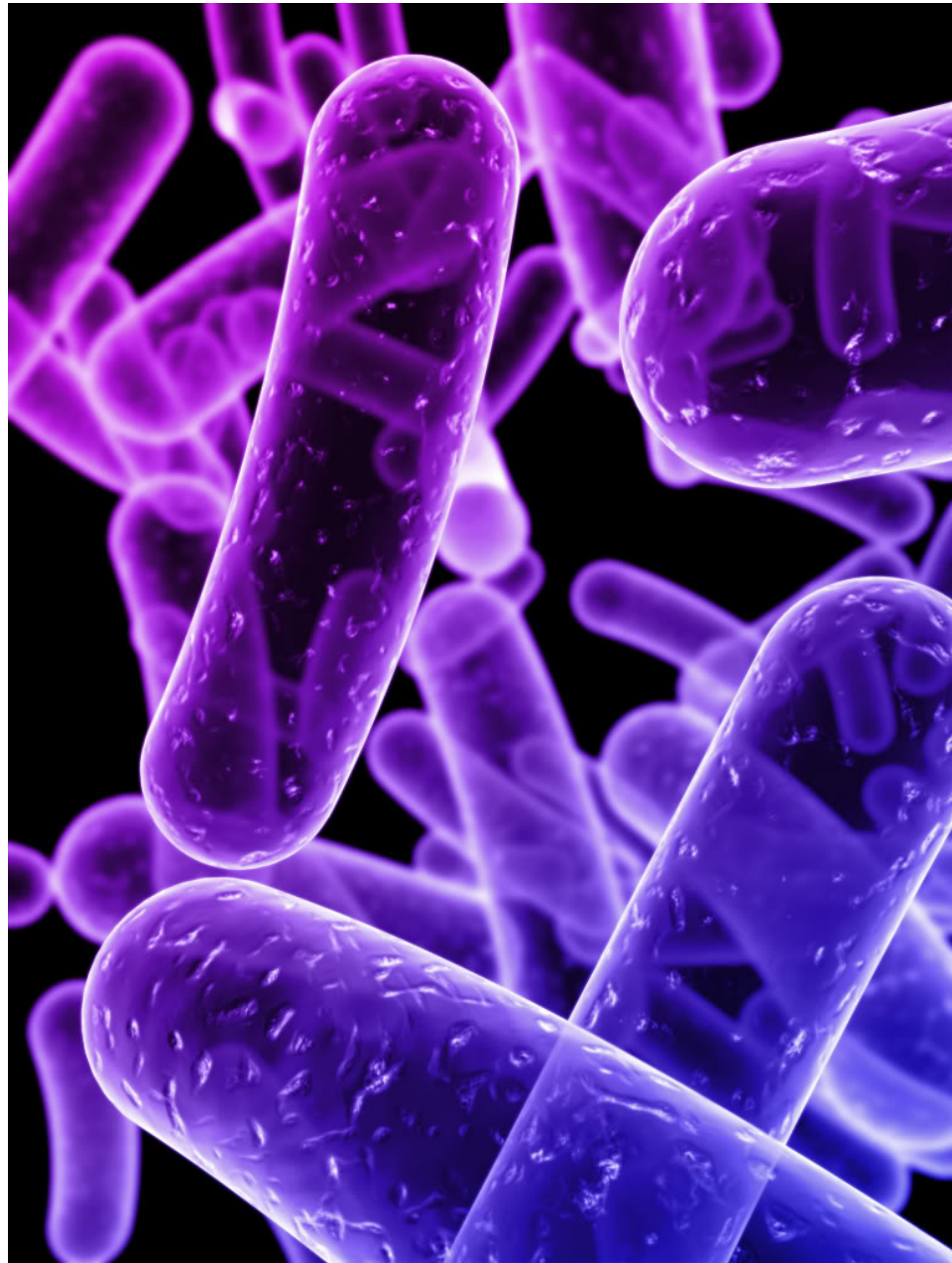


Figura 7. *Withanolida hipotética con los requisitos ideales para potenciar la actividad citotóxica*

Estos resultados demuestran el potencial de las withanolidas como citotóxicos y nos orientan en la búsqueda de compuestos prometedores como agentes anticancerígenos. Nuestros esfuerzos, en el futuro, estarán dirigidos hacia la preparación de derivados de withanolidas con los requisitos estructurales planteados y que presenten una citotoxicidad selectiva frente a las líneas celulares tumorales, así como al estudio del mecanismo de acción de dichos compuestos.



6.2. Actividad antimicrobiana

6.2. Actividad antimicrobiana

6.2.1. Introducción

El nacimiento de la quimioterapia antimicrobiana se atribuye a los esfuerzos realizados por Paul Ehrlich en Alemania durante los primeros años del siglo XX, cuando intentaba teñir las bacterias sin colorear el tejido que las rodeaba. Después de evaluar centenares de sustancias halló un agente químico denominado *salvarsan*, un derivado arsenical eficaz contra la sífilis. Antes de este descubrimiento, la única sustancia química conocida en el arsenal médico europeo era un extracto de la corteza del árbol denominado quinina, que había sido utilizado por los conquistadores españoles para tratar el paludismo (malaria).

En contraste con las sulfamidas que se desarrollaron deliberadamente, el descubrimiento de los antibióticos fue de forma accidental, cuando Fleming en 1929 observó en algunas placas de cultivo de *Staphylococcus aureus* que habían sido contaminadas por un hongo filamentoso, unas zonas claras donde no había crecimiento de la bacteria. El hongo fue identificado como *Penicillium notatum* y Fleming denominó penicilina al compuesto responsable del efecto inhibitorio.

Este descubrimiento condujo al aislamiento, elucidación estructural, evaluación clínica y comercialización de la penicilina como el primer agente antibacteriano de amplio espectro a principios de los años 1940. El descubrimiento de antibióticos derivados de un producto natural proporcionó el medio para tratar infecciones bacterianas, por sus esfuerzos en el descubrimiento y desarrollo de la penicilina, Fleming, Florey y Chain recibieron el Premio Nóbel en 1945¹.

Así pues, la introducción de las sulfonamidas en los años treinta y la penicilina en los años cuarenta revolucionó la práctica médica, con la considerable disminución de los índices de mortalidad asociadas a infecciones bacterianas^{2,3}. Estos descubrimientos condujeron a una búsqueda concertada de fármacos antibacterianos nuevos durante los siguientes 30 años y dieron lugar al descubrimiento de la mayor

¹ Singh S. B.; Barreto J. F. *Biochem. Pharmacol.* **2006**, *71*, 1006.

² Newman D. J.; Cragg G. M.; Snader K. M. *Nat. Prod. Rep.* **2000**, *17*, 215.

³ Derws, J. *Science.* **2000**, *287*, 1960.

parte de las clases de antibacterianos conocidos hoy, muchos de los cuales fueron derivados de productos naturales⁴.

El predominio de las sustancias antibacterianas derivadas de productos naturales puede ser debido a la evolución de los metabolitos secundarios como productos biológicamente activos que confieren ventajas selectivas al organismo productor. Además, son capaces de atravesar la membrana celular y su propia complejidad química permitirle interactuar con muchas proteínas dianas e inhibirlas⁵. De hecho, la mayoría de los agentes antimicrobianos usados para el tratamiento de las infecciones bacterianas, actúan interfiriendo en la síntesis de la pared celular, inhibiendo la síntesis de proteínas, de los ácidos nucleicos ó de alguna vía metabólica, ó bien alterando la estructura de la membrana citoplasmática⁶ (Figura 6.2.1).

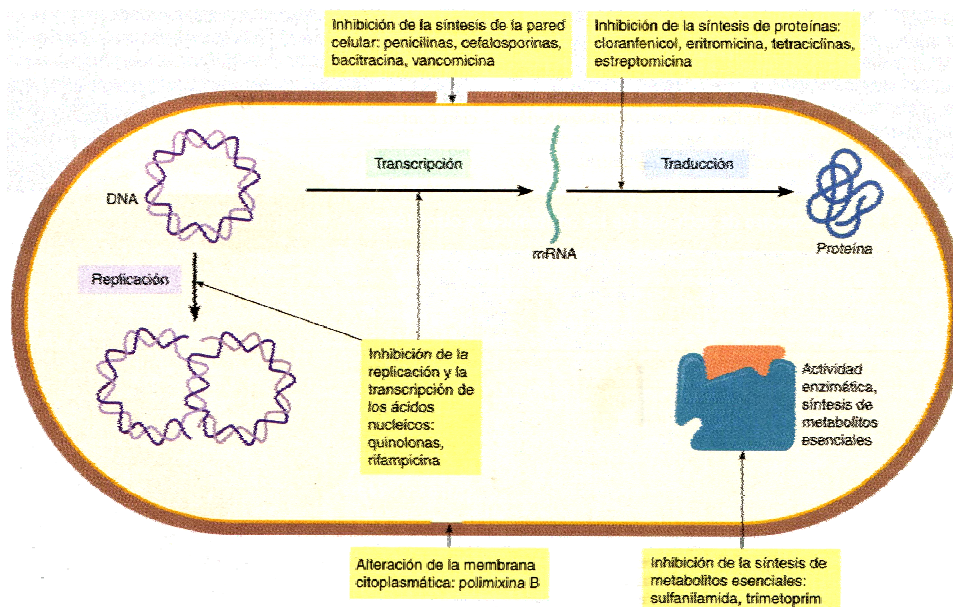


Figura 6.2.1. Esquema de los principales mecanismos de acción de fármacos antimicrobianos.

A pesar del progreso significativo realizado en el área de la Microbiología y en el control de los microorganismos, las enfermedades infecciosas siguen siendo una causa significativa de morbilidad y mortalidad en todo el mundo, produciendo aproximadamente el 50% de todas las muertes en los países tropicales⁷. Así, las enfermedades infecciosas y parasitarias siguen siendo la segunda causa de muerte a nivel mundial, provocando 15 millones de muertes al año, especialmente en niños y

⁴ Walsh C. T.; Wright G. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 391.

⁵ Butler M. S.; Buss A. D. *Biochem. Pharmacol.* **2006**, *71*, 919.

⁶ Tenover F. C. *Am. J. Med.* **2006**, *119* (6 Suppl 1) S3-S10, discussion S62-70.

⁷ Mahady G. B. *Curr. Pharm. Des.* **2005**, *11*, 2405.

ancianos en todo el mundo⁸. Las causas del aumento en la incidencia de las enfermedades infecciosas pueden deberse a dos hechos; por un lado, la resistencia que han mostrado las bacterias a los antibióticos y por otro las enfermedades emergentes, que son definidas como “infecciones nuevas, reemergentes o resistentes a fármacos cuya incidencia entre los humanos ha aumentado en las pasadas dos décadas o cuya incidencia amenaza con aumentar en un futuro próximo”⁹.

La resistencia a los antimicrobianos supone uno de los grandes problemas que tiene planteada la medicina en el siglo XXI. Los microorganismos consiguen evadir la acción de los antibióticos y en consecuencia mostrarse resistentes a ellos, a través de distintos mecanismos:

1. Las bacterias producen enzimas que pueden provocar la destrucción o inactivación del fármaco (por ejemplo, por las β -lactamasas).
2. Impedimento de la penetración del fármaco en su sitio de acción dentro del microorganismo (un mecanismo frecuente para la resistencia a la tetraciclina).
3. Alteración de los sitios de acción de los fármacos (por ejemplo, el cambio de un único aminoácido en el ribosoma puede ser suficiente para convertir al microorganismo en resistente a ciertos antibióticos macrólidos).
4. Reducción de la acumulación del principio activo en el sitio de acción.
5. Superproducción ó disminución de la diana (ejemplo de ellos, son las resistencias mostradas al trimetoprim y a los antibióticos poliénicos, respectivamente).

La incidencia de la resistencia a los antibióticos por parte de las bacterias, tanto Gram- positivas como Gram-negativas, ha ido en aumento a pesar de los intentos de emplear los antibióticos de una manera más adecuada y racional¹⁰.

Podemos nombrar un número considerable de microorganismos presentes en el ambiente hospitalario y extrahospitalario que son resistentes no a uno, sino a muchos antibióticos. El término multiresistencia a fármacos (MDR) que, inicialmente, se empleaba para describir a células tumorales resistentes y posteriormente, a cepas de *Mycobacterium tuberculosis*, es aplicable, hoy en día, a cualquier microorganismo,

⁸ World health statistics. 2006. pp 1-80, WHO (<http://www.who.int/>)

⁹ Dewhurst, S. (1.996). Patogénesis viral. University of Rochester. Disponible en: <http://www.medynet.com/usuarios/nnuneza/virologia/virologia3.html> (consulta realizada en mayo de 2005).

¹⁰ Sutcliffe J.A. *Curr. Opin. Microbiol.* 2005, 8, 534.

bacteria, hongo o parásito. La emergencia de MDR está claramente relacionada con la cantidad de antibióticos y en como están siendo utilizados¹¹.

En este sentido, de especial preocupación es, por un lado, el incremento de las infecciones por los patógenos Gram-positivos como *Staphylococcus aureus* meticilin resistentes (SARM), *enterococos* vancomicin resistentes (ERV), *Streptococcus pneumoniae* penicilin resistente (SPRP) y las provocadas por *Staphylococcus epidermidis* meticilin resistentes (SERM) que están avanzando a pasos agigantados¹² y por otro, el resurgir de las infecciones por bacterias Gram negativas mutiresistentes¹³, lo que ha llevado a que hoy en día no existan opciones terapéuticas para el tratamiento de las infecciones producidas por ellos.

Así pues, el avance de la resistencia a fármacos, la cual ha rebasado el descubrimiento de nuevos agentes antimicrobianos y la aparición de nuevos patógenos, exige la estricta necesidad de describir nuevas clases de antibióticos inhibidores de los mecanismos por los cuales las bacterias se han hecho resistentes¹⁴, ó bien con nuevos mecanismos de acción que puedan tener ventajas sobre los antibacterianos conocidos⁵.

6.2.2. Productos naturales con actividad antimicrobiana.

En los últimos años se ha incrementado el interés en la búsqueda de nuevos antimicrobianos de las plantas superiores. Esto ha sido debido a la necesidad de nuevos agentes terapéuticos, las alergias ante muchos de los antibióticos en uso, como la alergia a la penicilina que afecta al 8-10% de la población y el fenómeno de la resistencia que hemos comentado anteriormente.

El conocimiento de algunos remedios, usando diversas plantas superiores se remonta a muchos años atrás en la historia de la humanidad¹⁵. Como ejemplo podemos citar el ajo y la cebolla, que eran recomendados en el papiro de Ebers (1550 a.C) para el tratamiento de diarreas e infecciones. En 1944 se aislaron de estas plantas una sustancia

¹¹ Levy, S. B. J. *Antimicrob. Chemother.* **2002**, 49, 25.

¹² Borbone, S.; Lupo, A.; Mezzatesta, M.L.; Campanile, F.; Santagati, M.; Stefani, S. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **2008**, 31, 209.

¹³ Erden, H.; Oncul, O. *Curr. Therap. Res.* **2007**, 68, 45.

¹⁴ Gibbons S. *Phytochem. Rev.* **2005**, 4, 63.

¹⁵ Ríos, J. L.; Recio, M. C. J. *Ethnopharmacol.* **2005**, 100, 80-84.

llamada alicina (figura 6.2.2.), que posee actividad *in vitro* frente a diferentes microorganismos y se cree que es la que le confiere sus propiedades terapéuticas¹⁶.

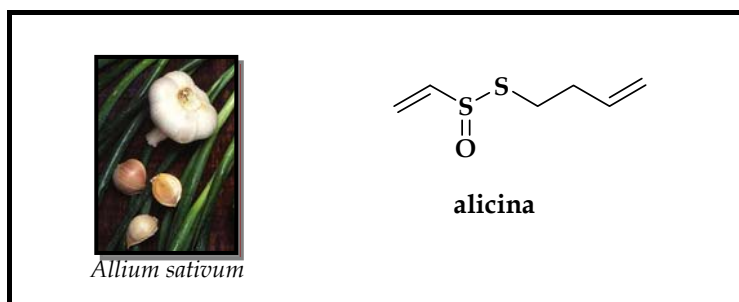


Figura 6.2.2. La alicina principio activo del ajo.

En la bibliografía existen numerosos ejemplos de metabolitos secundarios aislados de plantas superiores con actividad antimicrobiana. Estos pertenecen a diferentes familias químicas: fenoles, polifenoles, quinonas, flavonoides, flavonas, taninos, cumarinas, terpenos y alcaloides¹⁷. En la fig. 6.2.3. se muestran los ejemplos más representativos y la actividad de cada uno de ellos.

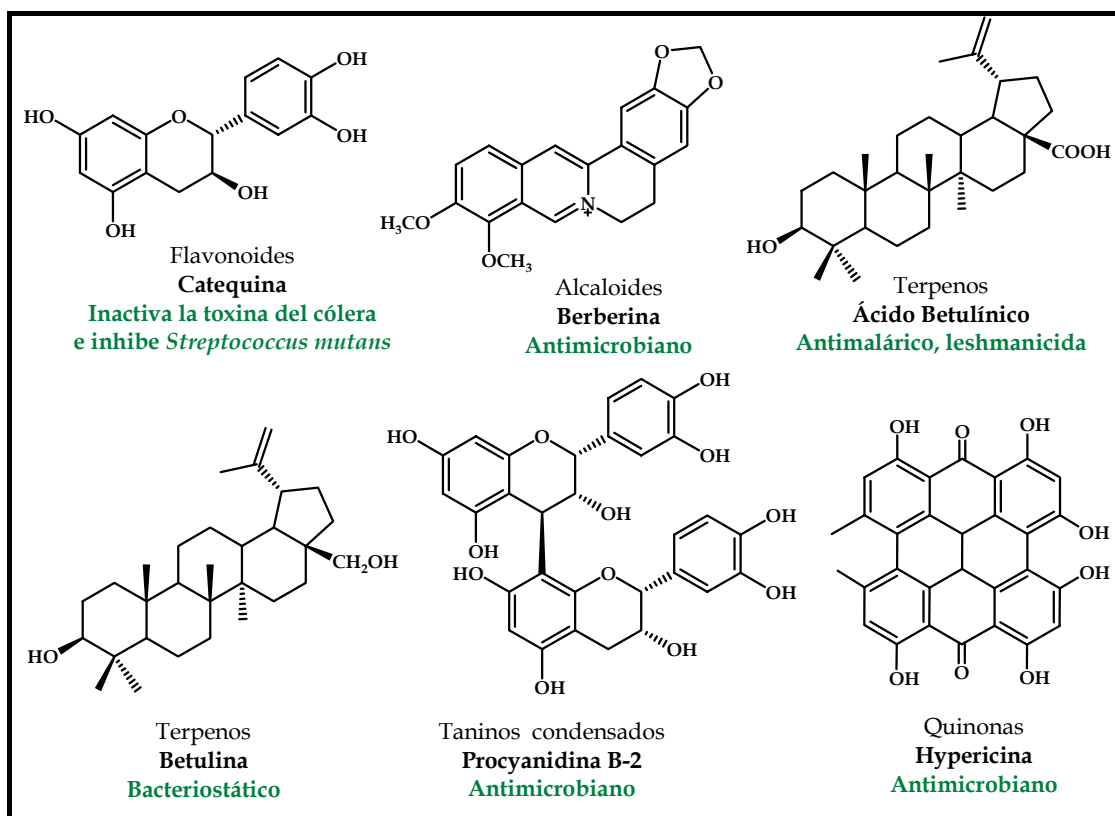


Figura 6.2.3. Metabolitos aislados de plantas superiores con actividad antimicrobiana.

¹⁶ Harris, J. C.; Cottrell, S. Plummer, S. Lloyd, D. *Appl. Microbiol. Biot.* **2001**, 57, 282-286.

¹⁷ Cowan, M. M. *Clin. Microbiol. Rev.* **1999**, 12, 564-582.

Las plantas de la familia solanáceas son conocidas por su alto contenido en alcaloides con actividad antimicrobiana. Así, un estudio de las distintas partes de *Solanum dulcamara* se aislaron los alcaloides: solanina (a partir de frutos inmaduros), solasodina (de flores) y β -solamarina (de raíces), metabolitos que fueron evaluados frente a bacterias patógenas para el hombre, resultando activos frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, aunque no se observó efecto sobre *Enterobacter aerogenes*¹⁸.

Se ha descrito también la actividad antimicrobiana de withanolidas, frecuentes en especies de la familia Solanaceae. En 2002 se aisló del extracto acetónico de los frutos de *Withania somnifera*, la 4-deoxiwithaperuvina, que presentó actividad antimicrobiana frente a distintas bacterias como *Bacillus cereus*, *Streptomyces sp* y *Pseudomonas fluorescens*¹⁹, entre otras. Existen también trabajos menos recientes que describen la actividad antimicrobiana de withanolidas, en 1980 se evaluó la actividad de la withanolida D y de withaferina A²⁰. Así mismo, en 1987 se aislaron de *Physalis peruviana* una serie de withanolidas que mostraron potencial antimicrobiano²¹.

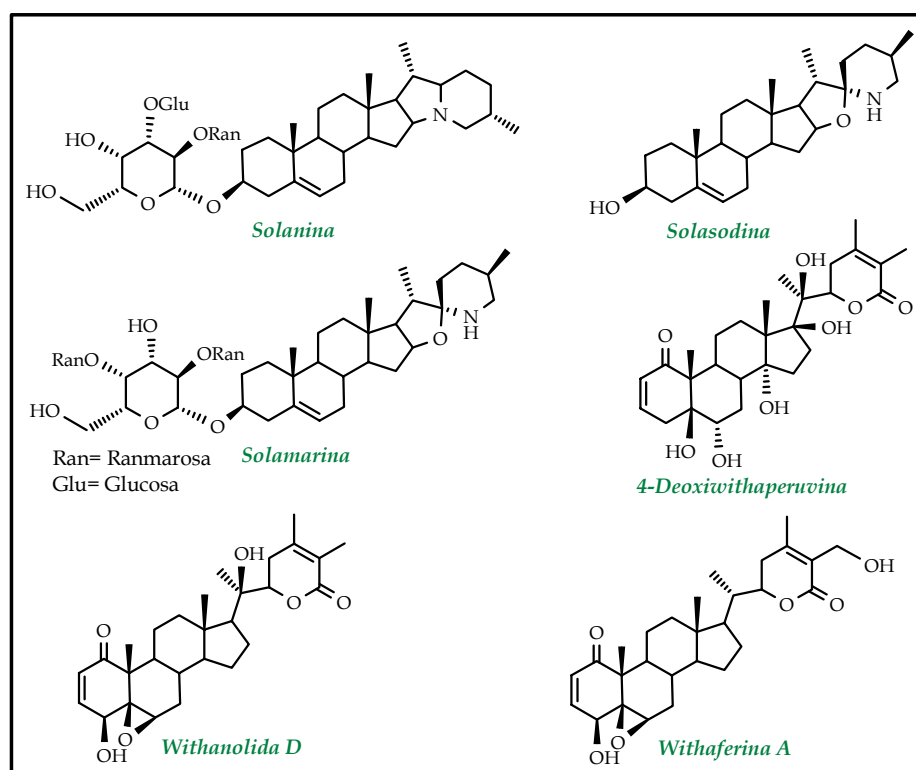


Figura 6.2.4. Metabolitos aislados de especies de la familia Solanaceae con actividad antimicrobiana.

¹⁸ Kumar, P.; Sharma, B.; Bakshi, N. *Nat. Prod. Res., Part B: Bioactive Natural Products*. **2009**, 23 (8), 719.

¹⁹ Abou-Douh, A. M. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **2002**, 6, 267.

²⁰ Chatterjee, S.; Chakraborti, S. K. *Antonie van Leeuwenhoek*. **1980**, 46, 59.

²¹ Zaki, A. Y.; El-Alfy, T. S. M.; El Gohary, H. M. A. *Egypt. J. Pharm. Sci.* **1987**, 28, 235.

Ante la necesidad de nuevos agentes antimicrobianos y con los antecedentes anteriormente descritos, se evaluó la actividad antimicrobiana de los extractos de hojas y tallos de *Withania aristata* y de los metabolitos aislados de esta, así como de sus derivados.

6.2.3. Resultados y discusión

Se evaluó la actividad antimicrobiana de los extractos de *W. aristata* obtenidos con disolventes de diferente polaridad, con el fin de seleccionar aquel o aquellos de mayor interés para su posterior estudio fitoquímico. Estos ensayos fueron realizados en el Departamento de Microbiología y Biología Celular de la Universidad de La Laguna por la Lda. Liliana Araujo Baptista bajo la dirección de la Dra. Laila Moujir.

La planta fue separada en hojas y tallos para su extracción. Se obtuvieron así los siguientes extractos que fueron evaluados:

- Extracto de hojas en *n*-hexano: H-H
- Extracto de hojas en diclorometano: H-D
- Extracto de hojas en acetato de etilo: H-A
- Extracto de hojas en etanol: H-E
- Extracto de tallos en *n*-hexano: T-H
- Extracto de tallos en diclorometano: T-D
- Extracto de tallos en acetato de etilo: T-A
- Extracto de tallos en etanol: T-E

Se ensayó la actividad antimicrobiana empleando los siguientes microorganismos:

- Bacterias Gram positivas: *Staphylococcus aureus* ATCC6538, *S. epidermis* CECT232, *S. saprophyticus* CECT335, *Bacillus subtilis* CECT39, *B. cereus* CECT496, *Enterococcus faecalis* CECT481.
- Bacterias Gram negativas: *Escherichia coli* CECT99, *Proteus mirabilis* CECT170, *P. aeruginosa* CECT118, *Salmonella* sp. CECT456.
- Levadura: *Candida albicans* UBC1.

Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) y bactericida (CMB) de los extractos y compuestos, previamente disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO),

mediante el método de microdilución en medio líquido, utilizando placas de 96 pocillos y siguiendo la metodología descrita en diversas publicaciones^{22,23}.

Los resultados obtenidos de la evaluación antimicrobiana de los diferentes extractos de *W. aristata* se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 6.2.1. Actividad antimicrobiana en $\mu\text{g/ml}$ frente a bacterias Gram positivas de extractos de *W. aristata*

Extracto	<i>S. aureus</i>		<i>S. epidermidis</i>		<i>B. subtilis</i>		<i>B. cereus</i>	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
H-H	>400	>400	>400	>400	200-100	300	30-10	50
H-D	200-100	>400	300-200	>400	50-30	50	50-30	50
H-A	>400	>400	>400	>400	100-50	100	100-50	100
H-E	>400	>400	>400	>400	300-200	400	300-200	400
T-H	>400	>400	>400	>400	300-200	300	100-50	100
T-D	>400	>400	>400	>400	300-200	300	200-100	200
T-A	>400	>400	>400	>400	300-200	300	200-100	200
T-E	>400	>400	>400	>400	300-200	300	200-100	200
^a Control	2.5	>10	2.5	>20	8	>20	10	>20

- H-H: extracto de hojas en *n*-hexano; H-D: extracto de hojas en diclorometano; H-A: extracto de hojas en acetato de etilo; H-E: extracto de hojas en etanol; T-H: extracto de tallos en *n*-hexano; T-D: extracto de tallos en diclorometano; T-A: extracto de tallos en acetato de etilo; T-E: extracto de tallos en etanol. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

- ^aCefotaxima fue usado como control positivo. CMI > 400 $\mu\text{g/ml}$ frente a *S. saprophyticus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, *Salmonella sp* y *C. albicans*.

Como puede observarse en la tabla 6.2.1., los extractos resultaron ser activos sólo frente a las bacterias esporuladas, a excepción del extracto de las hojas en diclorometano (H-D), que lo fue también frente a *S. aureus* y *S. epidermidis*, resultando además ser el extracto que presentó una mayor actividad antimicrobiana. Sin embargo, ninguno de los extractos fue activo frente a las bacterias Gram negativas ensayadas y la levadura *C. albicans* (CMI > 400 $\mu\text{g/ml}$).

²² Charibi, D. S.; Giron, S.; Michel, G. J. *Peridontal Res.* **1990**, 25, 201.

²³ Núñez, M. J.; Reyes, C. P.; Jiménez, I. A.; Moujir, L.; Bazzocchi, I. L. *J. Nat. Prod.* **2005**, 68, 1018.

Una vez evaluada la actividad biológica de los extractos, se seleccionó el extracto de diclorometano para su posterior análisis fitoquímico, tal como se indica en la parte experimental (Apartado 4.1.3.), con la finalidad de aislar e identificar los metabolitos presentes. Siguiendo este objetivo, se evaluaron por su actividad antimicrobiana las veinte withanolidas naturales que se detallan a continuación:

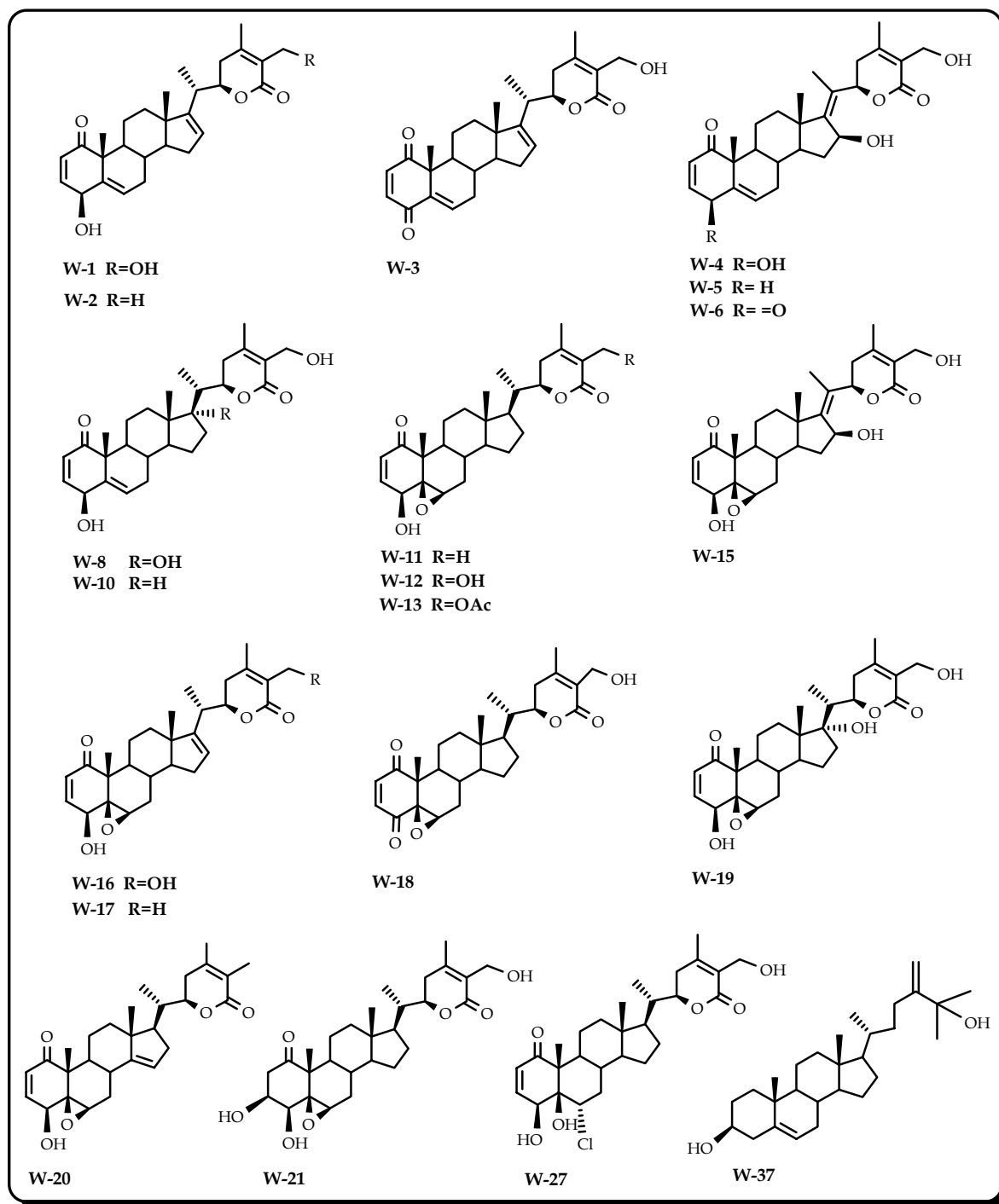


Figura 6.2.5. Metabolitos aislados de *W. aristata* evaluados por su actividad antimicrobiana.

Los resultados obtenidos de la evaluación de la actividad de dichos metabolitos se recogen en la siguiente tabla:

Tabla 6.2.2. Actividad antimicrobiana expresada en $\mu\text{g/ml}$ frente a bacterias-Gram positivas de las withanolidas aisladas de *W. aristata*

Prod	Bacterias											
	<i>S. aureus</i>		<i>S. epidermidis</i>		<i>S. saprophyticus</i>		<i>B. subtilis</i>		<i>B. cereus</i>		<i>E. faecalis</i>	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
W-2	>40	>40	>40	>40	>40	>40	25-20	30	28-24	28	>40	>40
W-3	>40	>40	>40	>40	>40	>40	40-20	40	>40	>40	>40	>40
W-11	12-10	40	18	>40	9	>40	5-4	5	7-6	7	10	>40
W-12	20	>40	>40	>40	20	>40	15	>40	14-12	>40	28-24	>40
W-18	40-20	>40	20-10	>40	10-5	>40	20-10	20	40-20	40	20-10	>40
W-27	>40	>40	20	>40	>40	>40	20-10	20	40-20	40	>40	>40
W-37	>40	>40	>40	>40	>40	>40	20-10	20	40-20	40	>40	>40
Control ^a	2.5	>10	2.5	>20	0.625	5	8	>20	10	>20	>20	>20

-Los ensayos fueron realizados por triplicado.

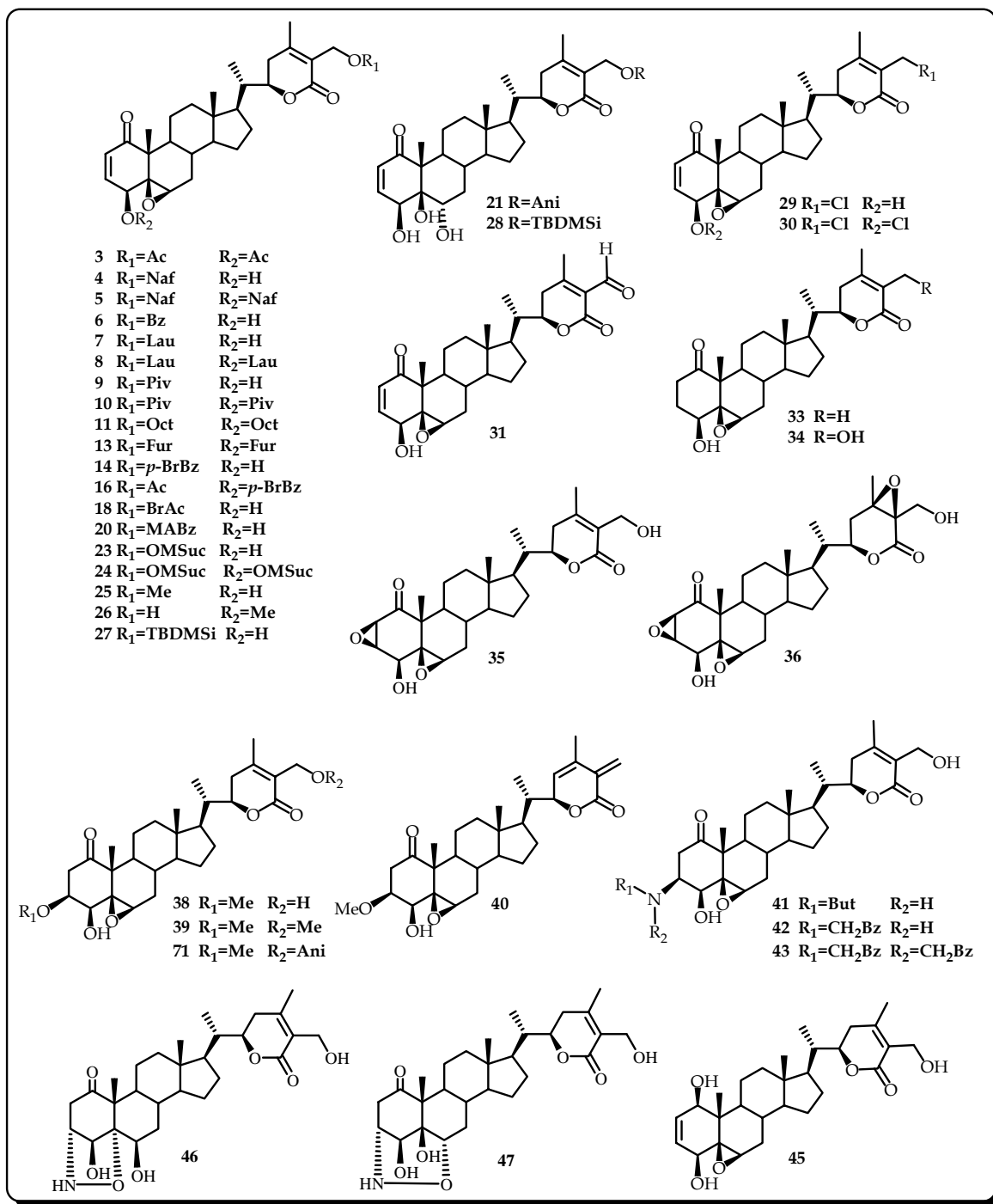
-^aCefotaxima fue usado como control positivo.

-Todos los productos fueron inactivos (CMI > 40 $\mu\text{g/ml}$) frente a las bacterias Gram negativas (*E.coli*, *P. aeruginosa* y *P. mirabilis*) y la levadura, *C. albicans*.

Tal como puede observarse en la Tabla 6.2.2., siete de las veinte withanolidas naturales ensayadas, mostraron actividad frente a las bacterias Gram-positivas, comportándose como sustancias de espectro medio. Las bacterias Gram-negativas y la levadura (*C. albicans*) utilizadas en este ensayo resultaron ser insensibles a este tipo de sustancias, al menos hasta 40 $\mu\text{g/ml}$. Cabe destacar que **W-11**, **W-12** y **W-18** mostraron actividad frente a las bacterias *S. aureus* y *E. faecalis* que presentan resistencia a la mayoría de los antibióticos utilizados hoy en día^{59,60}.

Por otra parte, **W-11** presenta un mecanismo bactericida frente a las bacterias esporuladas, ya que muestra diferencias entre CMI y CMB menor de dos diluciones, mientras que frente a los cocos debe presentar un mecanismo de acción bacteriostático, dada la mayor diferencia existente entre estos dos parámetros. Los compuestos **W-2**, **W-3**, **W-27** y **W-37**, se comportaron como sustancias de espectro reducido, ya que sólo mostraron actividad frente a las bacterias esporuladas (CMI comprendida entre 40 y 10 $\mu\text{g/ml}$) y al igual que **W-11**, su mecanismo de acción frente a estas bacterias debe ser bactericida.

Una vez evaluada la actividad biológica de los productos naturales, se prepararon una serie de derivados de las withanolidas naturales, tal como se indica en la parte experimental (apartado 5.3.), con la finalidad de profundizar en el estudio de relación estructura actividad. Siguiendo este objetivo fueron evaluados cincuenta y cuatro derivados, cuyas estructuras se presentan a continuación:



Continúa en la siguiente página

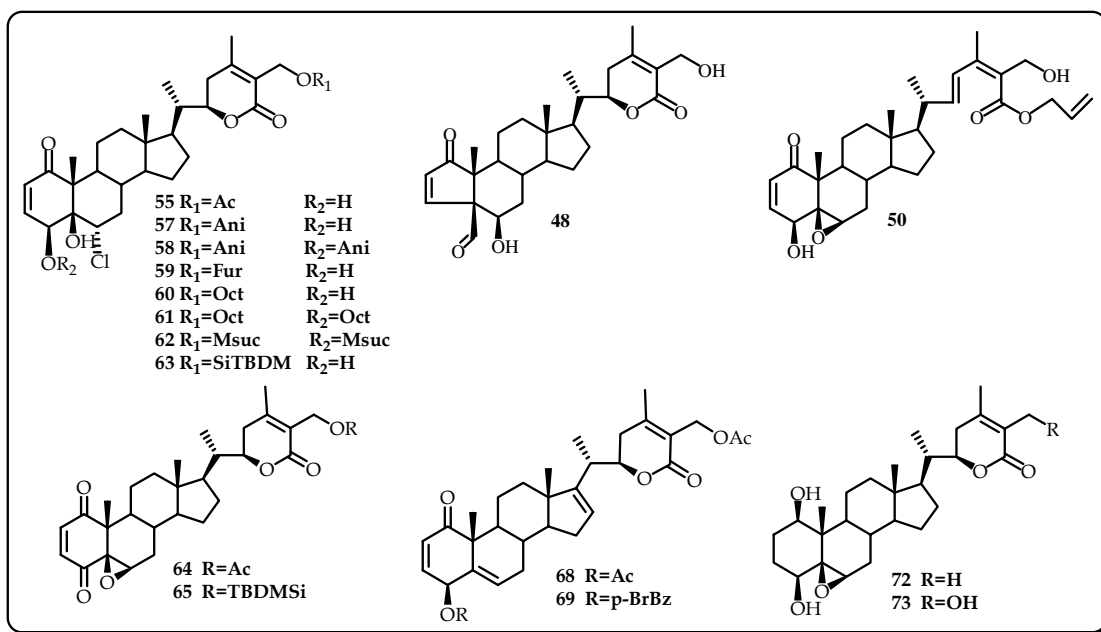


Figura 6.2.6. Derivados evaluados por su actividad antimicrobiana.

Los resultados obtenidos de la evaluación de la actividad antimicrobiana de dichos derivados se recogen en la siguiente tabla:

Tabla 6.2.3. Actividad antimicrobiana en $\mu\text{g/ml}$ frente a bacterias Gram-positivas de los derivados de las withanolidas aisladas.

Prod	Bacterias											
	<i>S. aureus</i>		<i>S. epidermidis</i>		<i>S. saprophyticus</i>		<i>B. subtilis</i>		<i>B. cereus</i>		<i>E. faecalis</i>	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
3	40	>40	10-5	>40	10-5	>40	2.5-1.25	2.5	10-5	>40	10-5	>40
6	>40	>40	>40	>40	>40	>40	5-2.5	5	20-10	40	>40	>40
9	>40	>40	>40	>40	>40	>40	5-2.5	10	>40	>40	>40	>40
18	>40	>40	>40	>40	>40	>40	20-10	20	20-10	20	>40	>40
23	>40	>40	>40	>40	>40	>40	20-10	20	40-20	40	>40	>40
24	>40	>40	>40	>40	>40	>40	5-2.5	5	20-10	>40	>40	>40
25	40-20	>40	40-20	>40	40-20	>40	10-5	10	20-10	20	40-20	>40
26	40-20	>40	40-20	40	40-20	>40	10-5	10	10-5	20	40-20	>40
29	20-10	20	20-10	40	40-20	>40	10-5	10	10-5	10	40	>40
31	20-10	20	40	>40	>40	>40	10-5	10	20-10	20	>40	>40
50	>40	>40	>40	>40	40-20	>40	10-5	10	10-5	10	20-10	>40
65	>40	>40	5-2.5	10	20-10	>40	1.25-0.625	5	20-10	40	5	>40
Control ^a	2.5	>10	2.5	>20	0.625	5	8	>20	10	>20	>20	>20

^a-Cefotaxima fue usado como control positivo. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

-Todos los productos fueron inactivos (CMI > 40 $\mu\text{g/ml}$) frente a las bacterias Gram negativas (*E.coli*, *P. aeruginosa* y *P. mirabilis*) y la levadura *C. albicans*.

Trece de los cincuenta y cuatro derivados evaluados resultaron ser activos frente a las bacterias Gram-positivas, siendo *B. subtilis* y *B. cereus*, las bacterias más sensibles a su acción. Los compuestos **3** y **65**, fueron los más activos, presentando valores de CMI (entre 2.5 y 1.25 $\mu\text{g/ml}$), mostrando incluso mayor actividad que la cefotaxima, utilizada como control frente a las bacterias esporuladas (Tabla 6.2.3). Estos dos derivados se comportaron como sustancias de espectro medio, siendo activos frente a todas las bacterias Gram-positivas evaluadas, excepto frente a *S. aureus*.

Cabe destacar que todos los derivados con actividad frente a las bacterias del género *Bacillus*, presentan un mecanismo de acción bactericida, lo que se deduce de la diferencia existente entre los valores de CMI y CMB. Por otra parte y al igual que las withanolidas naturales, todos los derivados evaluados fueron inactivos frente a las bacterias Gram-negativas y la levadura *C. albicans* (CMI > 40 $\mu\text{g/ml}$).

Estudio de la relación estructura-actividad (SAR)

Dado el número de compuestos evaluados, tanto naturales (veinte) como derivados (cincuenta y cuatro), nos pareció interesante realizar un estudio de la relación estructura-actividad.

- ❖ Un requisito estructural esencial para la expresión de la actividad es la presencia del sistema 2-en-1-ona en el anillo A. Ello se pone de manifiesto al comparar la actividad de **W-12** con los productos inactivos **45** (que presenta OH-1), **W-21** (OH-3), **38** (OMe-3), **34** (no presenta $\Delta^{2,3}$), **35** (epóxido C2-C3) y **41-43** (amina en C-3).
- ❖ Al comparar **W-1** (OH-4) con **W-3** (cetona en C-4), **27** (OH-4) con **65** (cetona en C-4) y **W-12** (OH-4) con **26** (OMe-4), observamos que una cetona en C-4, juega un papel relevante en la actividad. Los resultados también muestran que la contracción del anillo A afecta de forma negativa a la actividad (**W-12 versus 48**).
- ❖ Para la expresión de la actividad es indispensable también el epóxido en los carbonos C5-C6 del esqueleto de withanolida, lo que se pone de manifiesto al comparar la actividad de **W-12** (epóxido C5-C6) con los productos **W-10** (presenta $\Delta^{5,6}$) y **W-27** (OH-5, Cl-6), que resultaron inactivos ($\text{CI}_{50} > 40 \mu\text{g/ml}$).

- ❖ La presencia de dobles enlaces en el anillo D afecta de forma negativa a la actividad, tal como se observa al comparar **W-11** con **W-17** (presenta $\Delta^{16,17}$) y con **W-20** (presenta $\Delta^{14,15}$) y al comparar la actividad de **W-12** con la de **W-16** (presenta $\Delta^{16,17}$). De igual forma, se observa que un grupo hidroxilo en C-17 (**W-12** versus **W-19**) y/o un sistema 17-en-16-ol (**W-12** versus **W-15**), hace que se pierda la actividad.
- ❖ Los resultados mostraron que las sustituciones sobre el carbono C-27 del anillo lactónico afecta negativamente la actividad, tal como se observa al comparar **W-11** con **W-12** (OH-27), **25** (OMe-27), **27** (TBDMSiO-27) y **29** (Cl-27) y al comparar **W-12** con cualquiera de sus análogos esterificados en esta posición.

De este análisis preliminar de la relación estructura-actividad, podemos concluir que la withanolida hipotética como potencial agente antimicrobiano debe reunir los siguientes requisitos estructurales:

- Un sistema 2-en-1,4-diona en el anillo A.
- Un epóxido en los carbonos C5-C6 del anillo B.
- La ausencia de dobles enlaces y grupos hidroxilos en el anillo D y la cadena lateral.
- Un metilo en el carbono C-27 del anillo lactónico.

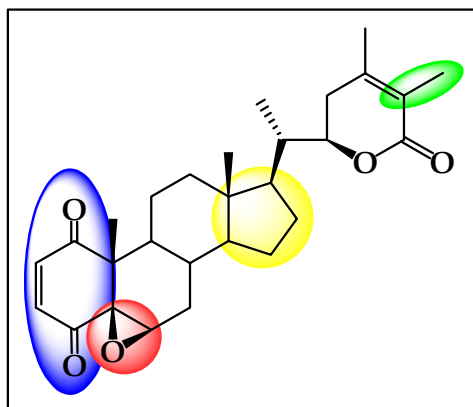
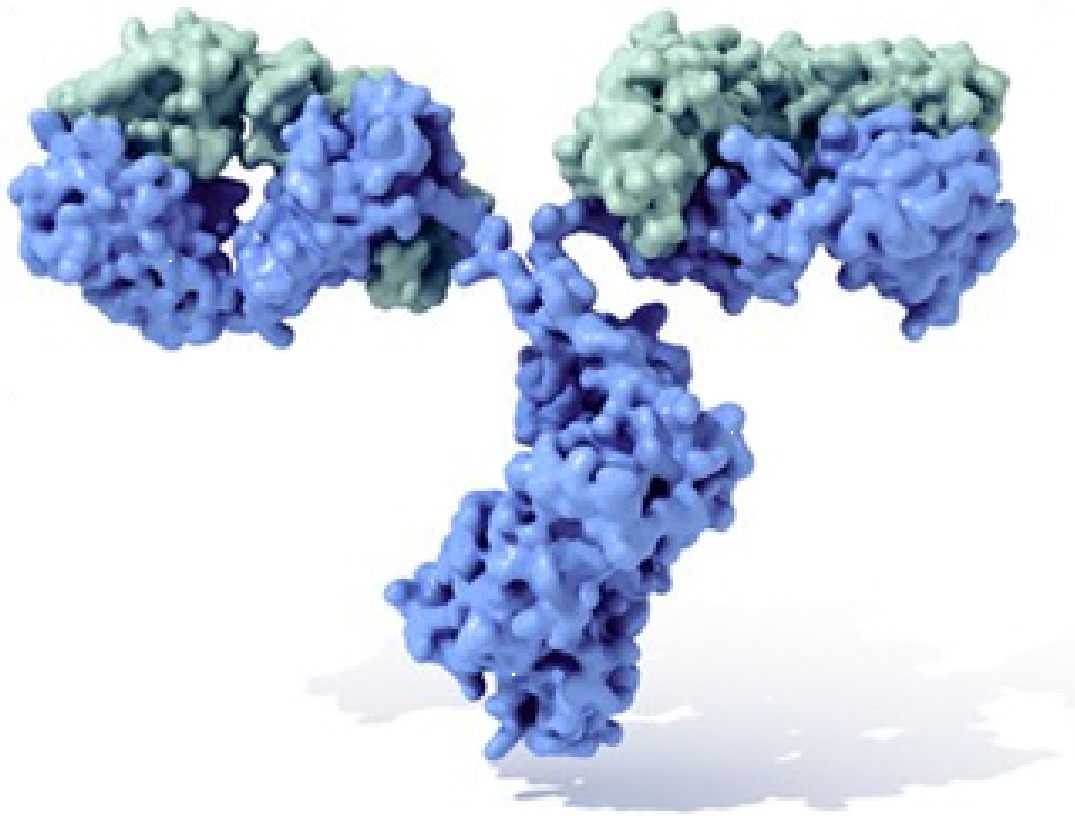


Figura 6.2.7. *Withanolida con los requisitos estructurales idóneos para potenciar la actividad antimicrobiana*

Estos resultados nos orientan en la búsqueda de compuestos prometedores como antimicrobianos y los esfuerzos futuros estarán dirigidos hacia la obtención de derivados de withanolidas con los requisitos estructurales planteados.



6.3. Actividad inmunomoduladora

6.3. Actividad inmunomoduladora

6.3.1. Introducción

La principal función fisiológica del sistema inmune es proteger al huésped contra microbios patógenos. El sistema inmune comprende una red de células y moléculas (anticuerpos y citocinas), que interactúan entre sí y que expresan dos niveles de reconocimiento molecular.

En el primer nivel están los mecanismos pertenecientes a la inmunidad denominada no específica o innata, que se basan en la capacidad para discriminar entre estructuras propias del organismo y estructuras extrañas o propias alteradas. En un segundo nivel están los mecanismos pertenecientes a la inmunidad específica o adquirida, capaces de reconocer individualmente estructuras específicas, llamadas determinantes antigénicos o epítomos, independientemente de su procedencia propia o extraña. Ambos tipos de inmunidad incluyen mecanismos moleculares (clásicamente llamados "humorales") y otros protagonizados por células¹. Las principales diferencias entre ambas respuestas son los mecanismos y los tipos de receptores usados para el reconocimiento de antígenos.

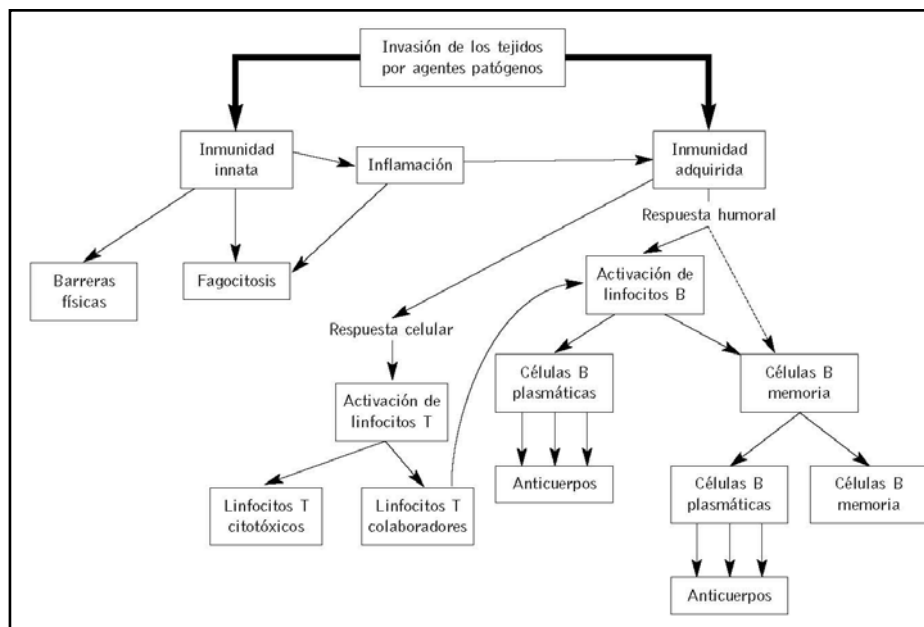


Figura 6.3.1. Procesos que tienen lugar en el organismo como respuesta ante la invasión de agentes patógenos.

¹ Fleisher, T. A.; Bleasing, J. J. *Pediatr. Clin. North Am.* **2000**; *47*, 1197.

Inmunidad innata o no específica: El mecanismo celular no específico principal es, sin duda, la fagocitosis de partículas extrañas, que corre a cargo de células especializadas: macrófagos y neutrófilos. Su capacidad para reconocer estructuras superficiales de microorganismos² patógenos se debe a la existencia de receptores que reconocen motivos moleculares conservados a través de los cambios adaptativos promovidos por las mutaciones microbianas. Estos motivos son los denominados PAMPs. Los receptores que reconocen PAMPs se denominan PRRs³ (pattern recognition receptors), los cuales pueden ser solubles o estar en la superficie de células implicadas en la inmunidad, como macrófagos⁴.

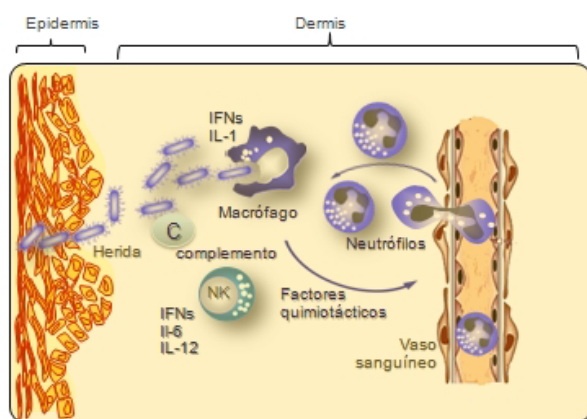


Figura 6.3.2. Principales acciones como respuesta inmune a una herida, las bacterias atraviesan la herida y son destruidas por intervención del complemento, fagocitosis, NK y otros factores como interferones.

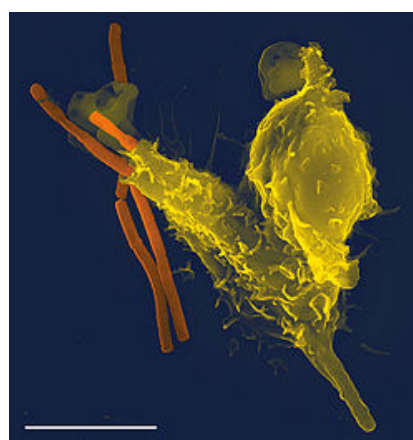


Figura 6.3.3. Imagen de microscopio electrónico de barrido de un neutrófilo (amarillo) engullendo la bacteria del carbunco (naranja).

Inmunidad específica: La Inmunidad Específica o Adquirida se divide a su vez en dos tipos: Inmunidad Humoral (mediada por anticuerpos) e Inmunidad Celular (mediada por linfocitos)⁵. Los linfocitos son las células responsables de la inmunidad específica, estas células poseen en su superficie receptores que reconocen epítomos específicamente. Los antígenos son sustancias que poseen epítomos y que reúnen las condiciones necesarias (tamaño suficiente, biodegradabilidad) para inducir la activación de los linfocitos, iniciando así una respuesta inmune.

² Medzhitov, R.; Janeway, C. N. *Eng. J. Med.* **2000**, 343, 338.

³ Lebedev, K. A.; Ponyakina, I. D. *Biology Bulletin.* 2006, 33(5), 417.

⁴ Trinchieri, G. *Curr Opin Immunol.* **1997**, 9, 17.

⁵ Barbieri, P. G.; Flores, G. J.; Vignoletti, F. *Av. Periodon. Implantol.* **2005**, 17 (1), 11.

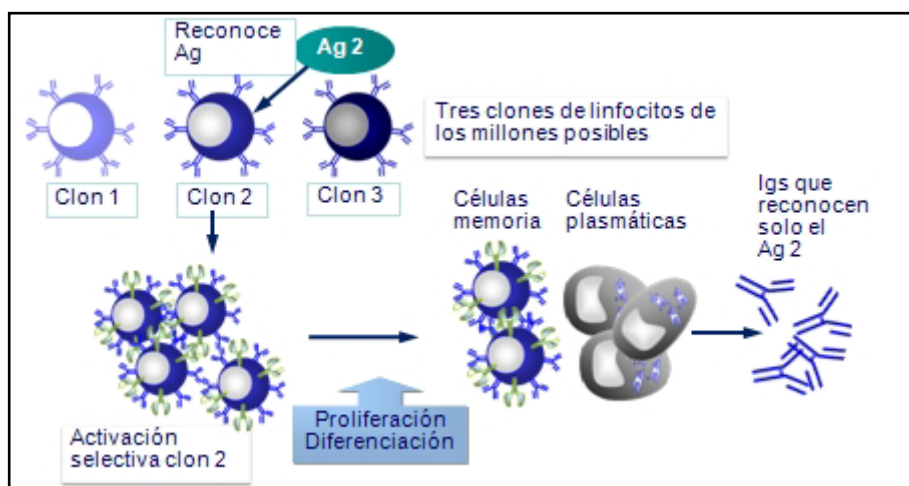


Figura 6.3.4. Representación de la teoría clonal de Burnet, en la que cada antígeno estimula a aquel linfocito o grupos de linfocitos que tienen en su membrana receptores capaces de reconocer y unirse específicamente a él. En este caso el Ag2 estimula selectivamente los linfocitos que tienen capacidad para su reconocimiento (Clon 2).

Los linfocitos B, que en los mamíferos proceden de la médula hematopoyética, responden ante el estímulo antigénico, transformándose en células productoras de anticuerpos. Los linfocitos T, cuya maduración ocurre en el timo, se organizan en varias subpoblaciones: células T_{H1} , implicadas en reacciones inflamatorias y en la activación de macrófagos; células T_{H2} , cuya cooperación es necesaria, en la mayoría de los casos, para que las células B respondan frente a los antígenos que reconocen; células T citotóxicas o CTL (citotoxic T lymphocytes), que destruyen a las células portadoras de antígenos. Unos complicados mecanismos de control impiden que el sistema inmune protagonice respuestas autodestructivas, para lo cual los linfocitos que reconocen antígenos propios son eliminados antes de alcanzar la madurez, o permanecen inhibidos por procesos de tolerancia. Los fallos que pueden ocurrir en estos mecanismos de control son causa de enfermedades autoinmunes.

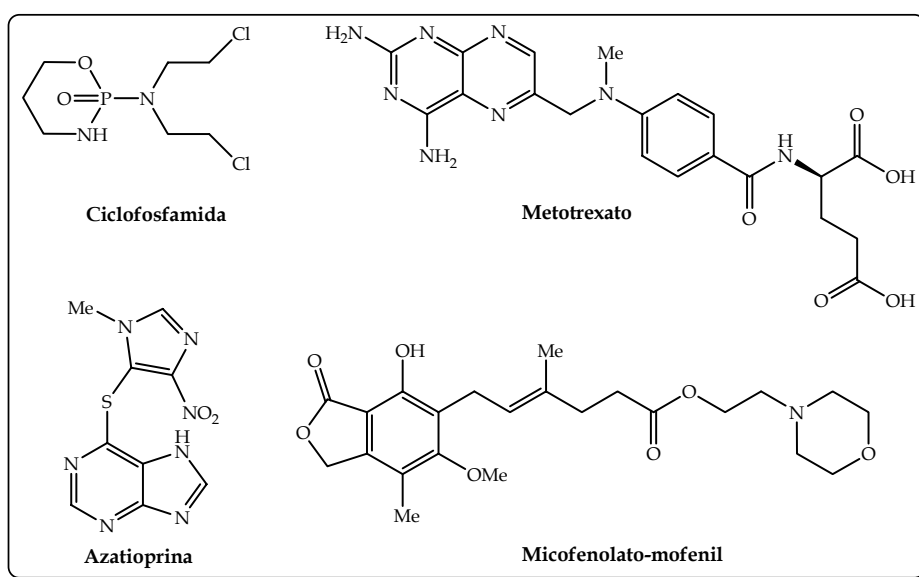
6.3.1.1. Inmunosupresión

Como ya se ha mencionado anteriormente, los fallos en los mecanismos de inducción de tolerancia frente a antígenos propios son la causa de enfermedades autoinmunes. La terapia ideal frente a estas enfermedades es la supresión específica de las respuestas autoagresivas. Por otra parte, el desarrollo de las técnicas quirúrgicas hacen que cada vez sean más los enfermos que se benefician de transplantes de órganos y tejidos, en los que, pese a una cuidadosa selección de los pares

donante/receptor, el sistema inmune del receptor reconoce y responde frente a los antígenos no compatibles presentes en las células del órgano transplantado. También en estos casos la solución es suprimir las respuestas inmunes.

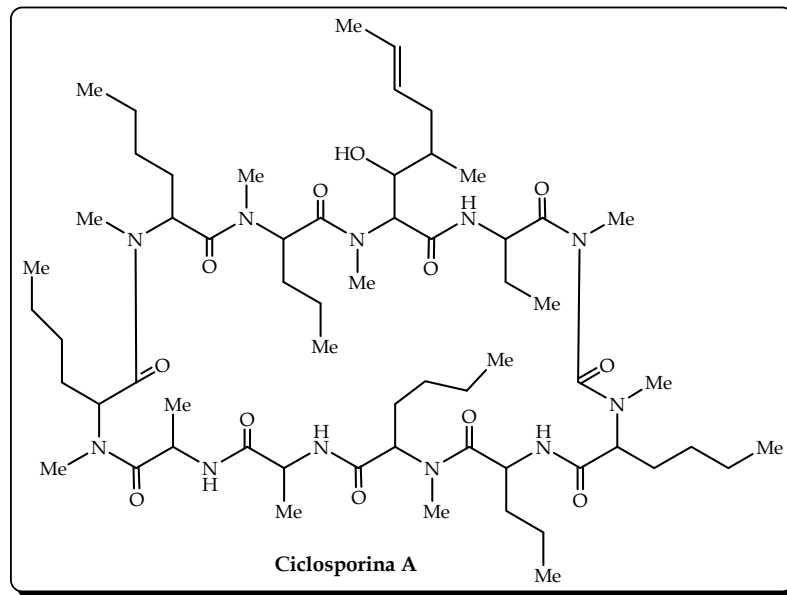
Los fármacos inmunosupresores pueden actuar a distintos niveles:

- **Bloqueo de la síntesis de ADN:** Las alteraciones del ADN impiden su replicación y transcripción, mientras que la del ARN afecta a la traducción, y por tanto a la síntesis proteica. Presentan este mecanismo los agentes alquilantes como la ciclofosfamida que suele usarse como antitumoral frente a diversos tumores. La ciclofosfamida también se utiliza a dosis más bajas que en el caso anterior, como inmunosupresor, en el control del rechazo de órganos transplantados. Los antimetabolitos del ácido fólico como el metotrexato actúa como cofactor enzimático necesario para la síntesis de *ново* de las purinas, tiene poca utilidad en transplantes pero se ha convertido en uno de los inmunosupresores preferidos para patologías de origen autoinmune, debido a la relativa ausencia de efectos adversos. Otros fármacos inmunosupresores son los antimetabolitos de bases púricas (azatioprina, micofenolato-mofetil) y pirimidínicas.

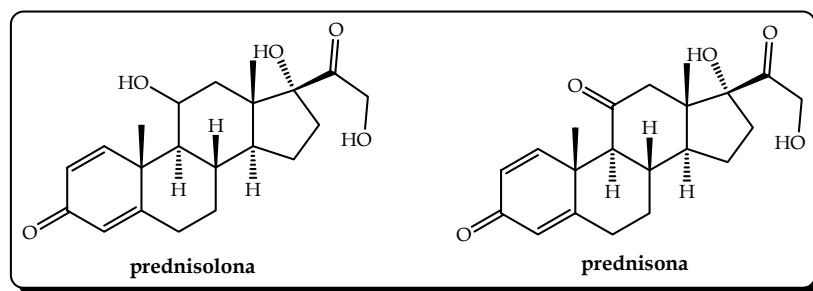


- **Inhibición de la activación de linfocitos:** Este es el mecanismo de acción de los inmunosupresores más importantes, no citotóxicos, entre las que destacan por sus aplicaciones terapéuticas la ciclosporina A y el macrólido denominado FK506 o tacrolimus, comercializado con el nombre de Prograf®, de uso hospitalario.

La ciclosporina A es un decapeptido cíclico, producido por el hongo *Tolypocladium inflatum*, posee un efecto inmunosupresor selectivo que afecta a las primeras fases de activación del sistema inmune, inhibiendo la producción de las citocinas necesarias para la activación de las células T. Se suele usar como control en el rechazo de trasplantes y en otras enfermedades autoinmunes como la psoriasis, artritis y reumas. El tacrolimus sigue el mismo mecanismo que la ciclosporina A.



- **Alteración de la recirculación y distribución de linfocitos e inhibición de las respuestas inflamatorias:** Este es el principal mecanismo de acción de los corticoides y moléculas sintéticas relacionadas (prednisolona, prednisona). Hay que tener en cuenta que las hormonas esteroidales regulan, mediante su unión a receptores intracelulares, la expresión de un gran número de genes (alrededor del 1% del genoma). Por ello, la acción de los fármacos antiinflamatorios es muy compleja, y existen diversos efectos colaterales, como la retención de líquidos, aumento de peso, desmineralización ósea, adelgazamiento de la piel, aumento de la glucemia, hiperlipemia, hipertensión, etc. Los corticoides se han empleado en combinación con otros agentes en trasplantes de órganos, así como en el tratamiento de las manifestaciones de hipersensibilidad inmediata, especialmente el asma y en enfermedades autoinmunes con patologías inflamatorias.



6.3.1.2. Inmunopotenciación

A los inmunopotenciadores se les atribuyen funciones importantes en las inmunodeficiencias de algunos tipos de infecciones virales y bacterianas, en especial en el tratamiento del cáncer cuando las radiaciones y los medicamentos anticancerosos rompen el equilibrio del sistema inmune⁶. Estos agentes, generalmente, son combinados con la quimioterapia y radioterapia o después de ésta, denominándose al tratamiento inmunokuimioterapia⁷.

Las sustancias capaces de aumentar la intensidad de los mecanismos inmunitarios suelen presentar una actividad multifuncional, que incide de forma diversa en la compleja red de interacciones entre las células y las moléculas del sistema inmune, por lo que sus efectos, más que potenciadores, son inmunomoduladores. Esta concepción es la que se recoge en la denominación de “BRM” (biological response modifiers).

- **BRM endógenos:** La capacidad de respuesta del sistema inmune, tanto en los mecanismos innatos como en los específicos, requiere de la transferencia de información entre células, mediante contacto célula-célula, por juegos de moléculas ubicadas en sus superficies y que actúan como ligandos y receptores, las cuales inician la señal bioquímica que se transmite desde la superficie celular hasta el núcleo, hasta activar la descripción de determinados genes. Estos mensajeros implicados en la inmunidad son las citocinas, estas glicoproteínas inmunoreguladoras secretadas por las células han sido producidas por ingeniería genética, como proteínas recombinantes, lo que facilita su uso como inmunofármacos.

⁶ Takx Kohlen, B. C. *Weebi Sci.* **1992**, *14*, 24.

⁷ Oba, K.; Teramukai, S.; Kobayashi, M.; Matsui, T.; Koderá, Y.; Sakamoto, J. *Cancer Immunol. Immunother.* **2007**, *56*(6), 905.

Las citocinas pueden agruparse en cuatro familias estructurales:

1. Familia de hematopoyetinas: Actúan sobre células madres de médula ósea, promoviendo la diferenciación en neutrófilos. Estas citocinas permiten el reemplazamiento de células fagocitarias perdidas en el curso de las reacciones inflamatorias inducidas por procesos infecciosos, también estimulan la recuperación de la función medular en casos de leucopenia y estimuladores de macrófagos. Lo que ha llevado a la comercialización de citocinas como promotores de leucopoyesis: Granocyte®, Euprotin®, Granulokine®, entre otras fórmulas.

2. Familia de interferones: Los interferones se definen como moléculas que se producen en respuesta a una infección vírica, una vez secretados, se unen a receptores en la superficie de la células vecinas, en la que inducen la transcripción de genes y la producción de compuestos que inhiben la transcripción y producen la degradación del ARN-m, bloqueando la difusión de la infección viral. Los interferones actúan como inmunoreguladores, incrementando el número de antígenos de histocompatibilidad, estimulando la diferenciación de linfocitos B, activando las células NK y son la principal citocina activadora de macrófagos. Los tres interferones humanos se han comercializado como fármacos de origen recombinante, expresados en bacterias manipuladas genéticamente. Así por ejemplo, el Intron, se utiliza frente a las hepatitis B y C crónicas de alta infectividad⁸, en la terapia de enfermedades tumorales.

3. Familia de quimiocinas: Se conocen con esta denominación, un gran número de citocinas con capacidad de atraer, quimiotácticamente, a diversos tipos de células implicadas en la inmunidad⁹. Estas citocinas se unen a receptores en la superficie de las células atrayendo a monocitos, células T, células NK y células dendríticas.

4. Familia de TNF: Los componentes de este grupo son proteínas triméricas¹⁰, que pueden encontrarse de forma soluble o en la superficie celular. La caquexina, es una citocina proinflamatoria, producida por macrófagos, células T y células NK, que induce caquexia en enfermedades infecciosas o tumorales prolongadas. Esta citocina se comercializa con el nombre tasonermina y se usa en el tratamiento de sarcomas de

⁸ Lau, G. K. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2000, 15, E46.

⁹ Viola, A.; Contento, R. L.; Molon, B. *Trends in Immunology*, 2006, 27(9), 421.

¹⁰Kruglov, A. A.; Kuchmiy, A.; Grivennikov, S. I.; Tumanov, A. V.; Kuprash, D. V.; Nedospasov, S. A. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2008, 19(3-4), 231.

extremidades, antes de su amputación quirúrgica, o como paliativo en sarcomas inextirpables.

- **BRM exógenos:** Actúan modulando la producción de BRM endógenos. Existen diversas lipoproteínas bacterianas, ADN procariótico y diversos productos del metabolismo microbiano que poseen una potente actividad inmunoestimuladora, siendo usadas en la actualidad, incluso como vacunas¹¹. El mecanismo de acción no es bien conocido, pero se cree que inducen una reacción inflamatoria, con acumulación de macrófagos, neutrófilos, linfocitos T y secreción de citocinas. Así por ejemplo, el dextrano (una cadena de poliglucosa que se inicia con fructosa) es una sustancia polimérica extracelular de bacterias, el cual actúa como mitógeno para linfocitos B y como estimulador para macrófagos. Además de los BRM de origen microbiano, otras moléculas han mostrado actividad inmunomoduladora con aplicación farmacológica. Es el caso de los derivados imidazólicos, como la isoprinosina, que tiene actividad estimuladora de macrófagos, linfocitos T y células NK.

6.3.2. Productos naturales con actividad inmunomoduladora

Numerosos productos o extractos de plantas han sido usados para estimular la respuesta inmune. Un interesante grupo de derivados con potencial mitogénico, lo constituye las lectinas. Las lectinas son proteínas de origen no inmune que tienen en común la propiedad de enlazarse de forma específica y reversible a carbohidratos¹², con capacidad para aglutinar células y precipitar glicoconjugados. Sus propiedades mitogénicas permiten que se utilicen en estudios *in vivo*, como base de la proliferación de linfocitos en cultivos.

Muchas plantas utilizadas en medicina tradicional han mostrado poseer actividad inmunomoduladora^{13,14}. Algunas de estas plantas estimulan tanto la inmunidad celular como la inmunidad humoral, mientras que otras sólo activan los componentes celulares del sistema inmune, es decir, la función fagocítica sin afectar a la inmunidad celular o humoral. El extracto de hoja de *Picrorhiza kurroa* actúa como estimulante de la respuesta humoral y de la función fagocítica del sistema

¹¹ Bastos, R. G.; Borsuk, S.; Seixas, F. K.; Dellagostin, O. A. *Vaccine*. **2009**, *27*, 6495.

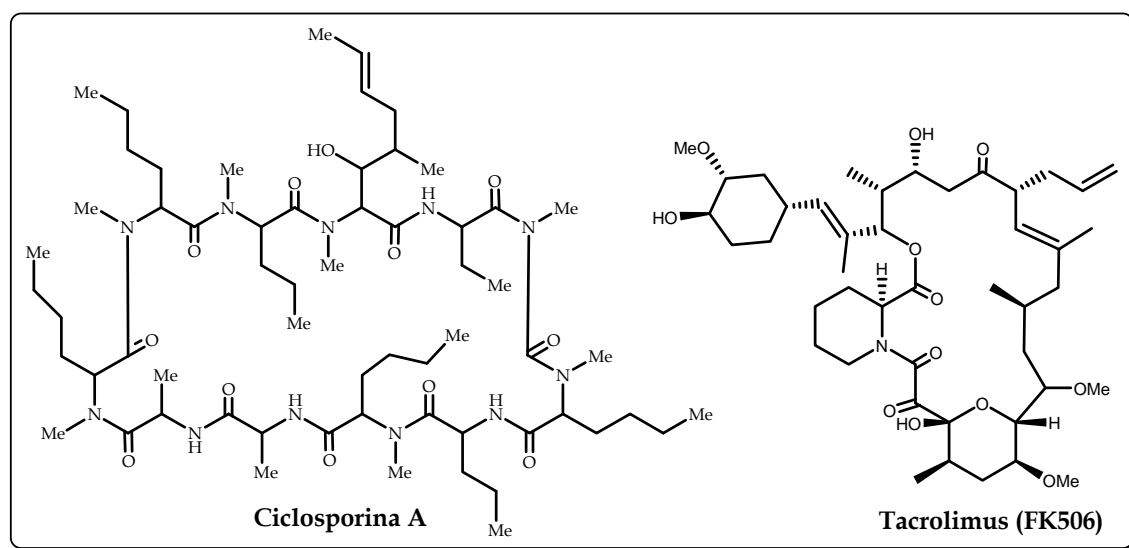
¹² Hoessli, D. C.; Ahmad, I. *Curr. Org. Chem*. **2008**, *12(11)*, 918.

¹³ Wagner, H.; Proksh, A. *Immunostimulatory drugs of fungi and higher plants*. In: Wagner, H. (editor) *Economic and medicinal plant research*. **1985**; Vol.I. Academic Press. London - New York. 113.

¹⁴ Sagrawat, H.; Khan, M. Y. *Pharmacognosy Reviews*. **2007**, *1(2)*, 248.

reticuloendotelial. Algunas de estas plantas también actúan como supresores de la inmunidad celular y humoral^{15,16}.

Hoy en día los trasplantes de hígado, riñón y de médula ósea se realizan casi de forma rutinaria, en ello a jugado un papel fundamental el descubrimiento de la ciclosporina A del hongo *Cylindrocarpon lucidum* en 1970, quien fue uno de los primeros inmunosupresores usados en clínica y que evitaba los temidos rechazos a los órganos transplantados. Desde 1978 ha sido utilizado en más de 200.000 operaciones de trasplante, se han preparado más de 750 análogos pero ninguno ha tenido una actividad superior a éste. También se está evaluando por su eficacia en el tratamiento de enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide, el lupus, enfermedad de Crohn. Otro de los metabolitos aislados de hongos y que se usa en clínica actualmente es el FK506, aislado en 1984 *Streptomyces tsukubaensis*, un producto con una actividad inmunosupresora 100 veces mayor que la ciclosporina A y que entró en uso clínico en 1991, bajo el nombre comercial de tacrolimus¹⁷.



Las plantas producen una amplia gama de productos naturales con actividad antimicrobiana e inmunomoduladora, como por ejemplo isoflavonoides, indoles, fitoesteroles, polisacaridos, sesquiterpenos, alcaloides, taninos y glucanos. Así, de *Tripterygium wilfordii*, que se usa en medicinal tradicional para el tratamiento de la artritis reumatoide, se aisló la triptolida, compuesto que exhibe actividad

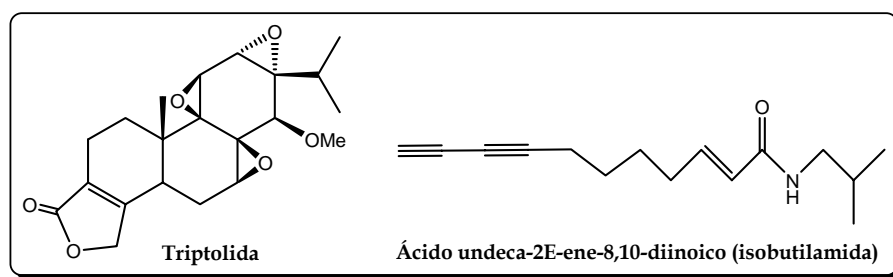
¹⁵ Atal, C. K.; Sharma, M. L.; Kaul, A.; Khajuria, A. J. *Ethnopharmacol.* **1986**, *18*, 133.

¹⁶ Sharma, M. L.; Rao, C.S.; Duda, P. L. J. *Ethnopharmacol.* **1994**, *41*, 185.

¹⁷ Mann, J. *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18*, 417.

inmunosupresora¹⁸, debida a la inhibición de las IL-2 y IFN- γ en células T¹⁹. De *T. wilfordii* se han aislado varios análogos aromáticos de la triptolida, quienes mostraron también efecto inhibidor de la producción citocinas.

Existen tres especies de interés medicinal Del género *Echinacea* (compositae), *Echinacea angustifolia*, *Echinacea purpurea* y *Echinacea pallida*, las cuales se caracterizan por su actividad inmunomoduladora. Estas plantas suelen presentar compuestos bioactivos como derivados fenólicos del ácido caféico, alquilamidas, isobutilamidas, polisacáridos y glicoproteínas^{20,21}. Existen referencias de derivados del ácido caféico y de alquilaminas como inmunoestimulantes. Los polisacáridos de estas especies activan las células del sistema inmune no específico como monocitos, macrófagos, tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo*²².



Withania somnifera es conocida por sus propiedades como inmunomoduladora, en un trabajo llevado a cabo en 2006 por Khan y *col.*²³ se demostró la actividad inmunoreguladora *in vivo* del extracto acuoso de la raíz de esta planta en ratones sometidos a estrés crónico. Los compuestos mas abundantes en este género son las withanolidas, compuestos que también han mostrado actividad inmunomoduladora. Así, se ha descrito la actividad inmunosupresora de la withaferina A y la withanolida E aisladas de *W. somnifera*²⁴ y de las acnistinas A, B y E aisladas de *Dunalia solanacea*²⁵.

¹⁸Qiu, D.; Kao, P.N. *Drugs R. D.* **2003**, *4*, 1.

¹⁹ Matta, R.; Wang, X.; Ge, H.; Ray, W.; Nelin, L. D.; Liu, Y. *Am. J. Transl. Res.* **2009**, *1*, 267.

²⁰ Woelkart, K.; Bauer, R. *Planta Med.* **2007**, *73*, 615.

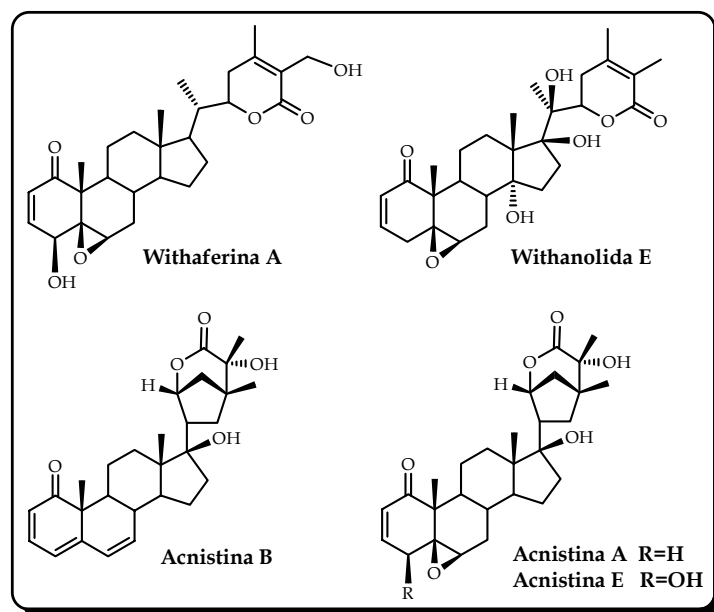
²¹ Patwardhan Bhushan; Gautam M. *Drug discovery today.* **2005**, *10*, 495.

²² Zhai, Z.; Solco, A.; Wu, L.; Wurtele, E. S.; Kohut, M. L.; Murphy, P. A.; Cunnick, J. E. *J. Ethnopharm.* **2009**, *122*, 76.

²³ Khan, B.; Ahmad, S. F.; Bani, S.; Kaul, A.; Suri, K. A.; Satti, N. K.; Athar, M.; Qazi, G. N. *Int. Immunopharmacol.* **2006**, *6*, 1394.

²⁴ Shohat, B.; Kirson, I.; Lavie, D. *Biomedicine.* **1978**, *28*, 18.

²⁵ Luis, J. G.; Echeverri, F.; García, F.; Rojas, M. *Planta Med.* **1994**, *60*, 348.



El colectivo de enfermos inmunocomprometidos es cada vez más numeroso. A ello contribuyen varios componentes: el auge de los transplantes alogénicos, en los que la existencia de incompatibilidades entre el donante y el receptor impone la necesidad de un tratamiento inmunosupresor prolongado; las terapias antitumorales agresivas, con efectos colaterales de mielotoxicidad e inmunodepresión; y la pandemia mundial del SIDA, que ha acumulado enfermos con inmunodeficiencias que no siempre son totalmente restauradas por las terapias retrovirales combinadas de alta eficacia.

6.3.3. Resultados y discusión

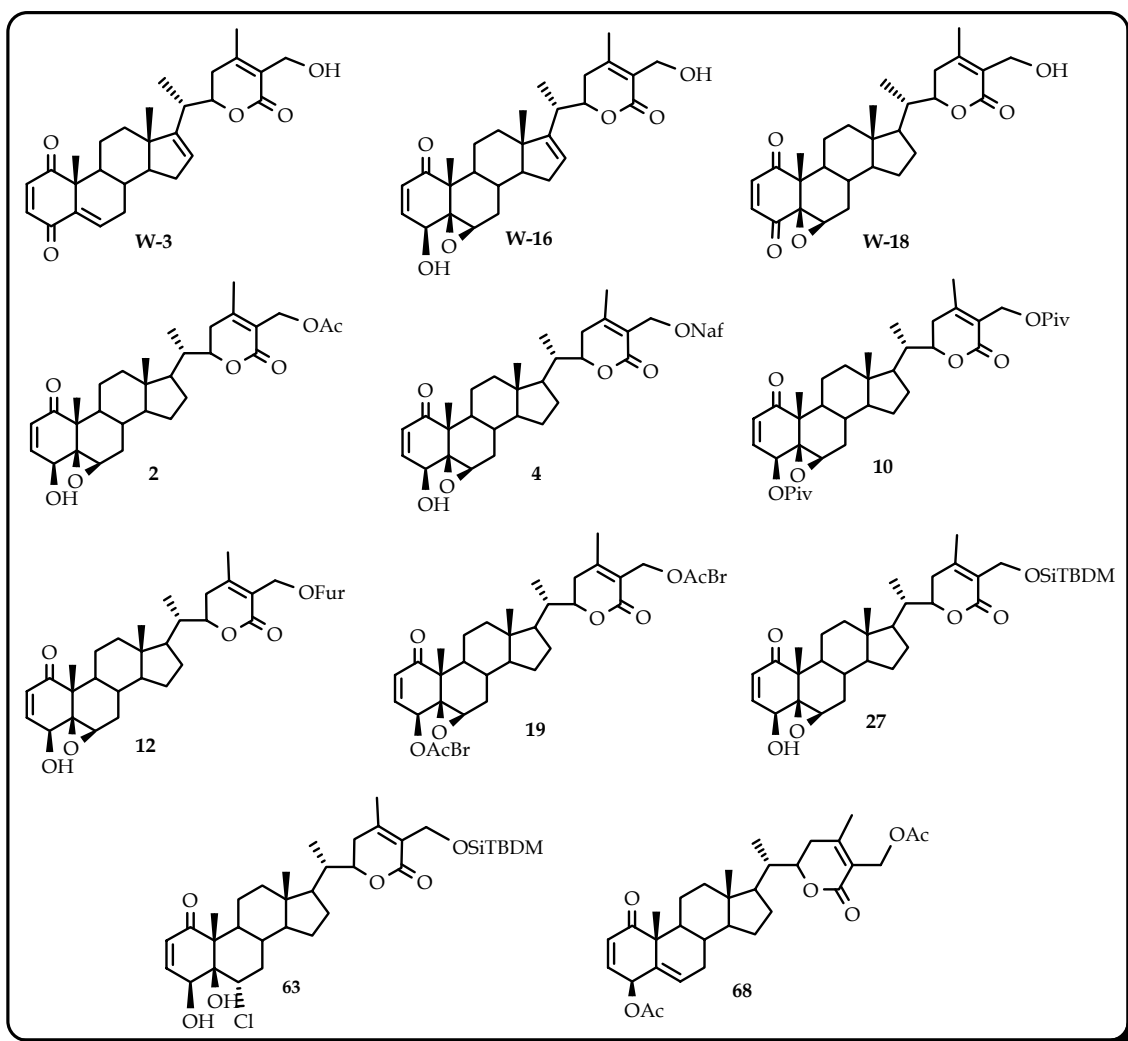
Se evaluó la actividad inmunomoduladora de withanolidas aisladas de *W. aristata* y derivados. Estos ensayos fueron realizados en colaboración con los Dr. Alfonso Ruiz Bravo y Alberto Ramos Cormenzana en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada. El procedimiento seguido, que se describe a continuación, ha sido optimizado en su laboratorio, donde se utiliza de forma rutinaria²⁶.

Las células se cultivaron en placas microtiter de poliestireno de fondo plano (Costar). Se distribuyeron 100 μ l de suspensión por pocillo, de modo que quedase en cada pocillo 5×10^5 células. La suspensión (procedente del pool de esplenocitos de

²⁶ Ruíz-Bravo A, Jiménez-Valera M, Moreno E Guerra V, Ramos-Cormenzana A. 2001. Biological response modifier activity of an exopolysaccharide from *Paenibacillus jamilae* CP-7. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 8, 706-710.

varios ratones) se distribuyó en columnas de ocho pocillos. En la primera columna sólo se colocó células y se utilizó como blanco, En el resto de las columnas se colocaron las células y distintas concentraciones de telitromicina y/o diferentes agentes mitogénicos a razón de 10 µl por pocillo. Se probaron dos agentes distintos, LPS (mitógeno estándar de células B) y Concanavalina A (Con A, mitógeno estándar de células T). Las placas así preparadas se incubaron a 37 °C, 5% de tensión de CO₂ y humedad a saturación, durante 72 h, tras lo cual se procedió a la lectura de las mismas. La proliferación celular se determinó por el método colorimétrico de Mosmann²⁷, que se basa en la capacidad que poseen las células vivas de reducir el MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltrazol-2-1)-2,5-difeniltetrazolio) por medio de la succinato deshidrogenasa existente en las mitocondrias.

Los compuestos evaluados son los que se muestran a continuación:



²⁷ Mosmann, T. J. *Immunol. Methods.* **1983**, 65, 55.

Los compuestos **W-3**, **W-18**, **4** y **68**, son significativamente tóxicos para los esplenocitos de ratón a concentraciones de 5 µg/ml, siendo **68** el menos tóxico, resultados coherentes en presencia y ausencia de mitógeno. A diluciones de 1 µg/ml, se observan los resultados resumidos en la Tabla 1 y que pasamos a comentar a continuación:

El compuesto **68** presenta escasa toxicidad y no mostró ningún efecto sobre células B. Aumenta significativamente la capacidad de proliferación de las células T en respuesta a ConA.

Los compuestos **2**, **4** y **12**, que aunque son tóxicos a la dosis ensayada, no afectan a las células B y aumentan significativamente la capacidad de proliferación de las células T en respuesta a ConA.

El compuesto **19** fue tóxico a la dosis ensayada, inhibe a las células B (¿consecuencia de la toxicidad?) pero aumenta significativamente la capacidad de proliferación de las células T en respuesta a ConA.

En términos generales, la toxicidad se refleja más en las células B (inhibiendo parcialmente la proliferación en respuesta a LPS) que en células T. Los únicos casos de inmunopotenciación observados ocurren en la respuesta de células T a su mitógeno ConA.

Tabla 1. Resumen de resultados de respuesta inmune de las withanolidas

Producto	Toxicidad	Modificación de la respuesta a:	
		LPS	Con A
W-3	Media	Supresión ¿?	Supresión ¿?
W-16	Media	Supresión ¿?	Sin efecto
W-18	Media	Supresión ¿?	Sin efecto
2	Media	Sin efecto	Potenciación
4	Media	Supresión ¿?	Supresión ¿?
10	Media	Supresión ¿?	Supresión ¿?
12	Media	Sin efecto	Potenciación
19	Media	Supresión ¿?	Potenciación
27	Media	Sin efecto	Sin efecto
63	Media	Sin efecto	Potenciación
68	Escasa	Sin efecto	Potenciación

¿?: La supresión observada probablemente es debida a la toxicidad.

Abreviaturas: LPS, lipopolisacárido de *Escherichia coli* (mitógeno de linfocitos B); Con A, concanavalina A (mitógeno de linfocitos T).

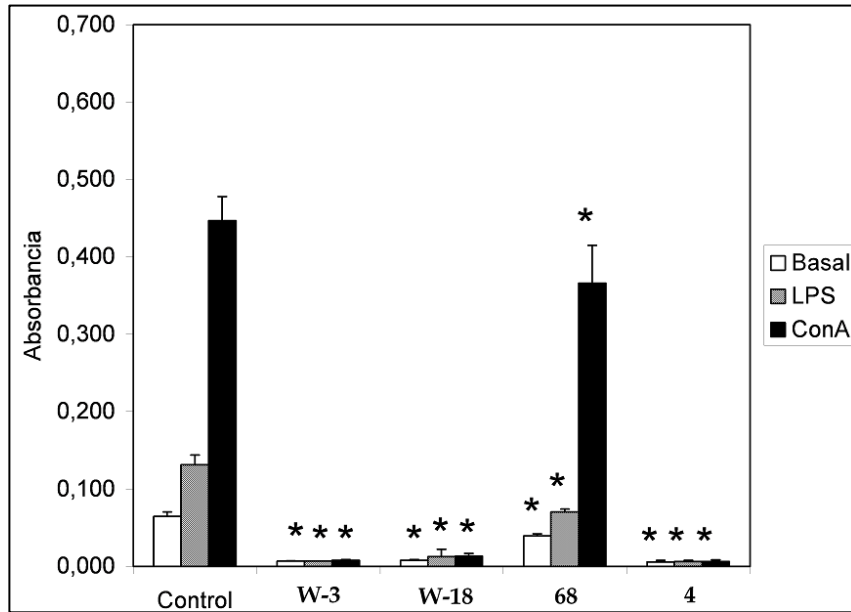


Figura 6.3.5. Efecto de los productos W-3, W-18, 68 y 4, a 5 µg/ml (concentración final), sobre la proliferación (basal y en respuesta a mitógenos) de esplenocitos murinos. Los asteriscos denotan diferencias significativas respecto de los respectivos controles.

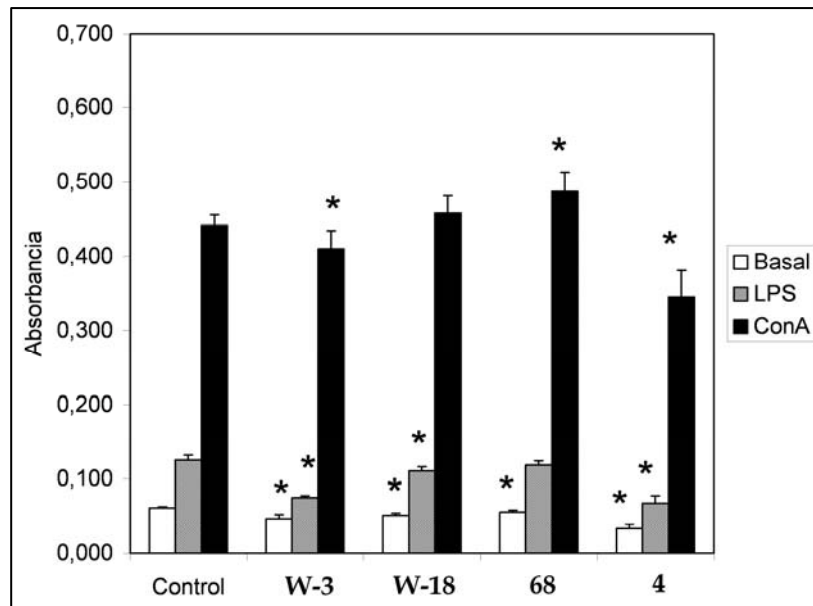


Figura 6.3.6. Efecto de los productos W-3, W-18, 68 y 4, a 1 µg/ml (concentración final), sobre la proliferación (basal y en respuesta a mitógenos) de esplenocitos murinos. Los asteriscos denotan diferencias significativas respecto de los respectivos controles.

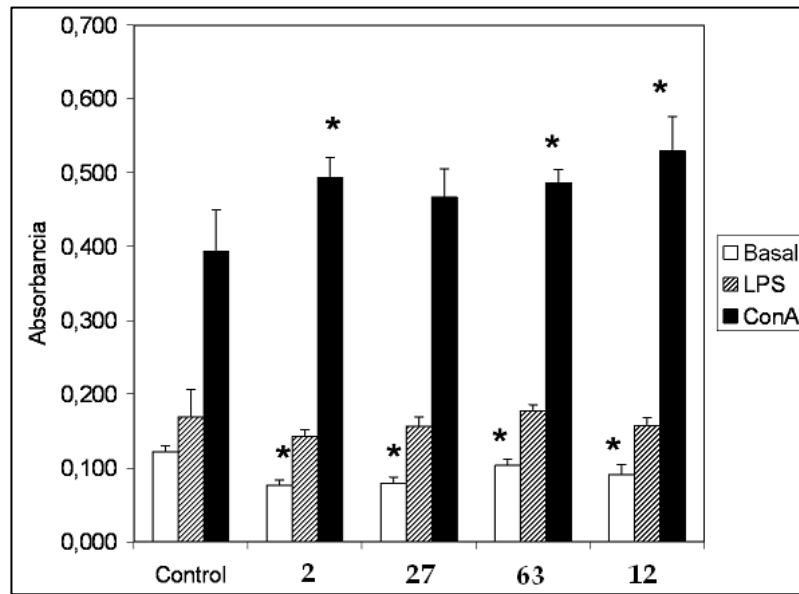


Figura 6.3.7. Efecto de los productos 2, 27, 63 y 12, a 1 $\mu\text{g/ml}$ (concentración final), sobre la proliferación (basal y en respuesta a mitógenos) de esplenocitos murinos. Los asteriscos denotan diferencias significativas respecto de los respectivos controles.

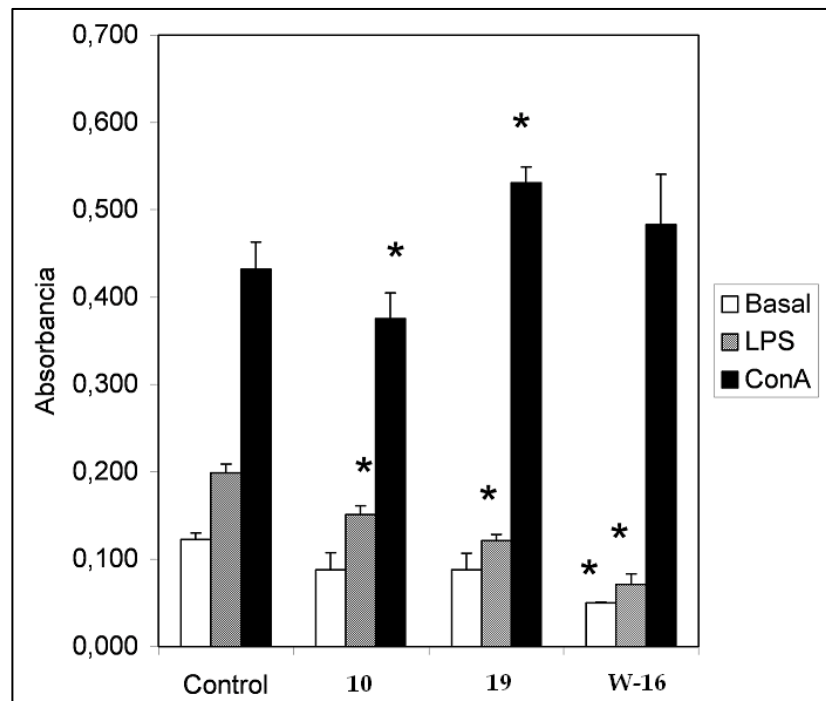
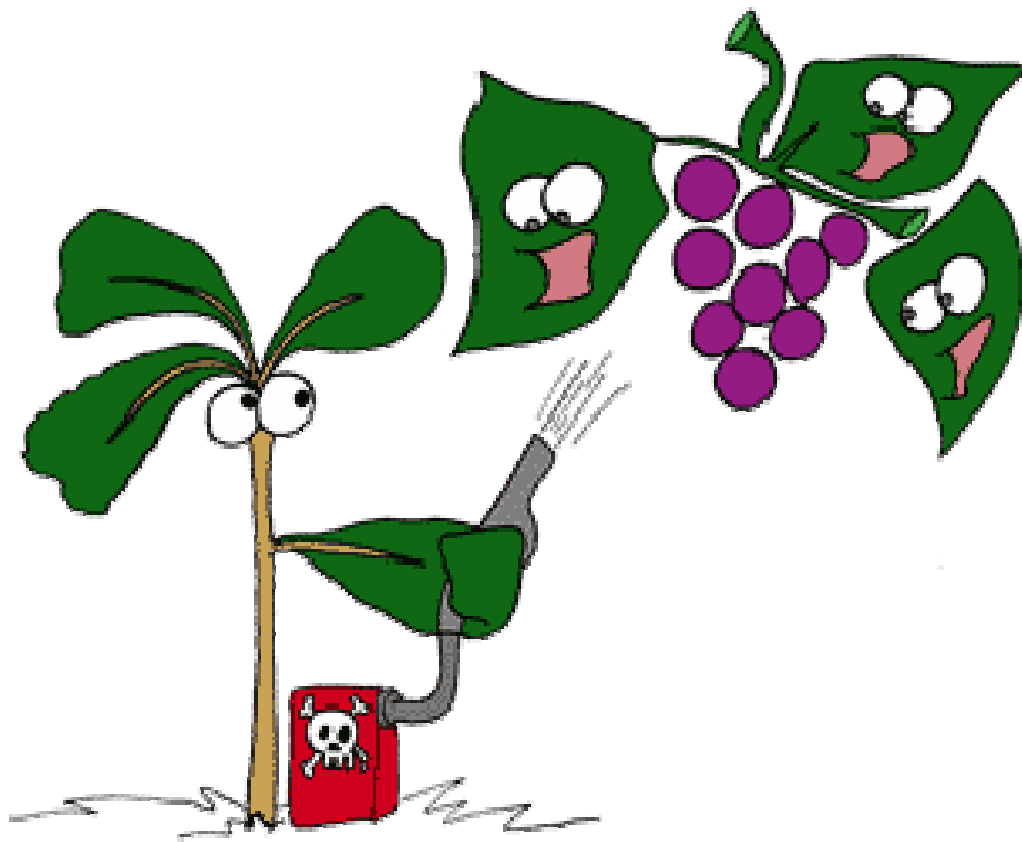


Figura 6.3.8. Efecto de los productos 10, 19 y W-16, a 1 $\mu\text{g/ml}$ (concentración final), sobre la proliferación (basal y en respuesta a mitógenos) de esplenocitos murinos. Los asteriscos denotan diferencias significativas respecto de los respectivos controles.

Los resultados obtenidos en estos ensayos nos animan a continuar con el estudio de este tipo de metabolitos por su potencial inmunomodulador. Así, actualmente se están evaluando otra serie de withanolidas naturales y derivados con el fin de seleccionar aquellos que resulten más prometedores para su posterior evaluación en ensayos "*in vivo*".

Por otra parte, este trabajo nos ha permitido consolidar la colaboración establecida con el grupo de investigación de los Dres. Alfonso Ruiz Bravo y Alberto Ramos Cormenzana en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada, para la continuidad en esta línea de investigación.



6.4. Actividad alelopática

6.4. Actividad alelopática

6.4.1. Introducción

Las malas hierbas o adventicias se han considerado tradicionalmente como un enemigo de los cultivos, en la mayoría de los casos no sin razón. Interfieren con la producción de los cultivos y provocan a menudo disminución de la producción, si no la pérdida total del cultivo. El aumento de la resistencia de muchas malas hierbas a los herbicidas es una indicación clara de que está fallando la estrategia dominante hacia el control de las malas hierbas¹.

Hasta la fecha, la mayoría de los herbicidas utilizados en agricultura son de origen sintético, son sustancias que no se encuentran en la naturaleza como tales, siendo el glifosato, derivado del aminoácido natural glicina, la única excepción y el herbicida de mayor éxito comercial de la historia². Los herbicidas pueden subdividirse en tres grandes grupos, dependiendo de su modo de acción:

1. *Herbicidas de preemergencia:*

Impiden la germinación de las semillas o matan las plántulas antes de que emerjan del suelo, debiendo aplicarse sobre el terreno limpio antes de que se prevean germinaciones masivas de malas hierbas (por ejemplo, antes de las épocas de lluvia). Tal es el caso de las triazinas o el diurón.

2. *Herbicidas de postemergencia o sistemáticos:*

Actúan por vía foliar, una vez nacidas las plantas (como el aminotriazol o el glifosato). Es necesario esperar que nazcan las plantas, pero no dejar que se desarrollen en exceso, pues aumenta su resistencia al producto y es imprescindible su aplicación antes de que las malas hierbas desarrollen sus semillas.

3. *Herbicidas de contacto:*

Se trata de sustancias que al contacto con la planta la “quemán”, debiendo aplicarse de forma localizada. Tal es el caso del diquat o el paraquat.

¹ Macias, F. A.; Oliveros-Bastidas, A.; Marin, D.; Carrera, C.; Chinchilla, N.; Molinillo, J. M. G. *Phytochem. Rev.* **2007**, 7(1), 179.

² Lancaster, S. H.; Hollister, E. B.; Senseman, S. A.; Gentry, T. J. *Pest Manag. Sci.* **2010**, 66(1), 59.

El término alelopatía se utiliza para referirse a la influencia directa o indirecta de una planta sobre otra a través de la producción de compuestos químicos que se liberan al medio ambiente³. Sin embargo, este término ha sufrido modificaciones por parte de distintos autores, de forma que en ciertos momentos han considerado únicamente los efectos inhibidores. Actualmente¹, se acepta la definición de la Sociedad Internacional de Alelopatía (I.A.S.) según la cual, la alelopatía se define como:

“La ciencia que estudia cualquier proceso que involucre metabolitos, preferentemente secundarios, de origen vegetal o microbiano, que influyan en el crecimiento y desarrollo de sistemas biológicos”

Esta definición contempla la amplia gama de interacciones entre las plantas y los organismos de su ecosistema. En éste sentido, como demanda de la sociedad por una agricultura sostenible y debido también al aumento de problemas causados por el uso extensivo de agroquímicos sintéticos (contaminación del medio, problemas de salud pública, resistencia a herbicidas, incremento de costes), la alelopatía es una respuesta muy interesante.

El fisiólogo austriaco Hans Molisch, fue el primero en proponer el concepto **alelopatía** en 1937, al observar el efecto negativo del etileno, liberado por las manzanas, sobre el crecimiento de diferentes organismos vegetales. Hans definió la alelopatía como las interacciones de tipo químico, tanto estimuladoras como inhibidoras, que se dan tanto en plantas como en microorganismos⁴.

Sin embargo, son dos científicos estadounidenses y uno de la antigua Unión Soviética, los que dieron el impulso definitivo a esta nueva ciencia y que ha servido de estímulo a otros para continuarla. C. H. Muller, en los años 60, publicó junto a sus colaboradores numerosos trabajos sobre compuestos volátiles inhibidores, destacando su estudio sobre la inhibición del crecimiento de la raíz en *Cucumis sativum* y *Avena sativa* por efecto de compuestos volátiles generados en las hojas de *Salvia leucophylla* y *Artemisia californica*⁵, desarrollando una serie de procedimientos que hoy en día son todavía aceptados. Su trabajo fue continuado por E. L. Rise en los años 80, quien aportó

³ Constitution and Bylaws of the International Allelopathy Society, Cadiz, 1996, www.ias.com.

⁴ Molisch, H. *Der einfluss einer pflanz auf die andere-allelopathie*. 1937, Fisher, Jena.

⁵ Muller, C. H.; Muller, W. H.; Mainus, B. L. *Science*. 1964, 173.

numerosos trabajos sobre aspectos alelopáticos, así como un libro⁶ (1984) que se considera como el más completo compendio sobre esta materia hasta el momento. En la extinta Unión Soviética, Andrei M. Grodzinsky, promotor de la alelopátia en su país, escribió la obra "*Allelopathy in the life of plants and their communities*". Desafortunadamente, muchos de los resultados de sus investigaciones pasaron desapercibidos debido a que fueron publicados en ucraniano y ruso.

Putnam y Tang⁷ sugirieron que las características alelopáticas aparecen en cultivos predecesores o en especies salvajes como una respuesta evolutiva para poder competir con otras especies. Aunque las actuales especies hayan perdido parte de esa capacidad alelopática, es posible mejorar y recuperar las características potenciales de especies comerciales a través de métodos clásicos de cruce u otras estrategias de recombinación genética. La investigación en éste sentido aún está en sus comienzos, pero ya se ha encontrado un gen en el girasol (*Helianthus annuus*) que expresa una defensa de las plantas contra ataques microbianos⁸.

Existen muchos ejemplos de plantas utilizadas a lo largo de los siglos como alelopáticas. Un buen ejemplo es el uso del sorgo como especie control sobre adventicias en la India, propuesto por Narwall⁹. El arroz es el mayor cultivo en la India, el cual se suele rotar con trigo, ambos cultivos se pueden infectar con malas hierbas, por lo que se consume una gran cantidad de herbicidas, lo que conlleva un alto gasto económico y problemas de polución ambiental, de resistencia y para la salud humana. Una alternativa es el uso de estrategias alelopáticas, usando en los meses de verano, antes de sembrar el arroz, cultivos de sorgo, mijo y maíz, cultivos que disminuyen drásticamente la población de malas hierbas al introducir agentes alelopáticos en el suelo. El principal componente alelopático del sorgo es la sorgoleona, que se exuda en grandes cantidades por las raíces secundarias en forma de gotas oleosas¹⁰.

⁶ Rise, E. L. "*Allelopathy*". 1984, Academic press Orlando Fl., 2ª ed.

⁷ *The Science of Allelopathy*, 1986, (Putman, A.R., Tang, C.S. eds.), John Wiley and Sons, New York. 317 pp.

⁸ Urdangarin, M. C.; Norero, N. S.; Broekaert, W. F.; de la Canal, L. *Plant Physiol. Biochem.*, 2000, 38, 253.

⁹ Narwall, S. S. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 2000, 19, 249.

¹⁰ Netzly, D. H.; Butler, L. G. *Crop. Sci.*, 1986, 26, 775.

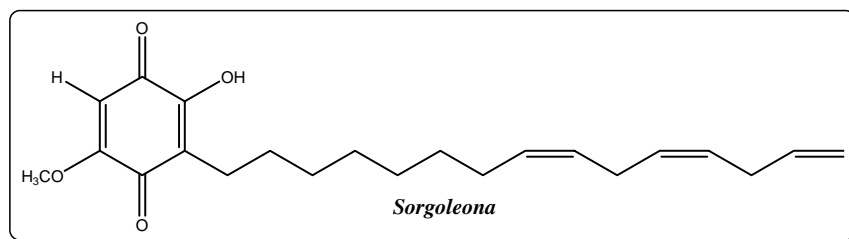


Figura 6.4.1. Principal componente alelopático en el sorgo.

También es conocido el uso del maíz como fuente de agentes alelopáticos y suele usarse en rotaciones con cultivos de soja. Así, se ha empleado el gluten como herbicida de preemergencia sobre distintos mantos herbáceos^{11,12,13}, o como repelente de insectos fitófagos como el áfido *Rhopalosiphum maidis*. Estudios recientes, también apuntan a que el contenido en ácidos hidroxámicos es un factor determinante en las características alelopáticas y en la resistencia frente a plagas de esta especie¹⁴. Estos compuestos son similares a los aislados del trigo y la cebada y junto a ellos, también se han aislado otros compuestos activos comunes en el mundo vegetal, como los ácidos ferúlico, *p*-cumarínico, siríngico y vainillínico¹⁵.

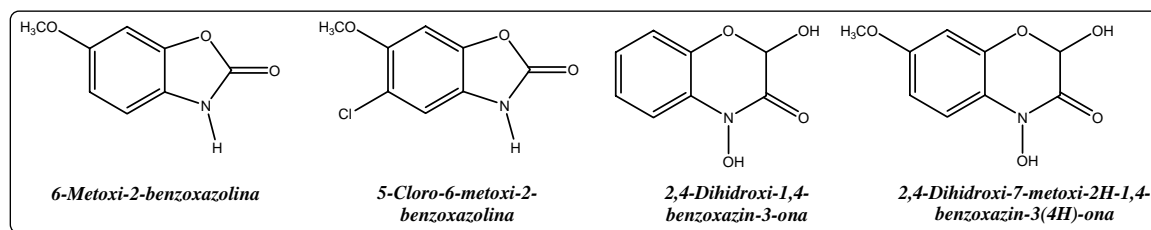


Figura 6.4.2. Ácidos hidroxámicos identificados en el maíz.

Los aleloquímicos se consideran una nueva herramienta para el control de plagas agrícolas, ello, ha despertado el interés en el aislamiento y síntesis de metabolitos secundarios de plantas con potencial alelopático, que tienen interacciones específicas con los organismos objetivos y son menos dañino para el ambiente, características que los hacen más atractivos como agroquímicos que los plaguicidas tradicionales. Además, estos metabolitos pueden tener nuevos mecanismos de acción, lo que podría mejorar su eficacia¹⁶. Cabe destacar que a pesar de la enorme variedad de estructuras aisladas con actividad alelopática son pocos los aleloquímicos naturales

¹¹ Nonnecke, G. R.; Christians, N. E.; Maas, J. L.; Galleta, G. J. *Acta Horticulturae*. **1992**, 348, 315.

¹² Liu, D.L.Y.; Christians, N.E.; Garbutt, J.T. *J. Plant Growth Reg.* **1994**, 13, 221.

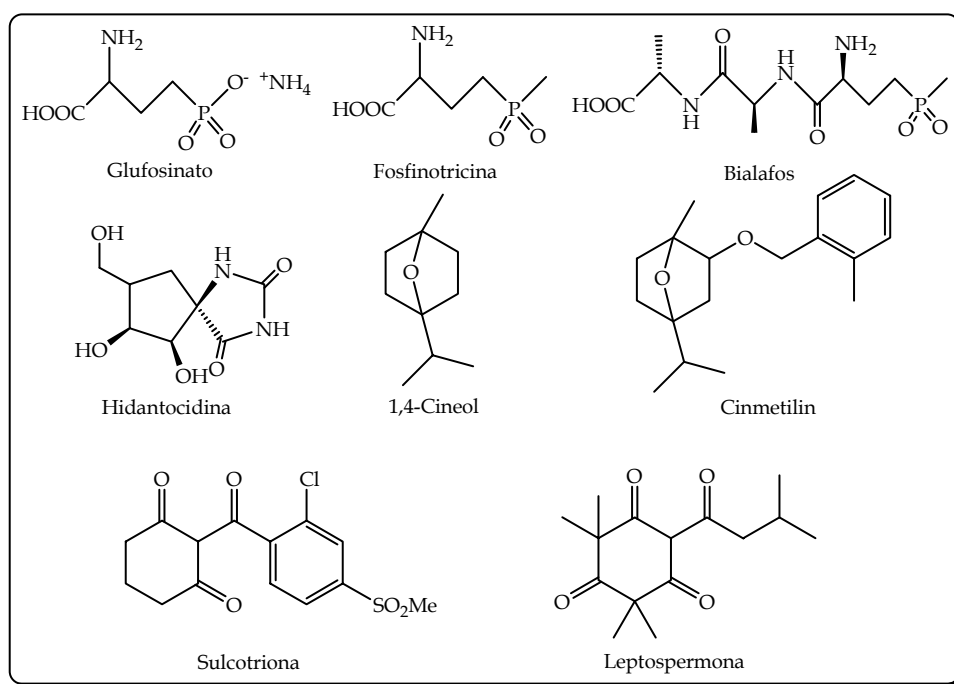
¹³ Christians, N.E. *IPM Practitioner*. **1995**, 17, 5.

¹⁴ Frey, M. *Science*. **1997**, 277, 696.

¹⁵ Kato-Noguchi, H. *Phytochemistry*. **1999**, 52, 1023.

¹⁶ Macías, F. A.; Galindo, J. C. G. *Phytochem.* **2007**, 68, 2917.

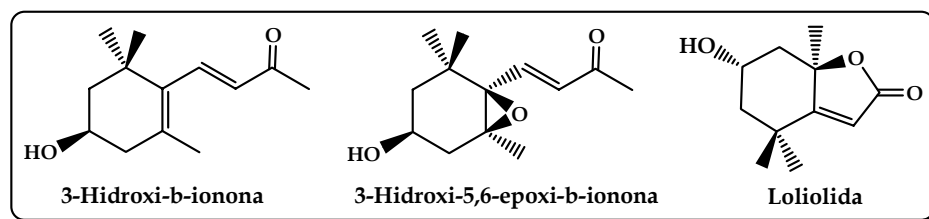
que se han aplicado comercialmente en el control de plagas¹⁷. Así, existen fitotoxinas microbianas con capacidad de afectar a malas hierbas como por ejemplo el glufosinato, derivado sintético de fosfinotricina, producida por la degradación del bialafos que se aísla de *Streptomyces viridochromogenes* y *Streptomyces hygroscopicus*. El análogo nucleótido hidantocidina, fitotoxina natural de *Hygroscopicus S.*, es uno de los productos más prometedores como herbicida, existiendo numerosas patentes de éste y sus análogos. También se han aislado de plantas metabolitos prometedores como aleloquímicos, estando algunos de ellos o sus derivados sintéticos, en desarrollo como herbicidas comerciales. Este es el caso de cinmetilin, un derivado del monoterpeno natural 1,4-cineol, en el que el grupo bencilo reduce su volatilidad. También, hemos de destacar, el herbicida sulcotriona que posee un nuevo mecanismo de acción y que está estructuralmente relacionado con los compuestos conocidos como leptospermonas, que presentan una potente actividad alelopática, los cuales se aíslan de plantas¹ del género *Callistemon*.



Existen numerosas referencias a cerca de la actividad fitotóxica y alelopática de apocarotenoides. Así, de *Cestrum parqui* se aislaron doce apocarotenoides que

¹⁷ Lee, D. L.; Prisbylla, M. P.; Cromartie, T. H.; Dagarin, D. P.; Howard, S. W.; Provan, W. M.; Ellis, M. K.; Fraser, T.; Mutter, L. C. *Weed Sci.* **1997**, *45*, 601.

mostraron efecto inhibitor del crecimiento y la germinación de *Lactuca sativa* L¹⁸. Muchas especies del género *Brassicaceae* son conocidas por su potencial alelopático¹⁹, así los extractos, acuoso y metanólico de las hojas de *B. orientalis*, mostraron un efecto inhibitor sobre la germinación de la cebada (*Hordeum vulgare* L.), la lechuga (*Lactuca sativa* L.) y la manzanilla (*Matricaria inodora* L.) y del estudio fitoquímico de esta especie se aislaron apocarotenoides con conocida actividad alelopática, como la 3-hidroxi- β -ionona, la 3-hidroxi-5,6-epoxi- β -ionona y la loliolida entre otros²⁰.



6.4.2. Resultados y discusión

Dados los antecedentes anteriormente descritos, se llevó a cabo la evaluación de la actividad fitotóxica y alelopática en colaboración con el grupo del Dr. Francisco Macías, del departamento de Química Orgánica, Universidad de Cádiz, de los apocarotenoides y luteína aislados de *W. aristata*. Para evaluar estas actividades se puede establecer una secuencia de bioensayos que, partiendo de una actividad de carácter general, permita discriminar aquellos productos que presentan mayores niveles de actividad. En esta secuencia, el primer nivel de bioactividad general evalúa el desarrollo de células indiferenciadas de tejidos vegetales, midiendo el grado de elongación de los meristemas apicales de gramíneas. El segundo nivel, el de fitotoxicidad, evalúa la actividad de los compuestos mediante la cuantificación de los efectos de éstos sobre parámetros globales, en concreto sobre la germinación de semillas y el crecimiento de plántulas.

6.4.2.1. Ensayo de bioactividad general

El ensayo de bioactividad general conocido como “bioensayo de los coleóptilos etiolados de trigo”, se ha empleado, frecuentemente, para detectar sustancias

¹⁸ D'Abrosca, B.; DellaGreca, M.; Fiorentino, A.; Monaco, P.; Oriano, P.; Temussi, F. *Phytochemistry*. **2004**, *65*, 497.

¹⁹ Yamane, A., Nishimura, H. and Mizutani, J. *J. Chem. Ecol.* **1992**, *18*, 683.

²⁰ Dietz, H.; Winterhalter, P. *Phytochemistry*. **1996**, *42*, 1005.

reguladoras del crecimiento vegetal. Este bioensayo fue desarrollado por el profesor H. G. Cutler²¹ para detectar actividades farmacológicas en productos químicos, uso para el que está ampliamente contrastado²².

El parámetro que se mide en este bioensayo es la elongación diferencial de segmentos de coleótilos, lo que depende de la estimulación o la inhibición de la división celular de tejidos vegetales indiferenciados. Para evaluar este parámetro, se emplean coleótilos de trigo (fragmentos de 4 mm de longitud) que se tratan con disoluciones acuosas tamponadas (disolución reguladora ácido cítrico/fosfato de pH=5,6) de los productos a ensayar.

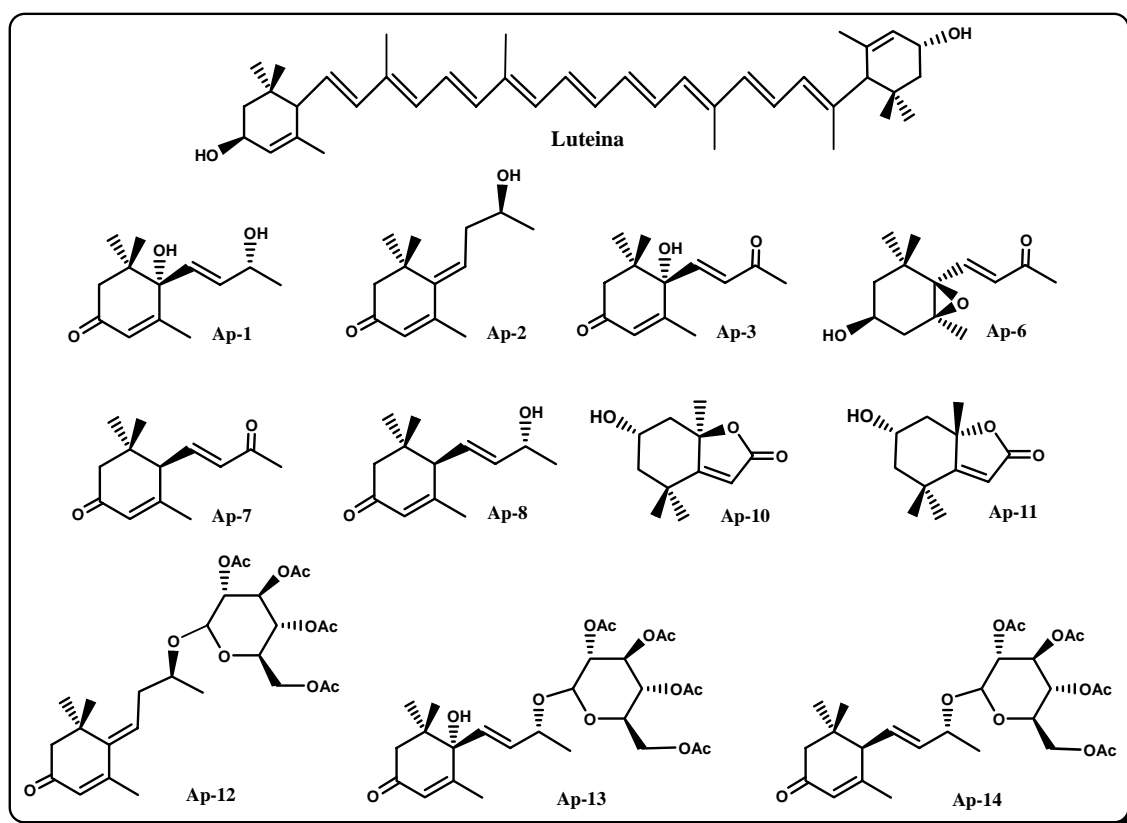
Este bioensayo permite evaluar un amplio espectro de actividades biológicas, de manera sencilla, económica y rápida (24 horas); permite únicamente discriminar entre productos activos o no activos, y se utiliza para seleccionar los compuestos más activos de una determinada colección, que luego serán sometidos a bioensayos más específicos. Macías y colaboradores han propuesto este bioensayo, dada su sensibilidad, como paso previo a la evaluación de la actividad fitotóxica²³.

En el presente estudio, fueron sometidos a este bioensayo a las concentraciones de 10^{-3} , $5 \cdot 10^{-4}$, 10^{-4} , $5 \cdot 10^{-5}$ y 10^{-5} M los compuestos **Ap-1**, **Ap-3**, **Ap-6**, **Ap-8**, **Ap-10**, **Ap-11**, **Ap-12** y **Ap-13**, mientras que los compuestos **Ap-2**, **Ap-7**, **Ap-14** y **luteína**, debido a la cantidad disponible, sólo se ensayaron a las concentraciones $5 \cdot 10^{-4}$, 10^{-4} , $5 \cdot 10^{-5}$ y 10^{-5} M.

²¹ Cutler, H. G. "A fresh look at the wheat coleoptile bioassay". Proceeding of the 11th Annual Meeting of the Plant Growth Regulator Society of America. **1984**, 1.

²² Cutler, H. G.; Cutler, S. J. "Agrochemicals and pharmaceuticals: the connection." Biologically Active Natural Products: Agrochemicals, [the Symposium held at the 214th American Chemical Society National Meeting], Las Vegas. **1997**, 1.

²³ Castellano, D. "Optimización de bioensayos alelopáticos. Aplicación en la búsqueda de herbicidas naturales." **2002**. Tesis Doctoral. Universidad de Cádiz. España.



Todos los compuestos presentaron perfiles inhibidores. Los valores encontrados fueron medios, alcanzando valores cercanos al 50% en la disolución más concentrada para los apocarotenoides **Ap-3**, **Ap-8** y **Ap-12**, así como para la **luteína**. Debemos destacar que las concentraciones más altas ensayadas de **Ap-8** y **luteína** fue $5 \cdot 10^{-4}$ M, por lo que es presumible que en el caso de que hubiera sido posible realizarla a 10^{-3} M, éstos serían los compuestos más activos. Por otro lado, los compuestos **Ap-1**, **Ap-2**, **Ap-7**, **Ap-10** y **Ap-14** han mostrado actividades cercanas al -40% en alguna de sus diluciones y un perfil inhibitor persistente con la dilución, aunque menos acusado que en los descritos anteriormente.

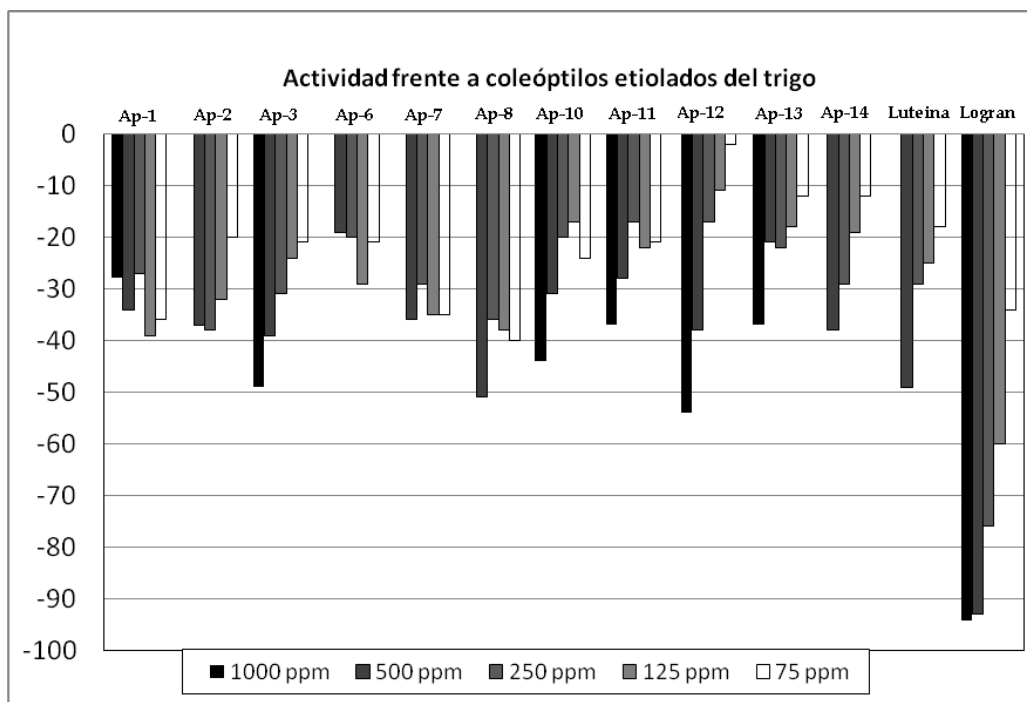


Figura 6.4.3. Actividad frente a coleótilos etiolados del trigo de apocarotenoides y luteína aislados de *W. aristata*.

6.4.2.2. Bioensayo de Fitotoxicidad

Atendiendo a estos niveles de actividad en el primer ensayo de bioactividad y a la disponibilidad de material se eligieron los siguientes compuestos: **Ap-1**, **Ap-2**, **Ap-7**, **Ap-10**, **Ap-14** y **luteína** para llevar a cabo ensayos de fitotoxicidad.

El bioensayo de fitotoxicidad constituye el segundo nivel de estudio para los compuestos, ya que ofrece una información más específica que el anterior. Este bioensayo trata de imitar las condiciones naturales de acción de los productos sobre las semillas, por lo que los compuestos se suministran en forma de disolución acuosa. El objetivo del mismo es determinar la fitotoxicidad de los compuestos ensayados sobre un conjunto semillas de plantas que se establecen como modelo.

La selección de las especies vegetales receptoras para el bioensayo se realizó en base a un amplio estudio llevado a cabo por Macías y colaboradores²⁴, en el cual se propusieron cinco especies receptoras modelo (STS), representantes de los grupos taxonómicos más importantes tanto dicotiledóneas como monocotiledóneas. Estas especies sirven como modelo de las familias más perjudiciales de malas hierbas y

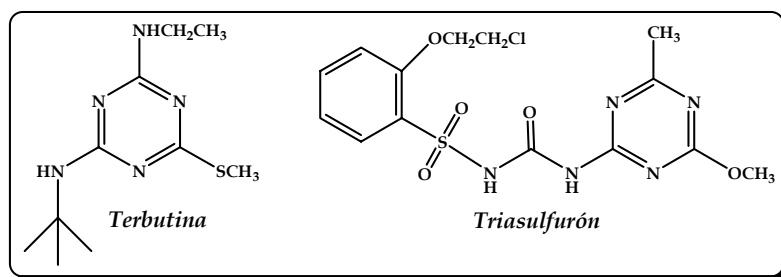
²⁴ Macías, F. A., Castellano, D., Molinillo, J. M. J. *Agric. Food and Chemistry*. 2000, 48 (6), 2512.

tienen la ventaja de ofrecer porcentajes de germinación y desarrollo reproducibles de unos bioensayos a otros. Así, las especies modelos (STS) utilizadas fueron:

- *Lepidium sativum* L. (Berro): Pertenece a la familia *Cruciferaeae*. Presenta un alto porcentaje de semillas germinadas y es una de las especies más utilizadas en el estudio de los efectos fitotóxicos sobre la raíz.
- *Lactuca sativa* L. (Lechuga): Es la dicotiledónea más ampliamente utilizada en bioensayos alelopáticos, ya que sus semillas son asequibles, germinan y crecen muy rápidamente y permite comparaciones con los resultados de otros grupos de investigación.
- *Lycopersicum esculentum* L. (Tomate): Pertenece a la familia *Solanaceae* y aunque esta especie no representa un modelo de familia predominante de malas hierbas, posee germinación y desarrollo muy homogéneos, lo que permite contrastar estadísticamente la actividad medida con altos niveles de confianza.
- *Allium cepa* L. (Cebolla): Pertenece a la familia *Liliaceae*, a la cual pertenecen las malas hierbas más perjudiciales dentro de las monocotiledóneas.

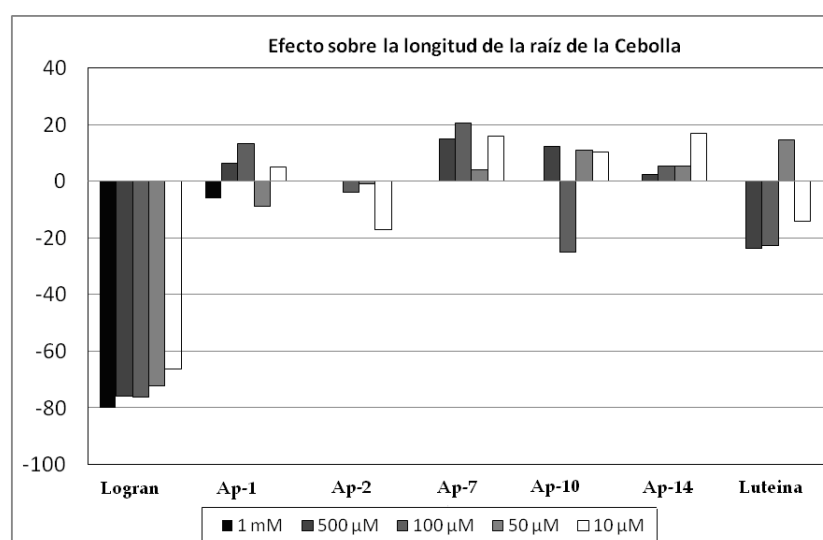
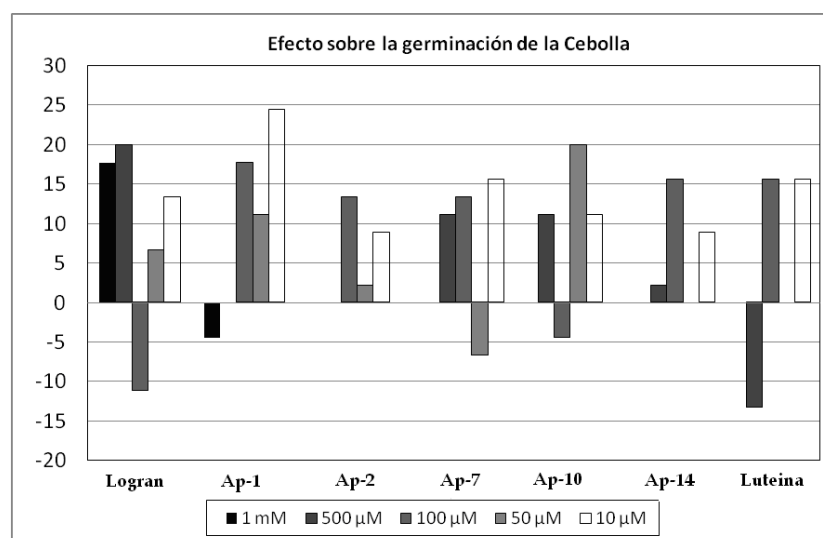
Los parámetros que se evalúan para el bioensayo de fitotoxicidad son el porcentaje de semillas germinadas por placa, la longitud de la raíz y la longitud del tallo.

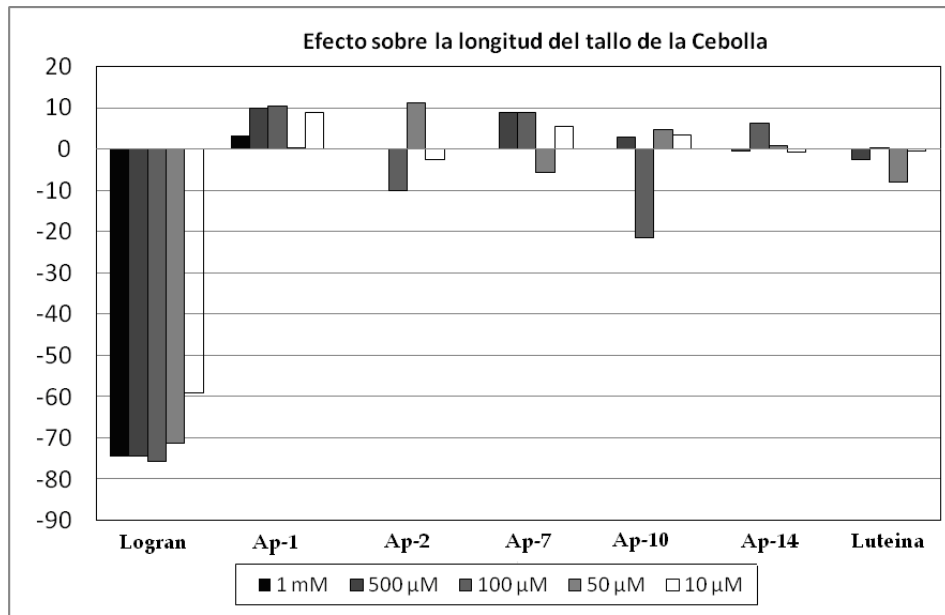
A la hora de contar con datos para proponer los compuestos estudiados como modelos de herbicidas naturales, es necesario ensayar la actividad de un herbicida comercial de actividad conocida. El herbicida comercial usado como patrón interno en este bioensayo es Logran[®], un herbicida comercializado por la empresa AVENTIS, que contiene en su formulación como principios activos los compuestos terbutrina (59,4%), que inhibe la asimilación de CO₂ y triasulfurón (0,6%), que inhibe la división celular.



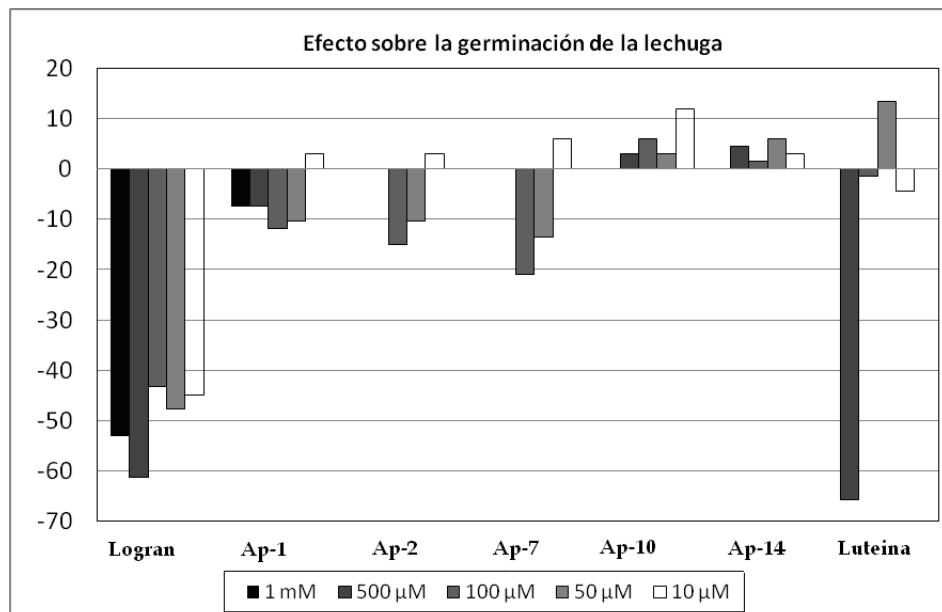
Principios activos del herbicida Logran[®].

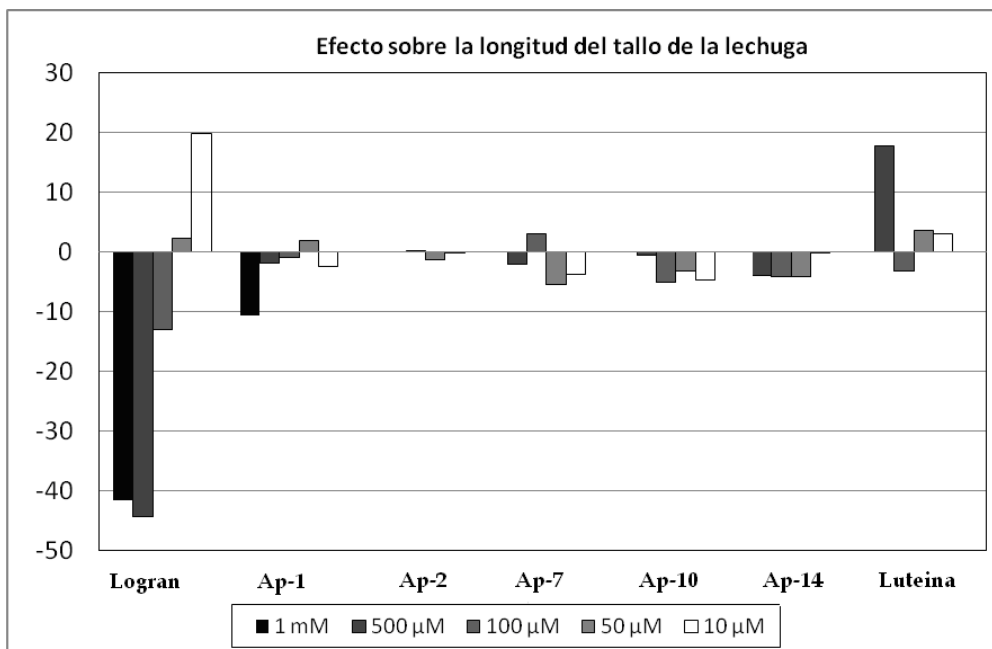
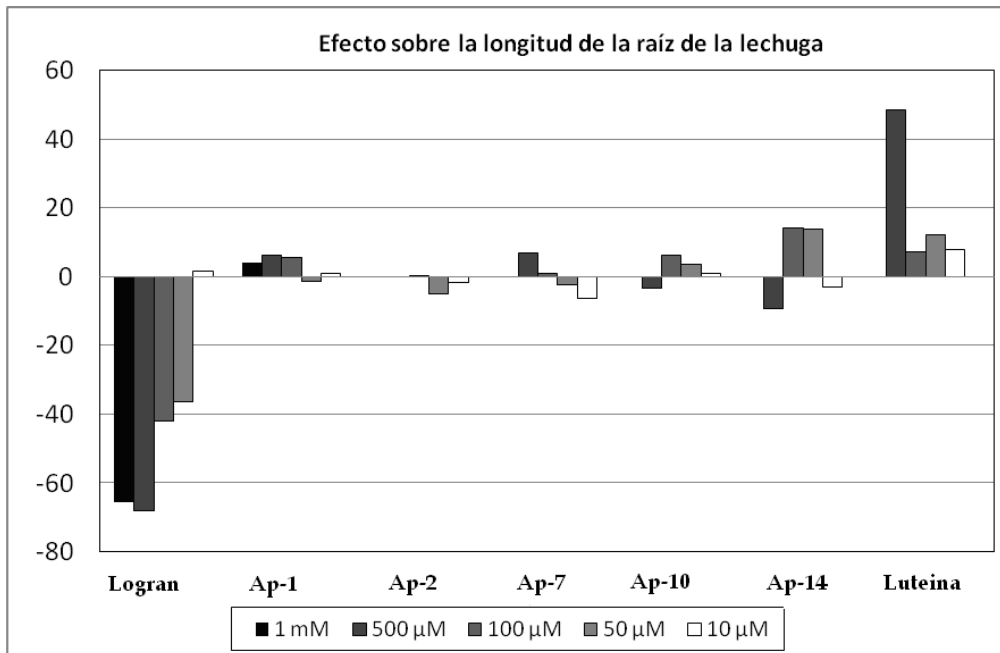
En general, los resultados indican que los productos muestran una actividad moderada o baja, siendo el parámetro más afectado la germinación y el que menos la longitud del primordio del tallo. Así mismo, la especie monocotiledónea ha mostrado menor sensibilidad a los productos que las dicotiledóneas, de manera que la **cebolla** apenas presenta cambios significativos en su desarrollo al ser sometida al tratamiento con los productos seleccionados para su evaluación.



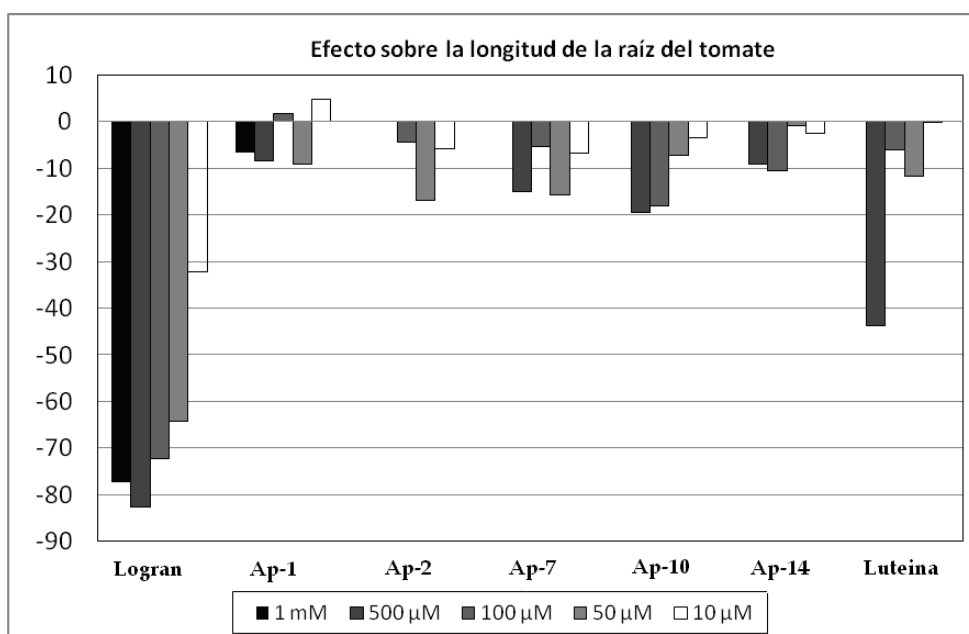
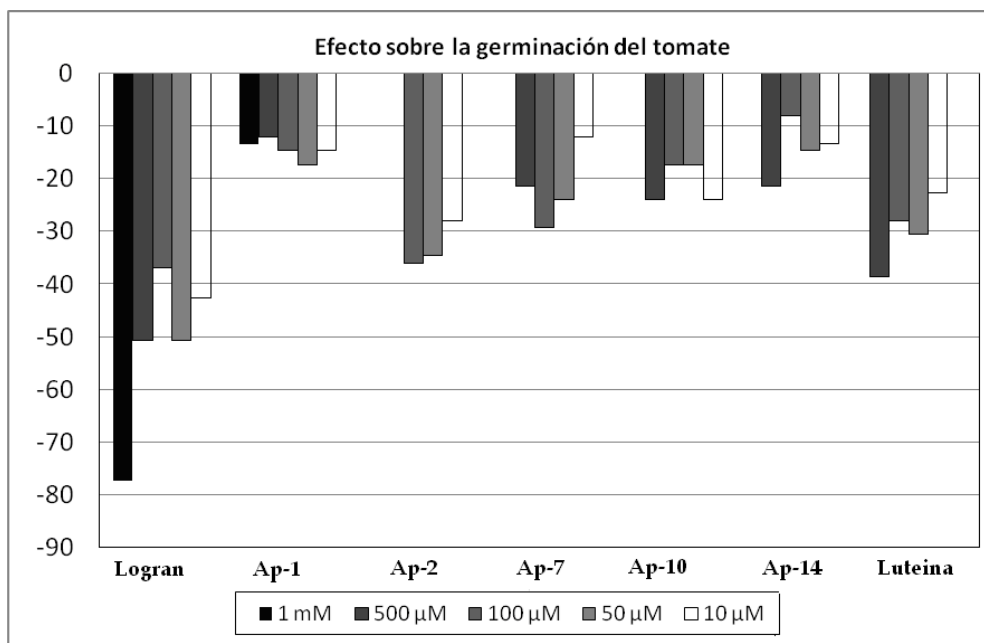


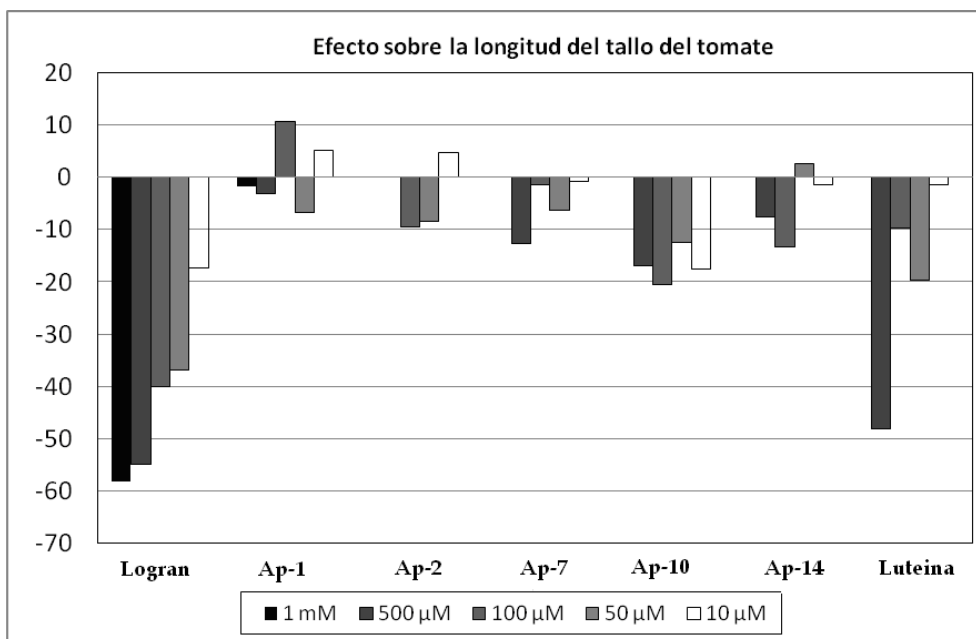
El producto que ha mostrado mayor actividad ha sido la **luteína** a la mayor concentración ensayada (500 µM), perdiéndose, en la mayoría de los casos, la actividad con la dilución rápidamente. Este es el caso de la **lechuga** (*Lactuca sativa*), en la que se observa que el único producto que produce cambios significativos de su desarrollo es la **luteína** a la mayor concentración ($5 \cdot 10^{-4}$ M) inhibiendo la germinación (66 %) y estimulando el crecimiento del tallo (49 %).



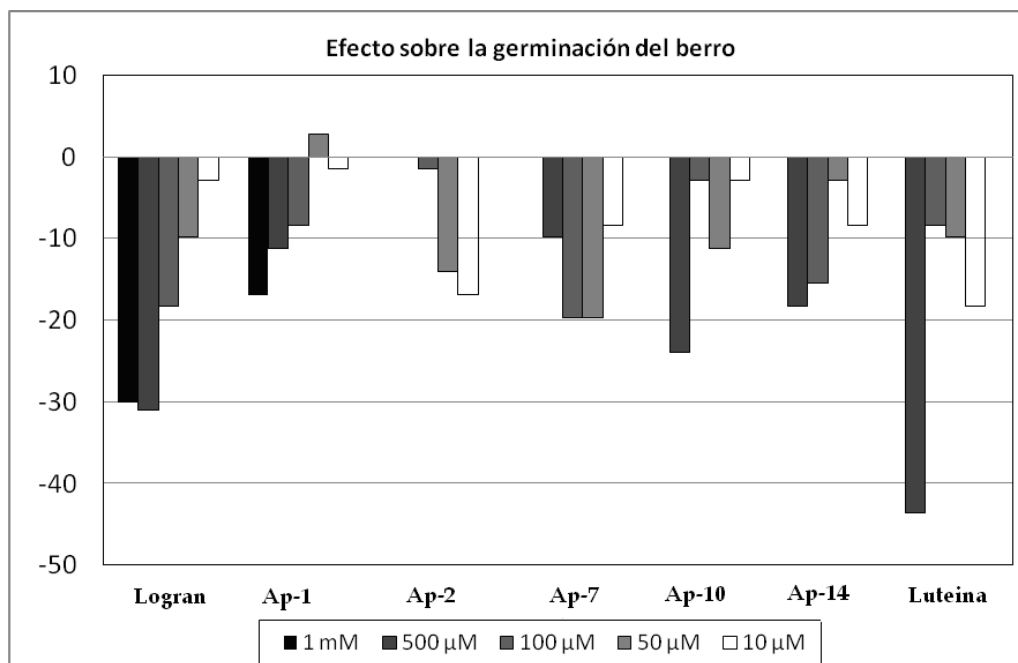


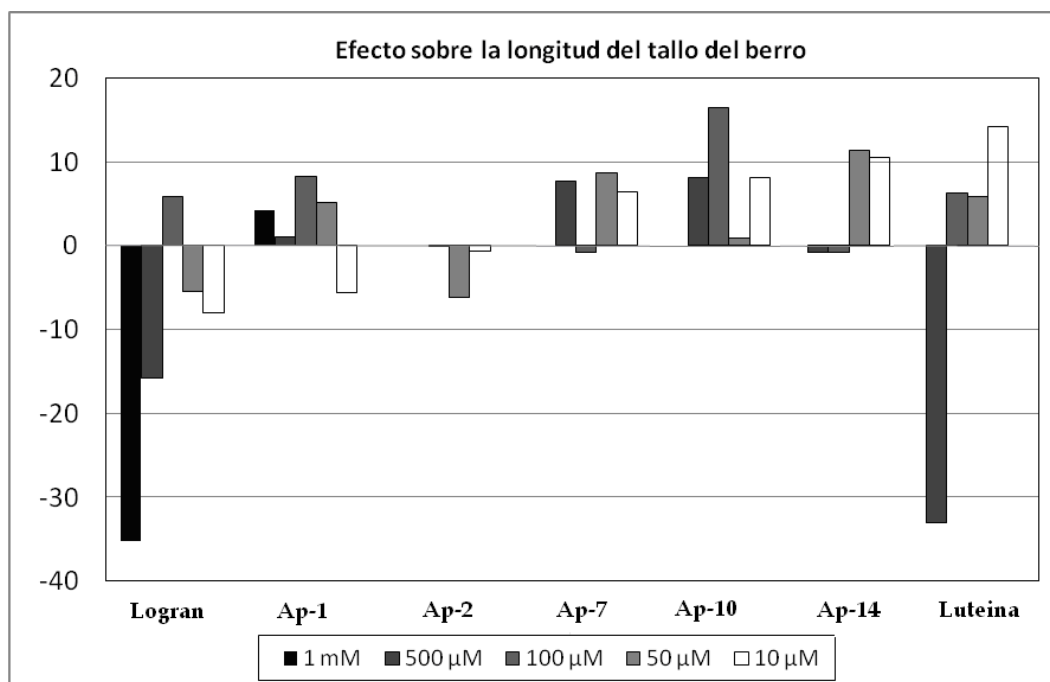
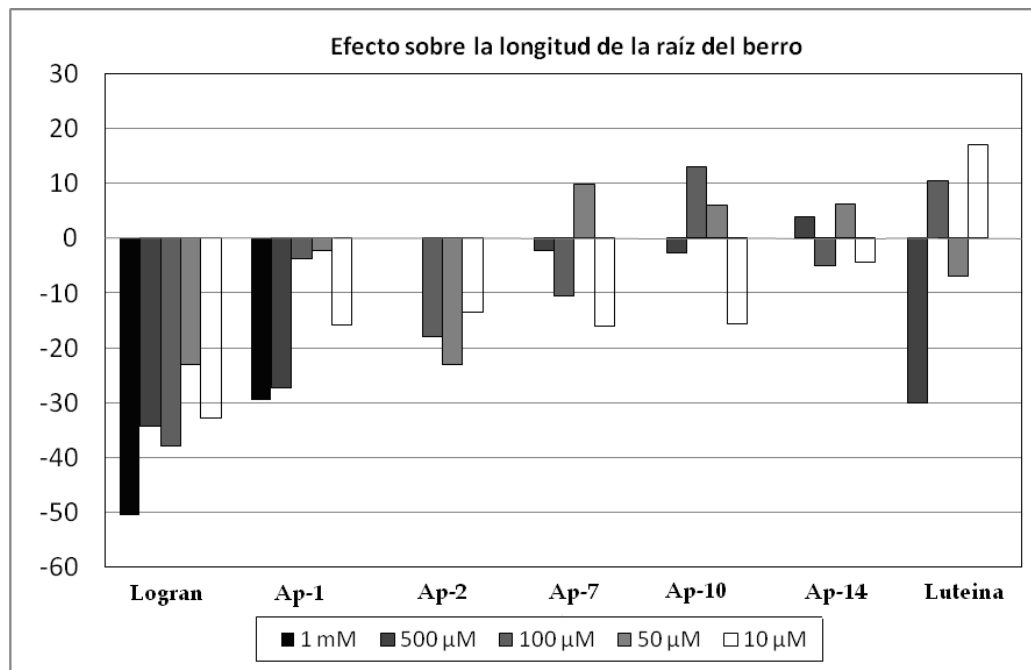
El **tomate** presenta un perfil inhibitor de la germinación en la mayor parte de los productos, si bien los valores son poco significativos, alcanzando valores cercanos al 40% en el caso de la **luteína**, **Ap-2** y **Ap-7**. De nuevo la **luteína** ha mostrado los mayores niveles de actividad a la mayor de las concentraciones ensayadas $5 \cdot 10^{-4}$ M (-44 % en el crecimiento de la raíz y -48% en el crecimiento del tallo).





El comportamiento de los compuestos frente al **berro** es muy similar al observado frente al tomate, aunque el perfil inhibitorio de la germinación se circunscribe, casi exclusivamente, a la **luteína**, que de nuevo a la mayor concentración presenta un valor próximo al 40% ($5 \cdot 10^{-4}$ M, -44%). En lo referente a la longitud de la raíz, sólo **Ap-1**, **Ap-2** y **luteína** han mostrado actividad ligeramente inhibitoria. El tallo sólo se ve afectado a la concentración más alta de la **luteína**, con un valor del -33%.





En general podemos concluir que los compuestos han mostrado actividades bajas de fitotoxicidad, con alguna selectividad sobre las especies dicotiledóneas. Así mismo, en la mayor parte de los casos la actividad más destacable es la inhibición de la germinación más que el efecto sobre el desarrollo de las plántulas. Los compuestos más activos han sido, la **luteína** en primer lugar y **Ap-1** y **Ap-2** en menor cuantía.



6.5. Actividad antimalárica

6.5. Malaria

6.5.1. Introducción

La malaria o paludismo es una enfermedad parasitaria provocada por la infección de diferentes especies de protozoos parásitos pertenecientes al género *Plasmodium*. La enfermedad en el hombre está causada por cuatro especies diferentes: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae*. De ellas, la especie *P. falciparum* es la más relevante, por ser altamente infectante, producir gran morbilidad, ser la especie más agresiva con el índice de mortalidad más alto, estar ampliamente distribuida y ser la causa más frecuente de malaria endémica (provoca el 80% de los casos de malaria)¹.

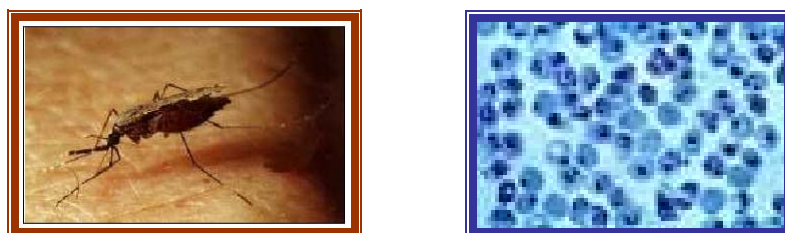


Figura 6.5.1. *Anopheles* y *Plasmodium falciparum*

El parásito causante de la malaria tiene un ciclo biológico que se reparte entre un huésped vertebrado y un insecto vector, el mosquito *Anopheles*. El parásito se transmite de una persona a otra únicamente a través de la picadura de los mosquitos hembra y de las 380 especies de *Anopheles* sólo las hembras de 60 especies son capaces de transmitir la enfermedad².

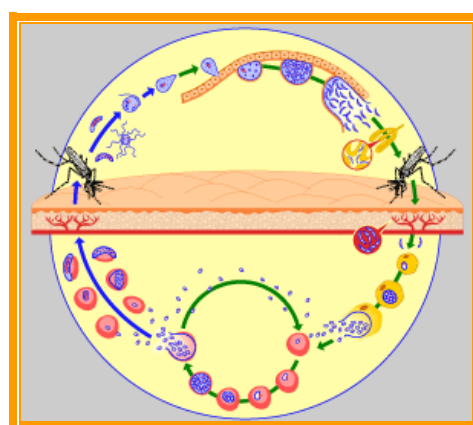


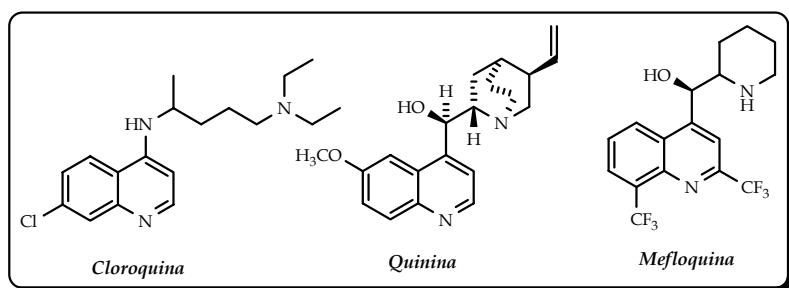
Figura 6.5.2. Ciclo biológico de *Plasmodium*

¹ World Health Organization. www.who.int/malaria/wmr2008/malaria2008.pdf. Fecha de acceso abril 2009.

² Wells, T. N. C.; Alonso, P. L.; Gutteridge, W. E. *Nature Rev.* **2009**, *8*, 879.

La malaria es una enfermedad infecciosa que afecta de 200 a 300 millones de personas anualmente y por la que fallecen 2.5 millones al año en el mundo. Actualmente, esta enfermedad es endémica en 100 países y se manifiesta principalmente en las regiones tropicales y subtropicales menos desarrolladas de África, Asia y América Latina. Es una de las enfermedades infecciosas con mayor índice de morbilidad y mortalidad³. Desafortunadamente, ninguno de los fármacos disponibles en la actualidad, actúa sobre todos los estadios del ciclo vital del parásito, siendo los fármacos de uso clínico los que comentamos a continuación:

Los *derivados quinolínicos*, entre los que podemos citar la cloroquina, quinina, quinidina, amodiaquina, mefloquina, halofantrina y primaquina. Estos fármacos inhiben la actividad de la hemopolimerasa en la vacuola alimenticia del parásito, interfiriendo en la conversión del grupo hemo en hemozoina no tóxica. Además, ejercen una acción secundaria, que involucra la inhibición de la síntesis de los ácidos nucleicos y las proteínas del parásito⁴. La **cloroquina**, es el fármaco de primera elección en caso de infección por *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae*. El fármaco se administra por vía oral o intravenosa y el índice de curación supera el 95%. Usualmente es bien tolerado y sus efectos secundarios son transitorios⁵. En caso de resistencia a cloroquina, los pacientes son tratados con mefloquina, halofantrina o sulfato de quinina más tetraciclinas o sulfonamidas. La **primaquina**, es utilizada para prevenir la recaída por infección con *P. vivax* y *P. ovale*, siendo el único fármaco aceptado para la erradicación del parásito en los hepatocitos. La **quinina**, es la terapia recomendada para pacientes infectados por *P. falciparum* resistente a cloroquina y se administra en forma de sulfato por vía oral, combinado con primetamina. La eficacia de los regímenes a base de quinina es mayor al 90% en la mayoría de las áreas endémicas. En pacientes que no toleran la terapia oral se administra gluconato o clorhidrato de quinina por vía intravenosa.



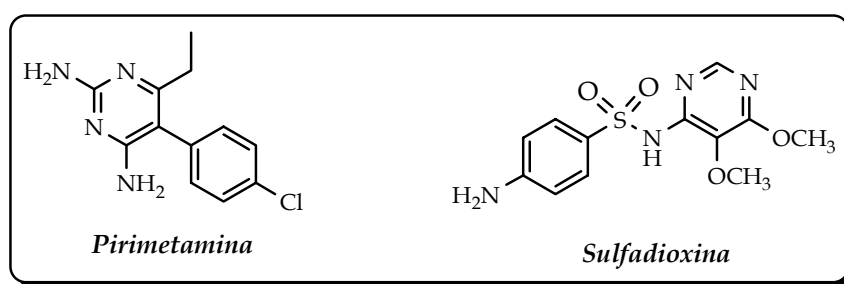
³ Hay, S. I. *Lancet Infect. Dis.* **2004**, 4, 327-336.

⁴ Foley, M.; Tiley, L. *Pharmacol. Ther.* **1998**, 79, 55-87.

⁵ Fitch, C. D.; Chou, A. C. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, 41, 2461.

La **mefloquina**, es el fármaco que cura del 90 al 95% de los casos de malaria causados por *P. falciparun*, siendo sus efectos secundarios vómitos, toxicidad neurológica y convulsiones. Sin embargo, no puede administrarse en niños, ni en pacientes que esten recibiendo quimioprofilaxis, para evitar la resistencia cruzada.

Los **antifolatos**: **pirimetamina**, **sulfonamidas**, **dapsona**, **proguanil** y la combinación de pirimetamina-sulfadoxina, tienen acción sobre las formas intrahepáticas del parásito. La **pirimetamina** es además gametocida, con lo cual previene la transmisión por el mosquito⁶.



Los derivados de artemisinina, **artemetero** y **artesunato**, actúan interfiriendo en la conversión del grupo hemo en hemozoina no tóxica. Son el tratamiento de elección para *P. falciparun* resistente a quinina y eliminan la parasitemia rápidamente. Cuando se administran sólo deben darse durante 5-7 días, para evitar la recrudescencia que se observa cuando se administra como monoterapia, por lo que deben ser combinados preferiblemente con mefloquina, tetraciclinas o clindamicina^{7,8}.

Antibióticos como la **clindamicina**, **atovaquona** y **tetraciclinas** tienen efectos sinérgicos con los derivados quinoleínicos, incrementando la acción esquizonticida sanguínea. **Atovaquona**, no se administra sola porque desarrolla resistencia rápida, por lo que se combina frecuentemente con proguanil, ya que se ha demostrado su sinergismo con índices de curación del 95% en malaria causada por *P. falciparum* sin efectos adversos severos^{9,10}.

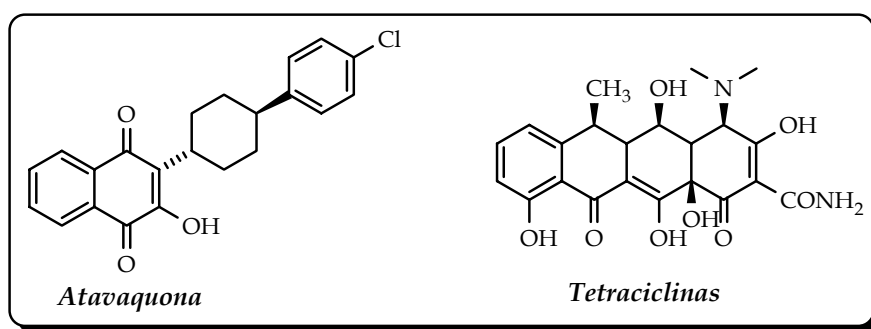
⁶ Barat, L. M.; Bloland, P. B.; Infect. Dis. Clin. North Am. **1997**, 11, 969.

⁷ Price, R.; Van Vugt, M.; Nosten, F. Am. J. Trop. Med. Hyg. **1998**, 59, 883.

⁸ Nosten, F.; Van Vugt, M.; Price, R.; Luxemburger, C.; Thway, K. L.; Brockman, A.; McGready, R.; Looareesuwan, S. The Lancet. **2000**, 356, 297.

⁹ Looareesuwan, S.; Chulay, J. D.; Canfield, C. D. Am. J. Trop. Med. Hyg. **1999**, 93, 637.

¹⁰ Hogh, B.; Clarke, P. D.; Camus, d.; Nothdurft, H. D.; Gunter, M.; Joubert, I.; Kain, K. C.; Shaw, D.; Roskell, N. S.; Chulay, J. D. The Lancet. **2000**, 356, 1888.



El desarrollo de la multiresistencia a fármacos en los parásitos ha forzado al uso de regímenes combinados de fármacos antimaláricos para incrementar la eficacia de la terapia. Estas combinaciones han disminuido el tiempo de duración del tratamiento, el riesgo de desarrollo de resistencia por el parásito durante la terapia y ha mejorado su utilización en niños y mujeres embarazadas¹¹. Sin embargo, aún estamos lejos de descubrir la terapia combinada ideal, siendo las mejores opciones: mefloquina + artesunato o clindamicina + quinina, efectivos en pacientes inmunocomprometidos, lo que sugiere que la combinación clindamicina + artesunato podría ser estudiada¹².

6.5.2. Productos naturales con actividad antimalárica

La evaluación científica de las plantas medicinales utilizadas en la preparación de remedios caseros, ha proporcionado a la medicina moderna fármacos efectivos para el tratamiento de la malaria. Algunos de los metabolitos obtenidos de plantas utilizadas en el tratamiento de esta enfermedad incluyen quinonas, alcaloides y terpenos. Como un ejemplo de ello es importante recordar que el primer producto farmacéutico desarrollado para el tratamiento de la malaria y la amebiasis fueron los alcaloides **quinina** y **emetina**, obtenidos de especies del género *Cinchona* y *Cephaelis*, respectivamente. Recientemente, la **artemisina**, una lactona sesquiterpénica, aislada de *Artemisia annua*^{13,14}, se usa en clínica para el tratamiento de la malaria.

¹¹ Kremsner, P. G.; Krishna, S. *The Lancet*. **2004**, 364, 285.

¹² Van den Broek, I. V.; Maung, U. A.; Peters, A.; Liem, L.; Kamal, M.; Rahman, M.; Rahman, R. M.; Bangali, A. M.; Barends, M.; Faiz, A. M. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2005**, 99, 727.

¹³ Ziffer, H.; Hight, R. J.; Klayman, D. L. *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* **1997**, 72, 121.

¹⁴ Castel, D. A.; *Nat. Prod. Rep.* **1999**, 16, 55.

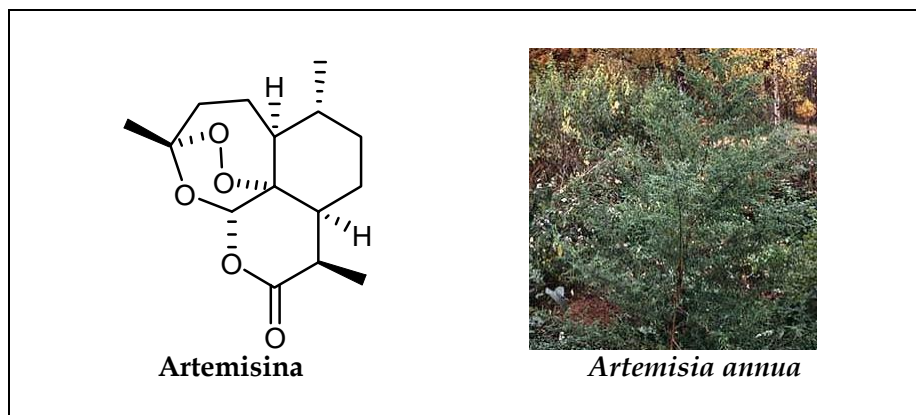
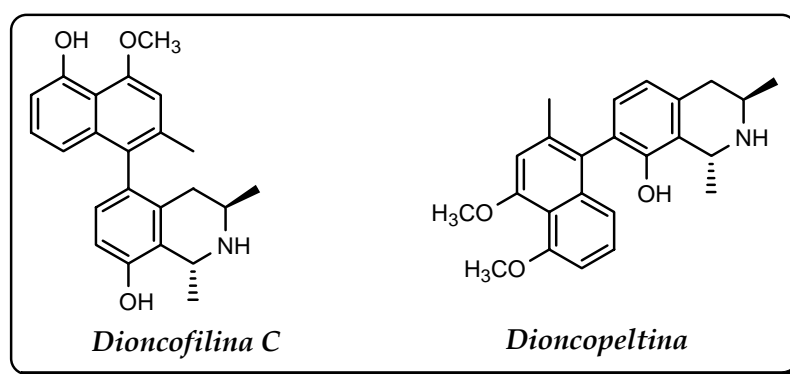


Figura 6.4.3. Artemisina, lactona sesquiterpénica, aislada de *Artemisia annua*

Dentro de los productos naturales con actividad antiplasmódica podemos citar la **2-*n*-pentenilquinolina** aislada de las hojas de *Galipea longiflora*, el metabolito más activo frente a *P. vincckei* en comparación con la cloroquina¹⁵. **Dioncofilina A, B, C** y **dioncopeltina A**, aislados de *Triphyophillum peltatum*, han sido evaluados frente a *P. falciparum* sensible y resistente a cloroquina, presentando una elevada actividad frente a las dos cepas. También fueron evaluados en un modelo *in vivo* frente a *P. berghei*, obteniéndose resultados prometedores con **dioncofilina C**¹⁶. Esta planta es utilizada en la medicina tradicional de África y Asia para el tratamiento de la fiebre, la malaria y la elefantiasis.

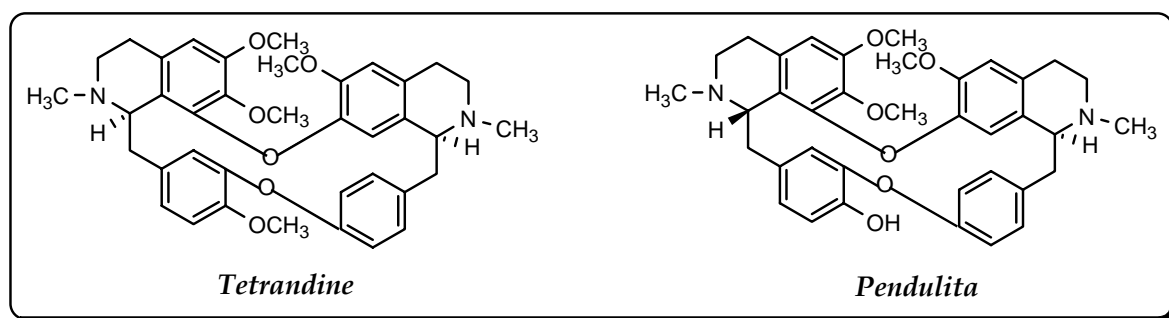


Entre los alcaloides bis-bencil-isoquinolínicos, **cefrantina** presenta actividad moduladora de la resistencia frente a *P. falciparum* resistente a cloroquina y los resultados

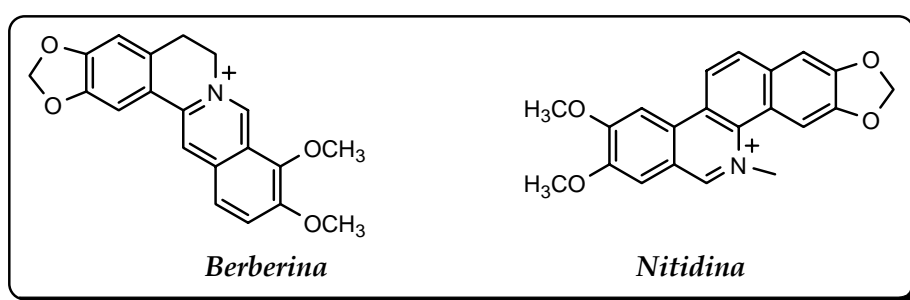
¹⁵ Gantier, J. C.; Fournet, A.; Muñoz, M.; Hocquemiller, R. *Planta Med.* **1996**, 62, 285.

¹⁶ Francois, C.; Timperman, G.; Holenz, J.; Aké Assi, L.; Geuder, T.; Maes, L.; Dubois, J.; Hanocq, M.; Bringmann, G. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **1996**, 90, 115.

obtenidos muestran una actividad 50 veces mayor que el verapamilo, un conocido revertidor de la multirresistencia a fármacos¹⁷. **Tetrandine**, aislado de las raíces de *Cyclea barbata*, presentó actividad frente a *P. falciparum*. Otro alcaloide, **pendulina**, aislado de *Isopyrum thalictroides*, es 5 veces más efectivo que tetrandine, con bajos niveles de toxicidad y un índice de seguridad del 100%, lo que indica que podría ser un compuesto prometedor como antimalárico¹⁸. Este tipo de compuestos ha llamado la atención por su acción sinérgica con los fármacos antimaláricos comerciales; así, combinaciones de tetrandine con cloroquina y artemisina están en estudio.



Diversos alcaloides tipo protoberberina como la **berberina** son compuestos muy potentes y actúan inhibiendo la proliferación de los parásitos de malaria en un modelo *in vitro* pero no son efectivos *in vivo*¹⁹. La **nitidina**, es muy activo y su mecanismo podría estar relacionado con la inhibición de las topoisomerasas, sin embargo ensayos clínicos como agente antileucémico indican que el compuesto es tóxico²⁰.



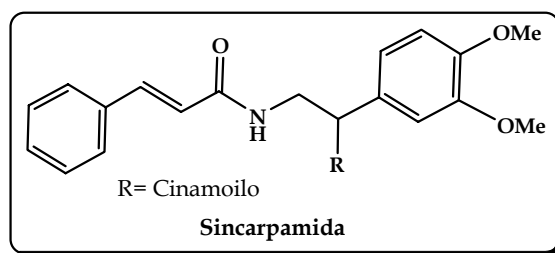
¹⁷ Haruky, K.; Bray, P. G.; Ono, M.; Ward, S. A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, *44*, 2706.

¹⁸ Valentin, A.; Benoit-Vical, F.; Moulis, C.; Stanislas, E.; Mallié, M.; Fouraste, I.; Bastide, J. M. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, *41*, 2305.

¹⁹ Wright, C. W.; Marshall, S. J.; Russell, P. F.; Anderson, M. M.; Phillipson, J. D.; Kirby, G. C.; Warshurst, D. C.; Schiff, P. L. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 1638.

²⁰ Gakunju, D. M. N; Mberu, E. K.; Dossaji, S. F.; Gray, A. I.; Waigh, R. D.; Waterman, P. G.; Watkins, W. M. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1995**, *39*, 2606.

Se ha descrito la actividad moderada frente a *Plasmodium falciparum* del extracto de metanol de las hojas de *Zanthoxylum syncarpum*, así como de tres amidas fenólicas aisladas de éste, siendo el compuesto más activo la sincarpamida con valores de CI_{50} de 4.2 y 6.1 μM contra *P. falciparum*, clon D6 y clon W2, respectivamente²¹. Así mismo, en un trabajo llevado a cabo por Lavadie y colaboradores, se sintetizó y evaluó frente a *Leishmania donovani* y *P. falciparum* una serie de 64 hidroxibencilamino derivados, presentando la mayoría de ellos actividad con valores de micromolar²².



6.5.3 Resultados y discusión: actividad antiplasmódica

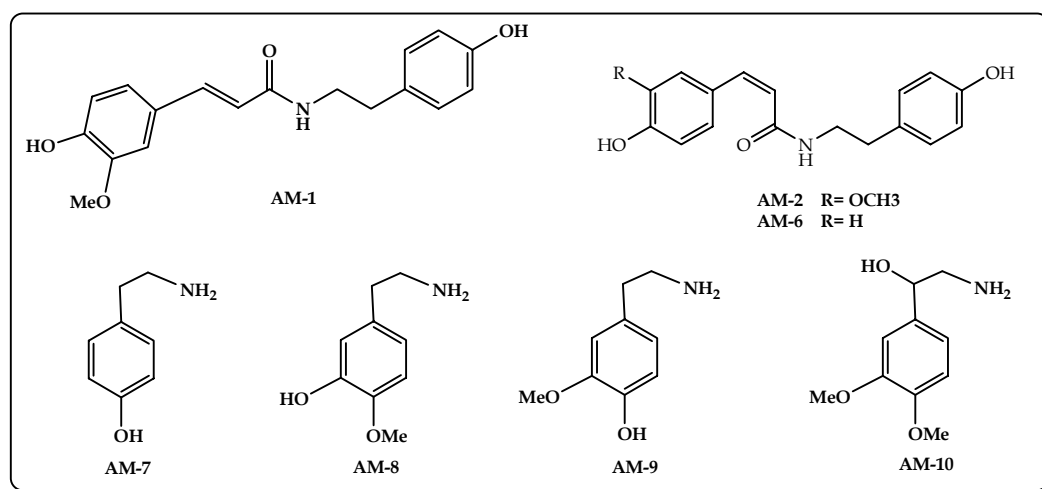
Ante la necesidad de nuevos agentes antiplasmódicos y con los antecedentes anteriormente descritos, se evaluó la actividad de las aminas y amidas aisladas de *Withania aristata*. La actividad se realizó en el Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas de la Universidad Mayor de San Andrés (IIFB-UMSA), La Paz, Bolivia, por el Ms Sc. David Gutiérrez Yapu, bajo la dirección del Dr. Alberto Giménez Turba y la Dra. Esther Ninoska Flores Quisber.

Los compuestos seleccionados para evaluar la actividad antiplasmódica *in vitro* frente a una cepa de *Plasmodium falciparum* cloroquina resistente (F-32), son los que se detallan a continuación:

- ✓ Amidas: **AM-1, AM-2 y AM-6.**
- ✓ Aminas: **AM-7, AM-8, AM-9 y AM-10.**

²¹ Ross, S. A.; Al-Azeib, M. A.; Krishnaveni, K. S.; Fronczek, F. R.; Burandt, C. L. *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 1297.

²² Labadie, G. R.; Carvalho, P. B.; Batra, S.; Choi, S.; Khan, S. I.; Tekwani, B. L.; Avery, M. A. *Med. Chem. Res.* **2006**, *14*, 332.



Se prepararon soluciones madre de las muestras, disolviéndolas en dimetilsulfóxido (DMSO) y los ensayos se realizaron en placas de microtitulación estériles de 96 pocillos siguiendo el procedimiento ya publicado por el grupo del Dr Alberto Giménez²³. Las placas se incubaron a 37 °C por un período de 48 horas, tras el cual se observó en el microscopio, con lente de inmersión X 100 y se llevó a cabo un recuento tanto de glóbulos rojos no infectados (GRL) como infectados (GRI), para así tener el % de inhibición, calculado mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inh} = \frac{(\text{GRL} - \text{GRI})}{\text{GRL}} \times 100$$

El cálculo para hallar la Concentración Inhibitoria del 50% (CI₅₀) en la maduración de los esquizontes, se hizo por el método gráfico mediante el programa Cricket Graph 1.3²⁴ y los resultados se interpretan de la siguiente manera: inactivo (> 10 µg/ml), activo (< 10 µg/ml).

Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla. Los productos que no se reflejan en la misma presentaron una CI₅₀ > 10 µg/ml.

²³ Flores, N.; Jiménez, I. A.; Giménez, A.; Ruiz, G.; Gutierrez, D.; Bourdy, G.; Bazzocchi, I. L. *Phytochemistry*, **2009**, 70(5), 621.

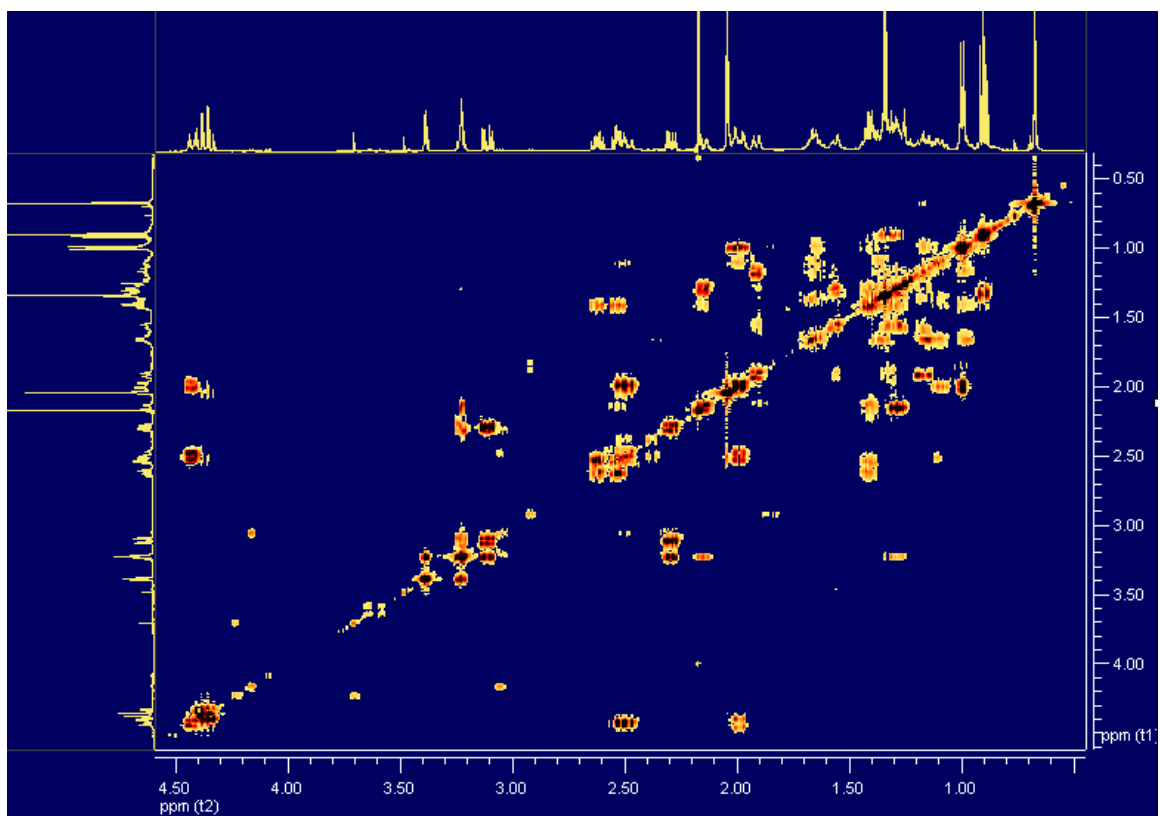
²⁴ CA-Cricket Graph Software. Graphic Presentation. Computer Associates.

Tabla 1. Actividad antiplasmódica de metabolitos aislados de *Withania aristata*

Producto	CI ₅₀ ± DE µg/ml
	<i>P. falciparum</i>
AM-1	> 10
AM-2	4.2 ± 0.5
AM-6	0.7 ± 0.1
AM-7	> 10
AM-8	3.0 ± 0.4
AM-9	> 10
AM-10	> 10

Droga control: Cloroquina, CI₅₀ 0.1 µg/ml
DE: Desviación estandar

Como se deduce de los datos que se presentan en la tabla 1, sólo tres de los siete compuestos evaluados mostraron algún grado de actividad (CI₅₀ ≤ 10 µg/ml); sin embargo, ninguno de ellos presentó una actividad comparable a la cloroquina (CI₅₀ 0.1 µg/ml). Podemos considerar que los productos **AM-2** y **AM-8** presentan una actividad moderada (CI₅₀ 4.2, 3.0 µg/ml, respectivamente), mientras que **AM-6**, resultó ser el compuesto más activo, con una CI₅₀ de 0.7 µg/ml. Estos resultados indican que la regiosustitución del anillo aromático juega un papel fundamental en la actividad.



7. Técnicas experimentales

7. Técnicas experimentales.

7.1. Técnicas espectroscópicas y espectrométricas.

7.1.1. Rotación óptica ($[\alpha]_D$).

La determinación del valor de la actividad óptica se realizó en polarímetros Perkin Elmer, modelos 241 y 343, usando la línea D del sodio a 25 °C y/o 20 °C, respectivamente. Para la realización de la medida, el producto se disuelve en cloroformo seco o en metanol seco (para las muestras insolubles en cloroformo) y se usa una célula de 1 ml de volumen y 1 dm de paso de luz. La concentración (c) está expresada en gramos por 100 ml de disolución.

7.1.2. Espectroscopía ultravioleta (UV).

Los espectros de ultravioleta se realizaron en un espectrofotómetro Jasco V-560. El producto se disolvió en etanol puro y se colocó en una celda de cuarzo de 1 ml de volumen y con un paso de luz de 10 mm. Los valores de la longitud de onda de absorción (λ) se expresan en nm.

7.1.3. Dicroísmo circular (DC).

Los espectros de DC se realizaron en un polarímetro Jasco J-600, usando células circulares de cuarzo de 1 cm de longitud. Los disolventes utilizados fueron acetonitrilo, etanol o metanol grado espectrofotométrico.

7.1.4. Espectroscopía infrarroja (IR).

Los espectros de infrarrojo se realizaron en un espectrofotómetro Bruker IFS 55 (FTIR). Los productos se disolvieron en cloroformo seco y se aplicaron formando una película sobre una pastilla de NaCl. Los valores de ν se expresan en cm^{-1} .

7.1.5. Resonancia magnética nuclear (RMN).

Los espectros de RMN se realizaron en los espectrofotómetros Bruker Avance 300 (300 MHz para ^1H y 75 MHz para ^{13}C), Bruker Avance 400 (400 MHz para ^1H y 100 MHz para ^{13}C), Bruker AMK 500 (500 MHz para ^1H y 125 MHz para ^{13}C) y/o Bruker

AMK 600 (600 MHz para ^1H y 150 MHz para ^{13}C). Los productos se disuelven en un disolvente deuterado, preferiblemente si el producto es soluble, en cloroformo deuterado (CDCl_3) que contiene tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. El uso de uno u otro disolvente deuterado está en función de la solubilidad del producto en el mismo. Los valores de desplazamiento químico (δ) se expresan en ppm y las constantes de acoplamiento (J) en Hz. En los experimentos de RMN ^1H , la multiplicidad de las señales se indica por las abreviaturas: (s) singlete, (d) doblete y (m) multiplete y en los experimentos de ^{13}C RMN: (c) CH_3 , (t) CH_2 , (d) CH y (s) C.

Se utilizaron programas COSY,¹ DEPT,² HSQC,³ HMBC y ROESY⁴ convencionales de la librería de pulsos de BRUKER. La ventaja de los experimentos 1D frente a los 2D es que necesitan menor tiempo de adquisición y tienen una mayor resolución digital.

7.1.6. Espectrometría de masas de baja resolución (EM).

Los espectros de masas de baja resolución se llevaron a cabo en espectrómetros Hewlett Packard 5995, VG Micromass ZAB-2F y/o Espire 3000 Bruker. Los métodos de ionización empleados son impacto electrónico (IE) empleando potenciales de ionización de 70 eV, bombardeo con átomos rápidos (FAB) y electrospray (ESI).

6.1.7. Espectrometría de masas de alta resolución (EMAR).

La determinación de las fórmulas moleculares, de fragmentos y/o iones moleculares, se realizan en espectrómetros VGMicromass ZAB-2F (a potenciales de ionización de 15 - 70 eV) y Fisons Instruments VG Autospec.

¹ (a) Aue, W. P.; Bartholdi, E.; Ernst, R. R. *J. Chem. Phys.* **1976**, *64*, 2229. (b) Nagayama, K. y col. *J. Magn. Reson.* **1980**, *40*, 321.

² Pegg, D. T.; Doddrell, D. M.; Bendall, M. R. *J. Chem. Phys.* **1982**, *77*, 2745.

³ Muller, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 4481.

⁴ Bax, A.; Davis, D. G. *J. Magn. Reson.* **1985**, *63*, 207.

7.2. Técnicas cromatográficas.

7.2.1 Cromatografía en capa fina (CCF).

Las cromatografías en capa fina se realizan sobre cromatofolios (20 x 20 cm) de gel de sílice tipo G de 0,25 mm de espesor, con indicador de fluorescencia a 254 nm, de la empresa Macherey-Nagel Sil G/UV₂₅₄.

La detección de los productos sobre las placas se realiza por fluorescencia con luz ultravioleta a 254 y/o 360 nm, o bien pulverizando óleum (disolución de H₂O:H₂SO₄:AcOH, 4:1:20) o una disolución de vainillina (EtOH:H₂SO₄:AcOH, 15:1:1.3 añadiendo un gramo de vainillina por cada 10 ml de AcOH) y posterior calentamiento a 120°C.

7.2.2. Cromatografía preparativa en capa fina (CPCF).

Se utilizan placas (20 x 20 cm) de 1 mm de espesor de gel de sílice tipo G, con indicador de fluorescencia a 254 nm, de la empresa Macherey-Nagel SIL G-100 UV₂₅₄. La cantidad de muestra a sembrar en estas placas es de unos 40 mg, usándose para la elusión diferentes mezclas de disolventes.

La detección de los productos sobre las placas se realiza por fluorescencia con luz ultravioleta a 254 y/o 360 nm, o bien pulverizando óleum sobre el borde, después de proteger convenientemente el resto de la placa con una lámina de vidrio, y posterior calentamiento de la zona tratada con una pistola de calor.

7.2.3. Cromatografía en capa fina de alta resolución (CCFAR).

Se utilizan placas (10 x 10 cm) de 1 mm de espesor de gel de sílice de 60, con indicador de fluorescencia a 254 nm, de la empresa Macherey-Nagel NANO-SIL 20 UV₂₅₄. La resolución de estas placas es mayor que las anteriores y la cantidad a sembrar es entorno a 10 mg, usándose para la elusión diferentes mezclas de disolventes.

La detección de los productos sobre las placas se realiza por fluorescencia con luz ultravioleta a 254 y/o 360 nm, o bien pulverizando oleum sobre el borde, después de proteger convenientemente el resto de la placa con una lámina de vidrio, y posterior calentamiento de la zona tratada con una pistola de calor.

7.2.4. Cromatografía en columna (CC).

En la realización de columnas cromatográficas (secas y húmedas) se emplea gel de sílice fina de 0,063–0,200 nm de diámetro, de la empresa Macherey-Nagel. La gel de sílice se suspende en el eluyente y se compacta con una bomba de vacío. La muestra se puede aplicar disuelta o adsorbida en gel de sílice de 0,2-0,5 nm de diámetro.

7.2.5. Cromatografía en capa fina centrífuga (CCFC).

En la separación de mezclas de metabolitos con Rf próximos, se utilizó un equipo Chromatotron®, modelo 7924T, 24VDC, 0.5 A, el cual separa en función de la elución de la fase móvil accionada por la fuerza centrífuga. Para mezclas entre 50-150 mg se usaron placas circulares de 1mm de espesor y para mezclas entre 150-300 mg se usaron placas circulares de 2 mm de espesor. Se uso gel de sílice Merk 60 PF 254 con yeso para las placas circulares.

7.2.6. Cromatografía de exclusión molecular (CEM).

Se usa como soporte Sephadex LH-20, que suministra la empresa Sigma, que requiere una previa estabilización del polímero en suspensión con metanol (4,1 ml/gr) durante, al menos, doce horas. Esta columna se estabiliza posteriormente en la mezcla que se va a usar como eluyente, para lo cual se eluye tres veces la cantidad correspondiente al volumen muerto. El eluyente que en general se utiliza es *n*-hexano-cloroformo-metanol (2:1:1). La muestra a cromatografiar tras ser filtrada se coloca en la cabeza de la columna disuelta en una cantidad de eluyente no superior al 5% del volumen muerto de la columna. La columna puede ser reutilizada tras ser lavada con metanol y estabilizada con el eluyente que se va utilizar.

7.2.7. Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR/HPLC).

Para la cromatografía líquida de alta resolución se usa un equipo Varian, que consta de dos bombas de flujo variable, proStar 210 y prepStar 218 (HPLC Solvent Delivery Module), un detector UV-Visible ProStar 335 (Photodiode Array Detector) con rango de longitud de onda 190-950 nm, una columna semipreparativa Ascetis® Si (25 cm x 4.6 mm, 5 µm), siendo el sistema isocrático de disolventes utilizado mezclas de *n*-hexano/acetato de etilo en diferentes proporciones y a diferentes velocidades de flujo,

según necesidad de resolución. El software controlador de flujos y longitud de ondas fue el suministrado por Varian inc.

7.3. Programas informáticos.

Para los cálculos de mecánica molecular se utilizó el PC Model 7.0⁵, en la simulación de espectros de RMN ¹H y ¹³C hemos empleado el ACD/Labs, para el procesamiento y el análisis de los espectros de RMN el MestReC⁶ y Topspin 2.0, en la representación de las moléculas el ChemDraw Ultra 8.0.

⁵ PC Model from Serena Software, P. O. Box. 3076, Bloomington, IN 47402-3076.

⁶ <http://www.mestrec.com/>



8. Conclusiones

8. Conclusiones Generales.

El trabajo llevado a cabo para la realización de la presente Memoria, nos permite extraer las siguientes conclusiones:

- ✓ Se llevó a cabo una revisión bibliográfica de los metabolitos aislados de especies del género *Withania* y las actividades farmacológicas que presentan.
- ✓ Se preparan ocho extractos, con disolventes de distinta polaridad, tanto de los tallos como de las hojas de *Withania aristata*, que fueron evaluados por su actividad antimicrobiana y citotóxica. El extracto más activo en ambas actividades resultó ser el extracto de las hojas en diclorometano.
- ✓ Se realiza el estudio fitoquímico del extracto de diclorometano de las hojas de *Withania aristata*. Dada la alta polaridad mostrada de las withanolidas y con la finalidad de obtener más cantidad de withaferina A, se decidió llevar a cabo el estudio fitoquímico del extracto acetónico de hojas y tallos.
- ✓ Los metabolitos aislados de *W. aristata* se agruparon para su estudio de acuerdo a sus características estructurales en: withanolidas, fitoesteroles, carotenoides, apocarotenoides, alcaloides, triterpenos y compuestos aromáticos.
- ✓ Se aíslan y determinan las estructuras de treinta y cinco withanolidas, siendo veinte de éstas nuevas en la bibliografía química: 4 β ,27-dihidroxi-1-oxo-witha-2,5,16,24-tetraenolida, 4 β -hidroxi-1-oxo-witha-2,5,16,24-tetraenolida, 27-hidroxi-1,4-dioxo-witha-2,5,16,24-tetraenolida, 4 β ,16 β ,27-trihidroxi-1-oxo-witha-2,5,17,24-tetraenolida, 16,27-dihidroxi-1-oxo-witha-2,5,17,24-tetraenolida, 16,27-dihidroxi-1,4-dioxo-witha-2,5,17,24-tetraenolida, 4 α ,17 α ,27-trihidroxi-1-oxo-witha-2,5,24-trienolida, 4 β ,17 α ,27-trihidroxi-1-oxo-witha-2,5,24-trienolida, 27-O-acetil-withaferina A, 27-(1-metoxi-1-metiletilformiato) de withaferina A, 16 β -hidroxi-17,20-didehidrowithaferina A, 16,17-didehidro-withaferina A, 27-O-acetil-viscosalactona B, 3 β ,4 β ,5 β ,6 α ,27-pentahidroxi-1-oxo-witha-24-enolida, 4 β -formil-6 β ,27-dihidroxi-5-nor-1-oxo-witha-2,24-dienolida, 4 β -formil-6 β ,27-dihidroxi-5-nor-1-oxo-witha-24-enolida, 6 β ,17 α ,27-trihidroxi-2 α ,5 α -dioxan-1-oxo-witha-3,24-dienolida, 6 β ,27-dihidroxi-2 α ,5 α -dioxan-1-oxo-witha-3,16,24-trienolida, 6 β ,27-dihidroxi-2 α ,5 α -dioxan-1-oxo-witha-3,24-dienolida, 6 β ,17 α ,27-trihidroxi-2 β ,5 β -dioxan-1-oxo-witha-3,24-dienolida, 2-carboxi-6 β ,17 α ,27-trihidroxi-1,10-seco-witha

- 3,5(10),24-trienolida y 2-carboxi-6 β ,27-dihidroxi-1,10-seco-witha-3,5(10),16,24-tetraenolida.
- ✓ La configuración absoluta de los compuestos (4*S*,20*R*,22*R*)-4,27-dihidroxi-1-oxo-witha-2,5,16,24-tetraenolida y (4*S*,20*R*,22*R*)-4-hidroxi-1-oxo-witha-2,5,16,24-tetraenolida se determina mediante dicroísmo circular.
 - ✓ Los metabolitos que denominamos 4 β ,16 β ,27-trihidroxi-1-oxo-witha-2,5,17,24-tetraenolida, 16,27-dihidroxi-1-oxo-witha-2,5,17,24-tetraenolida y 16,27-dihidroxi-1,4-dioxo-witha-2,5,17,24-tetraenolida, representan los primeros ejemplos de withanolidas con dobles enlaces C5-C6, C17-C20 y un alcohol en C-16 β .
 - ✓ La withanolida 4 α ,17 α ,27-trihidroxi-1-oxo-witha-2,5,24-trienolida es el primer ejemplo en la bibliografía química que presenta un grupo hidroxilo sobre C-4 en disposición α .
 - ✓ El producto 27-(1-metoxi-1-metiletilformiato) de withaferina A constituye el primer ejemplo de metabolito con esqueleto de withanolida con un grupo 1-metoxi-1-metiletilformiato en C-27.
 - ✓ Los compuestos 4 β -formil-6 β ,27-dihidroxi-5-nor-1-oxo-witha-2,24-dienolida y 4 β -formil-6 β ,27-dihidroxi-5-nor-1-oxo-witha-24-enolida representan los primeros ejemplos de withanolidas con el anillo A contraído aislados de fuente natural.
 - ✓ Las withanolidas 6 β ,17 α ,27-trihidroxi-2 α ,5 α -dioxan-1-oxo-witha-3,24-dienolida, 6 β ,27-dihidroxi-2 α ,5 α -dioxan-1-oxo-witha-3,16,24-trienolida, 6 β ,27-dihidroxi-2 α ,5 α -dioxan-1-oxo-witha-3,24-dienolida y 6 β ,17 α ,27-trihidroxi-2 β ,5 β -dioxan-1-oxo-witha-3,24-dienolida, constituyen los primeros ejemplos de withanolidas con un anillo endoperóxido en su esqueleto.
 - ✓ Los productos 2-carboxi-6 β ,17 α ,27-trihidroxi-1,10-seco-witha-3,5(10),24-trienolida y 2-carboxi-6 β ,27-dihidroxi-1,10-seco-witha-3,5(10),16,24-tetraenolida constituyen los primeros ejemplos de C1-C10 secowithanolidas en la bibliografía química.
 - ✓ Se da la asignación completa de los datos de RMN de ^1H y ^{13}C , haciendo uso de experimentos bidimensionales de las withanolidas 4 β ,17 α ,27-trihidroxi-1-oxo-witha-2,5,24-trienolida y 4 β -formil-6 β ,27-dihidroxi-5-nor-1-oxo-witha-24-enolida.
 - ✓ Se preparan 74 derivados de las withanolidas aisladas, para conferir diferentes características estereo-electrónicas y con la finalidad de profundizar en el conocimiento de la relación estructura-actividad (SAR).

- ✓ Se aislaron **cinco fitoesteroides** que consideramos productos intermedios en la biosíntesis de las withanolidas. Resultaron todos ellos conocidos en la bibliografía química, siendo identificados como: **ergosta-5,24-dien-3 β ,24-diol**, **phisalindicanol B**, **β -sitosterol**, **3-O- β -D-glucosil- β -sitosterol** y el **tetraacetato de 3-O- β -D-glucopiranosilsitosterol**.
- ✓ Se aíslan seis triterpenos, descritos anteriormente en la bibliografía química, tres de ellos aislados por primera vez del género *Withania*: **betulina**, **lupeol** y **α -amyrina** y tres ya descritos en este género: **β -amyrina**, **ácido ursólico** y **ácido oleanólico**.
- ✓ Se aísla un carotenoide **luteína** y nueve C-13 *nor*-isoprenoides anteriormente descritos en la bibliografía química identificados como: **(6S,9R)-vomifoliol**, **9-hidroxi-megastigma-4,6E-dien-3-ona**, **(6S)-3-oxi-6-hidroxi- α -ionona**, **blumenol C**, **blumenol B**, **3,6-dihidroxi- α -ionona**, **3-oxo- α -ionona**, **(6R,9R)-3-oxo- α -ionol** y **4-[(1S,6S)-1-hidroxi-2,2,6-trimetilciclohexil]-3-buten-2-ona** y dos C-11 *nor*-isoprenoides: **(-)-loliolida** y **(+)-isololiolida**. De la acetilación y posterior purificación de reunión de las fracciones 37-41 de la cromatografía general del extracto de diclorometano de las hojas, se aíslan tres C-13 *nor*-isoprenoides glicosilados y acetilados: **β -D-glucopiranosido tetraacetato del blumenol A**, el **tetraacetato bizantionosido B** y **tetraacetato de 9-O- β -D-glucopiranosido 9-hidroxi-megastigma-4,6E-dien-3-ona**, resultando este último nuevo en la bibliografía química.
- ✓ Se aíslan doce alcaloides de hojas y tallos de *Withania aristata*, seis amidas fenólicas: **N-trans-feruloil-tiramina**, **N-cis-feruloil-tiramina**, **N-p-cumaroil-tiramina**, **N-trans-feruloil-metoxitiramina**, **N-trans-feruloil-octopamina** y **cis-N-p-cumaroil-tiramina** y seis aminas aromáticas: **p-tiramina**, **4-O-metildopamina**, **3-metoxitiramina**, **3,4-dimetoxi-epinefrina**, **ácido nicotínico**, **2-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-3-oxetanamina** y **N-4-(3-furoilamino)-1-butanol**, resultando las dos últimas nuevas en la bibliografía química. Todos estos metabolitos se aíslan por primera vez del género *Withania*.
- ✓ Se aíslan y describen por primera vez del género *Withania* trece compuestos aromáticos ya descritos en la bibliografía química: **3-hidroximetil-4-metoxi-fenol**, **alcohol 3,4,5-trihidroxi-bencilo**, **4-hidroxi-benzaldehído**, **vainillina**, **5-hidroxi-veratraldehído**, **siringaldehído**, **4-acetofenol**, **4-acetil-pirocatecol**, **apocinina**, **ácido vainillínico**, **benzoato de metilo**, **siringato de metilo** y **ácido ferúlico**. El

compuesto **3-hidroximetil-4-metoxi-fenol** se describe por primera vez como natural.

- ✓ Se aísla por primera vez de una especie de la familia Solanaceae, el flavonoide **isosakuranetina** y el éster ferúlico **ferulato de trans-hexacosanilo**.
- ✓ Se evaluó la **actividad citotóxica** frente a tres líneas tumorales (HeLa, A-549 y MCF-7) y una no tumoral (Vero) de 85 withanolidas. En general, los derivados evaluados resultaron más potentes que los de origen natural, presentando actividad de potente ($CI_{50} < 5 \mu M$) a muy potente ($CI_{50} < 1 \mu M$). Así, los compuestos más activos frente a las tres líneas celulares tumorales fueron los derivados **4,27-di-O-acetilwithaferina A** y **27-O-benzilwithaferina A**, con valores de $CI_{50} < 1 \mu M$. Sin embargo, todos los compuestos evaluados resultaron citotóxicos frente a línea celular no tumoral Vero, lo que indica una falta de selectividad.
- ✓ En el análisis preliminar de la relación estructura-actividad (SAR) podemos concluir que la withanolida ideal como agente citotóxico debe reunir los siguientes requisitos estructurales: un sistema 2-en-1-ona en el anillo A, un alcohol o un acetato en C-4, un epóxido en los carbonos C5-C6 del anillo B, un grupo benzoato o pivaloato en el carbono C-27 del anillo lactónico.
- ✓ Los resultados indican que las withanolidas son una clase de productos naturales con potencial como agentes anticancerígenos.
- ✓ Se evalúa la **actividad antimicrobiana** frente a bacterias Gram positivas, Gram negativas y una levadura de 74 withanolidas. En general, los derivados evaluados resultaron más potentes que las withanolidas naturales siendo *B. subtilis* y *B. cereus*, las bacterias más sensibles. Así, los compuestos más activos fueron **4,27-di-O-acetilwithaferina A** y **27-O-tert-butildimetilsilil-4-deoxi-4-oxowithaferina A**.
- ✓ En el análisis preliminar de la relación estructura-actividad se puede concluir que los siguientes requisitos estructurales potencian la actividad: Un sistema 2-en-1,4-diona en el anillo A, un epóxido en los carbonos C5-C6 del anillo B y un metilo en el carbono C-27 del anillo lactónico.
- ✓ Se evaluó la **actividad inmunomoduladora** de 11 withanolidas con células de esplenocitos de ratón y dos agentes mitogénicos distintos, LPS (mitógeno estándar de células B) y concanavalina A (Con A, mitógeno estándar de células T). Los derivados **27-O-acetilwithaferina A**, **27-O-furoilwithaferina A**, **4,27-di-O-(2'-bromoacetil)-withaferina A**, **6 α -cloro-4 β ,5 β -dihidroxi-1-oxo-27-O-tert-**

butildimetilsilil-witha-2,24-dienolida y (4S,20R,22R)-4,27-di-O-acetil-1-oxo-witha-2,5,16,24-tetraenolida mostraron un efecto inmunopotenciador en la respuesta de células T a su mitógeno ConA.

- ✓ Se llevó a cabo la evaluación de la **actividad fitotóxica** de los apocarotenoides y el caroteno luteína aislados. Todos los compuestos presentaron perfiles inhibidores en el bioensayo de elongación diferencial de segmentos de coleóptilos, alcanzando valores cercanos al 50% a la concentración de 10^{-3} M para los apocarotenoides **(6S)-3-oxi-6-hidroxi- α -ionona**, **(6R,9R)-3-oxo- α -ionol** y **β -D-glucopiranosido tetraacetato del blumenol A**, así como para la **luteína**. Por otro lado, los ensayos de fitotoxicidad frente a las especies modelos (STS) utilizadas: *Lepidium sativum* L. (Berro), *Lactuca sativa* L. (Lechuga), *Lycopersicum esculentum* L. (Tomate) y *Allium cepa* L. (Cebolla), mostraron en general, perfiles bajos de actividad, siendo el parámetro más afectado la inhibición de la germinación. Los compuestos más activos han sido, la **luteína**, **(6S,9R)-vomifoliol** y **9-hidroximegastigma-4,6E-dien-3-ona**.
- ✓ Se evaluó la **actividad antiplasmódica in vitro** frente a una cepa de *Plasmodium falciparum* cloroquina resistente (F-32) de siete alcaloides, de los cuales tres mostraron algún grado de actividad ($CI_{50} \leq 10$ μ g/ml), los productos **N-cis-feruloil-tiramina** y **4-O-metildopamina** presentaron una actividad moderada (CI_{50} 4.2, 3.0 μ g/ml, respectivamente), mientras que la **cis-N-p-cumaroil-tiramina**, resultó ser el compuesto más activo, con una CI_{50} de 0.7 μ g/ml. Estos resultados indican que la regiosustitución del anillo aromático juega un papel fundamental en la actividad.



9. Anexos

8.1. Índice de productos nuevos en la bibliografía química.

Siglas	Producto	Elucidación estructural	Parte experimental	Actividad Biológica
W-1	4 β ,27-Dihidroxi-1-oxo-witha-2,5,16,24-tetraenolida	69	142	358, 378
W-2	4 β -Hidroxi-1-oxo-witha-2,5,16,24-tetraenolida	73	143	358, 378
W-3	27-Hidroxi-1,4-dioxo-witha-2,5,16,24-tetraenolida	78	144	358, 378, 397
W-4	4 β ,16 β ,27-Trihidroxi-1-oxo-witha-2,5,17,24-tetraenolida	81	145	358, 378
W-5	16,27-Dihidroxi-1-oxo-witha-2,5,17,24-tetraenolida	84	146	358, 378
W-6	16,27-Dihidroxi-1,4-dioxo-witha-2,5,17,24-tetraenolida	85	147	358, 378
W-7	4 α ,17 α ,27-Trihidroxi-1-oxo-witha-2,5,24-trienolida	90	148	358
W-8	4 β ,17 α ,27-Trihidroxi-1-oxo-witha-2,5,24-trienolida	92	149	358, 378
W-13	27-O-Acetil-withaferina A	95	150	358, 378
W-14	27-(1-Metoxi-1-metiletilformiato) de withaferina A	97	151	358
W-15	16 β -Hidroxi-17,20-didehidrowithaferina A	99	152	358, 378
W-16	16,17-Didehidro-withaferina A	101	153	358, 378, 397
W-23	27-O-Acetil-viscosalactona B	103	154	
W-24	3 β ,4 β ,5 β ,6 α ,27-Pentahidroxi-1-oxo-witha-24-enolida	106	155	358
W-28	4 β -Formil-6 β ,27-dihidroxi-5-nor-1-oxo-witha-2,24-dienolida	112	156	358, 378
W-29	4 β -Formil-6 β ,27-dihidroxi-5-nor-1-oxo-witha-24-enolida	116	157	358
W-30	6 β ,17 α ,27-Trihidroxi-2 α ,5 α -dioxetan-1-oxo-witha-3,24-dienolida	118	158	358
W-31	6 β ,27-Dihidroxi-2 α ,5 α -dioxetan-1-oxo-witha-3,16,24-trienolida	123	159	358
W-32	6 β ,27-Dihidroxi-2 α ,5 α -dioxetan-1-oxo-witha-3,24-dienolida	126	160	358
W-33	6 β ,17 α ,27-Trihidroxi-2 β ,5 β -dioxetan-1-oxo-witha-3,24-dienolida	127	161	358
W-34	2-Carboxi-6 β ,17 α ,27-trihidroxi-1,10-seco-witha-3,5(10), 24-trienolida	130	162	
W-35	2-Carboxi-6 β ,27-dihidroxi-1,10-seco-witha-3,5(10),16,24-tetraenolida	133	163	
Ap-12	9-O- β -D-Glucopiranosido tetraacetato 9-hidroxi-megastigma-4,6E-dien-3-ona	174	181	408
AM-11	2-(4-Hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-3-oxetanamina	194	203	
AM-12	N-4-(3-Furoilamino)-1-butanol	197	204	

Siglas	Producto	Elucidación estructural	Parte experimental	Actividad Biológica
2	27-O-Acetilwithaferina A	225	271	358, 378, 397
3	4,27-Di-O-acetilwithaferina A	225	272	361, 380
4	27-O-Naftilwithaferina A	226-230	273	361, 380, 397
5	4,27-Di-O-naftilwithaferina A	226-230	274	361
6	27-O-Benzilwithaferina A	226-230	275	361, 380
7	27-O-Lauroilwithaferina A	226-230	276	361, 380
8	4,27-Di-O-lauroilwithaferina A	226-230	277	380
9	27-O-Pivaloilwithaferina A	226-230	278	361, 380
10	4,27-Di-O-pivaloilwithaferina A	226-230	279	361, 380, 397
11	4,27-Di-O-octanoilwithaferina A	226-230	280	361, 380
12	27-O-Furoilwithaferina A	226-230	281	397
13	4,27-Di-O-furoilwithaferina A	226-230	282	361, 380
14	27-O-(<i>p</i> -Bromobenzoil)-withaferina A	226-230	283	361, 380
15	4,27-Di-O-(<i>p</i> -bromobenzoil)-withaferina A	226-230	284	
16	27-O-Acetil- 4-O-(<i>p</i> -bromobenzoil)-withaferina A	226-230	285	361, 380
17	4-O-Carbamoilwithaferina A	226-230	286	
18	27-O-(2'-Bromoacetil)-withaferina A	226-230	287	361, 380
19	4,27-Di-O-(2'-bromoacetil)-withaferina A	226-230	288	397
20	27-O-(2'- <i>N</i> -Metilaminobenzoil)-withaferina A	226-230	289	361, 380
21	27-O-Anisoilwithaferina A	226-230	290	361
22	27-O-Nicitoilwithaferina A	226-230	291	
23	27-O-(4'-O-Metilsuccinatoil)withaferina A	226-230	292	361, 380
24	4,27-Di-O-(4'-O-metilsuccinatoil)withaferina A	226-230	293	361, 380
25	27-O-Metilwithaferina A	230	294	361, 380
26	4-O-Metilwithaferina A	230	295	361, 380
27	27-O-(<i>tert</i> -Butildimetilsilil)withaferina A	231	396	361, 380, 397

Siglas	Producto	Elucidación estructural	Parte experimental	Actividad Biológica
28	27- <i>O</i> -(<i>tert</i> -Butildimetilsilil)-5 β ,6 α -dihidroxi withaferina A	231	297	361
29	27-Clorowithaferina A	232	298	361, 380
30	4,27-Diclorowithaferina A	232	299	361, 380
31	25-Demetil-5 β ,6 β -epoxi-25-formil-4 β -hidroxi-1-oxo-witha-2,4-dienolida	233	300	361, 380
32	25-Demetil-5 β ,6 β -epoxi-25-formil-1,4-di oxo-witha-2,4-dienolida	233	301	
33	2,3-Dihidro-27-deoxiwithaferina A	235	302	361, 380
34	2,3-Dihidrowithaferina A	236	303	361, 380
35	2 β ,3 β -Epoxiwithaferina A	237	304	361, 380
36	(2 β ,3 β)-(24 β ,25 β)-Diepoxiwithaferina A	237	305	361, 380
37	Viscosalactona B	238	306	358
38	3 β - <i>O</i> -Metilwithaferina A	239	307	361
39	3 β ,27-Di- <i>O</i> -metilwithaferina A	240	308	361
40	5 β ,6 β -Epoxi-4,27-dihidroxi-3 β - <i>O</i> -metil-1-oxo-witha-2,3,25-dienolida	240	309	361
41	3-Butilamino-2,3-dihidrowithaferina A	242	310	361, 380
42	3-Bencilamino-2,3-dihidrowithaferina A	242	311	361, 380
43	3-Dibencilamino-2,3-dihidrowithaferina A	242	312	361, 380
44	6 α -Cloro-5 β -hidroxiwithaferina A	243	313	
45	1-Deoxo-1 β -hidroxiwithaferina A	244	314	361, 380
46	5 α ,3 α -Epoximino-4 β ,6 β ,27-trihidroxi-1-oxo-witha-24-enolida	246	317	361
47	6 α ,3 α -Epoximino-4 β ,6 β ,27-trihidroxi-1-oxo-witha-24-enolida	246	318	361
49	27-Hidroxi-4- <i>nor</i> -1-oxo-witha-2,5,24-trienolida	251	319	
50	(22 <i>E</i> , 24 <i>Z</i>)-5 β ,6 β -Epoxi-4 β ,27-dihidroxi-1-oxo-ergosta-2,22,24-trien-26-oato de alilo	256	321	361, 380
54	5 β ,6 β -Epoxi-27- <i>O</i> -glutaril-4 β -hidroxi-1-oxo-witha-2,24-dienolida	260	323	
55	27- <i>O</i> -Acetil-6 α -cloro-5 β -hidroxiwithaferina A	262	324	361
56	4,27-Di- <i>O</i> -acetil-6 α -cloro-5 β -hidroxi withaferina A	262	325	
57	27- <i>O</i> -Anisoil-6 α -cloro-5 β -hidroxi withaferina A	263	326	361, 380

Siglas	Producto	Elucidación estructural	Parte experimental	Actividad Biológica
58	4,27-Di- <i>O</i> -anisoil-6 α -cloro-5 β -hidroxi withaferina A	263	327	361, 380
59	6 α -Cloro-27- <i>O</i> -furoil-5 β -hidroxiwithaferina A	263	328	361
60	6 α -Cloro-5 β -hidroxi-27- <i>O</i> -octanoilwithaferina A	263	329	361
61	6 α -Cloro-5 β -hidroxi-4,27-di- <i>O</i> -octanoilwithaferina A	263	330	361
62	4,27-Di- <i>O</i> -[4- <i>O</i> -metilsuccinatoil]-6 α -cloro-5 β -hidroxi-1-oxo-witha-2,24-dienolida	263	331	361
63	6 α -Cloro-4 β ,5 β -dihidroxi-1-oxo-27- <i>O</i> - <i>tert</i> -butildimetilsilil-witha-2,24-dienolida	263	332	361, 380, 397
64	27- <i>O</i> -Acetil-4-deoxi-4-oxowithaferina A	265	333	361
65	27- <i>O</i> - <i>tert</i> -Butildimetilsilil-4-deoxi-4-oxowithaferina A	266	334	361, 380
66	(4 <i>S</i> ,20 <i>R</i> ,22 <i>R</i>)-27- <i>O</i> -Acetil-4-hidroxi-1-oxo-witha-2,5,16,24-tetraenolida	267	336	
67	(4 <i>S</i> ,20 <i>R</i> ,22 <i>R</i>)-4- <i>O</i> -Acetil-27-hidroxi-1-oxo-witha-2,5,16,24-tetraenolida	267	337	
68	(4 <i>S</i> ,20 <i>R</i> ,22 <i>R</i>)-4,27-Di- <i>O</i> -acetil-1-oxo-witha-2,5,16,24-tetraenolida	267	338	361, 380, 397
69	(4 <i>S</i> ,20 <i>R</i> ,22 <i>R</i>)-27- <i>O</i> -Acetil-4- <i>O</i> -(<i>p</i> -bromo benzoiil)-1-oxo-witha-2,5,16,24-tetra enolida	268	339	361
70	27- <i>O</i> -Furoil-3 β -metoxi-2,3-dihidro withaferina A	269	340	
71	27- <i>O</i> -Anisoil-3 β -metoxi-2,3-dihidro withaferina A	269	341	361, 380
72	5 β ,6 β -Epoxi-1 β ,4 β -dihidroxi-witha-24-enolida	270	342	361, 380
73	5 β ,6 β -Epoxi-1 β ,4 β ,27-trihidroxi-witha-24-enolida	270	343	361, 380
74	6 β ,27-Diacetoxi-17 α -hidroxi-2 α ,5 α -di oxetan-1-oxo-witha-3,24-dienolida	121	344	